

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA
UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

CONSTRUÇÃO DE MINIGENES PARA AVALIAÇÃO DE
MUTAÇÕES QUE ALTERAM O SÍTIO DE SPLICING DO GENE
RESPONSÁVEL PELA GLICOGENOSE TIPO IA
(DOENÇA DE VON GIERKE)

FERNANDA DE CASTRO REIS

ORIENTADORA: Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Denise Yvone Janovitz Norato

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área Ciências Biomédicas da aluna **Fernanda de Castro Reis**.

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração Ciências Biomédicas.

Campinas, 23 de março de 2001.

Edi Lúcia Sartorato
Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato

CAMPINAS
2001



229511002

UNIDADE BC
 N.º CHAMADA: TI/Unicamp
R277c
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 45489
 PROC. 16/392/01
 C ☐ D ☐
 PREÇO 11,00
 DATA 31/07/01
 N.º CPD

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
 UNICAMP**

CM00158096-3

R277c Reis, Fernanda de Castro
 Construção de minigenes para avaliação de mutações que alteram o
 sítio de splicing do gene responsável pela glicogenose tipo Ia (Doença
 de Von Gierke) / Fernanda de Castro Reis. Campinas, SP : [s.n.],
 2001

Orientadores : Edi Lúcia Sartorato, Denise Yvone Janovitz Norato
 Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
 de Ciências Médicas.

1. Glicogênio. 2. Glicose. 3. Mutação. 4. Gene. I. Edi Lúcia
 Sartorato . II. Yvone Janovitz Norato. III. Universidade Estadual de
 Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

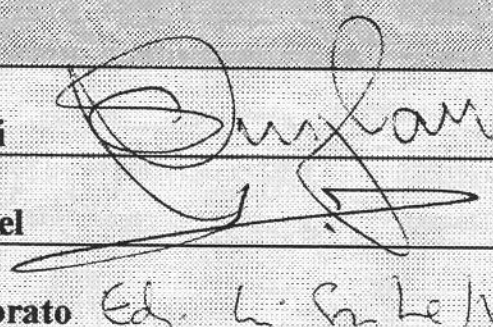
Orientador: Profa. Dra. EDI LÚCIA SARTORATO

Membros:

1. Prof. Dr. Roberto Giugliani

2. Profa. Dra. Christine Hackel

3. Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato



The block contains three handwritten signatures. The first signature, corresponding to Prof. Dr. Roberto Giugliani, is a stylized cursive 'R'. The second signature, corresponding to Profa. Dra. Christine Hackel, is a more complex cursive script. The third signature, corresponding to Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato, is a cursive signature that appears to read 'Edi L. Sartorato'.

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 23/03/2001

Há sem dúvida quem ame o infinito,
Há sem dúvida quem deseje o impossível,
Há sem dúvida quem não queira nada -
Três tipos de idealistas, e eu nenhum deles:
Porque eu amo infinitamente o finito,
Porque eu desejo impossivelmente o possível,
Porque quero tudo, ou um pouco mais, se puder ser,
Ou até se não puder ser...

Fernando Pessoa

*À minha família
dedico este trabalho.*

À minha vizinha Osmar, pelo cuidado de vó que ela sempre teve comigo, por sua fé e por suas bênçãos milagrosas que sempre me tranquilizaram e ajudaram muito em várias etapas da minha vida.

À minha vó Conceição in memoriam, que também contribuiu para que eu chegasse até aqui. Tenho certeza de que ela ficaria muito feliz de ver o que conquistei.

À minha mãe, Maria Luísa, pela dedicação, amor, apoio emocional e financeiro, sem os quais não seria possível chegar até onde cheguei.

Às minhas tias Fia, Taia, Lourdes e Bê e aos meus tios Luiz e Max, que sempre participaram, incentivaram e acompanharam minha “vida acadêmica” e com quem sempre pude contar.

Ao Pedro, pela amizade, incentivo e por estar proporcionando muitas alegrias e bons momentos à minha mãe.

À Profa. Dra. Edí Lúcia Sartorato, quem me ensinou tudo que sei de biologia molecular e com quem aprendi a ser cientista. Espero ter incorporado pelo menos um pouco de seu entusiasmo pelo trabalho. Obrigada por tudo.

À Profa. Dra. Denise Y. J. Norato, pela co-orientação, pelas sugestões oferecidas e por ter feito a triagem dos pacientes avaliados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Giugliani por ter participado da triagem dos pacientes avaliados neste trabalho e aceitado fazer parte da pré-banca e banca examinadora desta tese.

À Profa. Dra. Christine Hackel pelo incentivo, amizade e por ter aceitado fazer parte da banca examinadora do exame de qualificação, pré-banca e banca desta tese.

Ao Prof. Dr. Gonçalo Amarantes G. Pereira, por ter aceitado fazer parte da banca examinadora do exame de qualificação e pelas relevantes sugestões oferecidas à realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello, pela amizade e incentivo.

À minha amigona Sandra, de quem sinto muita falta. Ela sempre me dizia que ia dar tudo certo e eu não acreditava...

Ao meu amigo e quase irmão Lúcio, que também tá tão longe agora... Pelos muitos bons momentos que passamos juntos e na "Mafalda", e pela paciência que ele tinha pra me ajudar.

Ao meu outro amigo do peito, o Véio (Marcelo), pela ajuda com o bendito computador, por me fazer dar muitas risadas, tanto que ganhei até o apelido de “Risadinha” por sua causa. Tenho muita saudade do tempo em que éramos o trio Parada Dura. A gente era feliz e não sabia...

Às “Edíletes”, por ordem de chegada pra não ter briga.... Camila, Helô, Elena e Fabiana “Frau” pela amizade, companheirismo, ajuda, força e pelos muitos momentos de descontração e “chíacchere”.

À Dani e a Eliana por terem compartilhado comigo minhas aflições e problemas quanto aos experimentos de clonagem e pelas dicas e conselhos que me ajudaram muito a solucioná-los.

À Madá, pelo carinho e amizade, pela paciência com meus humores, pela ajuda técnica e pelos momentos de alegria.

Ao Andrey BC, pelo *leptop* e por ouvir minha aula de qualificação umas três vezes...

À todo mundo do laboratório de Genética Humana que ainda não mencionei, mas que contribuiu com certeza para a realização deste trabalho: Marcela, Junia, Jú, Lucy, Bel, Mirtão, Osmarbíio, André e Jair.

Aos funcionários do CBMEG, em especial à Tânia, Fabiana, Sandra e a Rita.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

°C- graus Celsius
μCi- microcurrie
μg- micrograma
μl- microlitro
μM- micromolar
Amp - ampicilina
ATP- trifosfato de adenosina
cDNA – DNA complementar
Ci- currie
ddNTPs- didesoxinucleotídeos
del - delegação
DEPC – dietil pirocarbonato
DH5α- linhagem da bactéria *E. coli*
DMEM – *Dulbecco's modified Eagle's Medium*
DNA- ácido desoxirribonucleico
dNTPs- desoxinucleotídeos
DTT - Ditioneitol
EDTA- ácido etilenodiaminotetracético
g- grama
G6P - glicose 6-fosfato
G6Pase - glicose 6-fosfatase
G6PC - gene que codifica a enzima glicose 6-fosfatase
G6PT1 - gene que codifica a proteína glicose 6-fosfato translocase
GSD – doença de depósito de glicogênio (*Glycogen Storage Disease*)
GSDIa - glicogenose tipo Ia
GSDIb - glicogenose tipo Ib
Kb- Quilo base
KDa – Quilo Dalton
Km- Constante de *Michaelis*
l - litro
LB- meio de cultura Luria-Bertani
LDL - lipoproteínas de baixa densidade
M- molar
M- molaridade
mA- mili Ampère
mg- miligrama
min- minutos
ml- mililitro
mm- milímetro
mM- milimolar
mmol- milimol
N - normalidade
ng- nanograma
nm- nanômetro
pb- pares de bases
PCR – reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
Pfx DNA Polymerase – DNA Polimerase de *Pyrococcus* sp
pmol- picomol
RNA – ácido ribonucleico

rpm- rotações por minuto
SDS- Dodecil Sulfato de Sódio
seg- segundos
SFB – soro fetal bovino
SSCP - polimorfismo da conformação da simples fita (*Single Strand Conformation Polymorphism*)
TAE – Tris/ácido acético/EDTA
Taq – DNA Polimerase de *Thermus aquaticus*
TBE – Tris/ácido bórico/EDTA
TE- Tris- EDTA
TEMED – N,N,N',N' - Tetrametiletilenodiamina
T_m- Temperatura de fusão (*melting*)
Tris- Tris(hidroximetil)aminometano
U- unidades
V- volts
VLDL - lipoproteína de densidade muito baixa
V_{max} – velocidade máxima
W- watts
X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β ,D-galactosidase

Figura 1. Modelo do sistema microsomal hepático da glicose 6-fosfatase (G6Pase). **G6P**, glicose 6-fosfato; **T₁**, glicose 6-fosfato translocase; **T₂**, transportador de fosfato inorgânico; **T₃**, transportador de glicose – página 4.

Figura 2. Consequências metabólicas provocadas pela glicogenose tipo I. Acetil-CoA = acetil coenzima A; IMP = inosina-5' -monofosfato; ACT = ácido tricarboxílico – página 6.

Figura 3. (A) Corte histológico de tecido hepático normal; (B) Corte histológico de tecido hepático com glicogenose, observa-se o citoplasma claro dos hepatócitos, indicando o grande acúmulo de glicogênio – página 10.

Figura 4. Principais vias de síntese e quebra do glicogênio no fígado. GluT = proteína de transporte de glicose; UDP = uridina difosfato; UDPG = uridina difosfato-glicose – página 11.

Figura 5. Estrutura da enzima G6Pase. Os aminoácidos que contribuem para o sítio ativo da enzima estão em azul, e os três sítios de glicosilação estão em vermelho. RE – retículo endoplasmático – página 12.

Figura 6. Organização do gene G6PC que codifica a enzima glicose-6-fosfatase. Estão demonstrados os cinco exons que compõem o gene e o tamanho de cada um – página 14.

Figura 7. Fluxograma para o diagnóstico das glicogenoses tipo Ia e Ib – página 22.

Figura 8. Estratégia seguida para construção de minigenes e detecção de alterações no mecanismo de *splicing* do gene da G6Pase – página 32.

Figura 9. Esquema das etapas de clonagem do minigene no vetor pSVL – página 33.

Figura 10. Posição dos *primers* utilizados na amplificação de cada exon do gene G6PC. Tamanho da região codificante (abaixo) e tamanho dos fragmentos de amplificação (acima) – página 36.

Figura 11. Ciclo utilizado na amplificação dos exons do gene da G6Pase – página 36.

Figura 12. Ciclo utilizado na reação de sequenciamento – página 40.

Figura 13. Posição dos *primers* utilizados na amplificação de cada intron do gene G6PC e tamanho dos introns em quilo bases. As barras vermelhas indicam a posição das mutações no intron 3 (IVS3-58T>A) da paciente 11 e no intron 4 (IVS4+10G>A) da paciente 6 – página 42.

Figura 14. Ciclo utilizado na amplificação dos introns do gene da G6Pase – página 43.

Figura 15. Um detalhe do vetor de expressão pSVL mostrando seus sítios de restrição para *Xba* I e *Bam*H I e o fragmento clonado – página 45.

Figura 16. O ciclo demonstrado à seguir na figura 16 foi usado na reação de amplificação do inserto – página 49.

Figura 17. Mapa do vetor de expressão pSVL – página 52.

Figura 18. Ciclo utilizado na amplificação dos fragmentos transcritos a partir dos minigenes 3 e 4 – página 60.

Figura 19. Mutação nova (azul); mutações já citadas na literatura (vermelho); alterações intrônicas (verde) e polimorfismo (preto) – página 63.

Figura 20. Amplificação dos 5 exons do gene G6PC através da reação da PCR. M – marcador de peso molecular de 100pb-Gibco BRL – página 64.

Figura 21. Mutação V338F. Em A) - Resultado da técnica de SSCP a partir da digestão do exon 5 da paciente 24 (M) e de um controle (N) com a enzima *Hae* III. As setas vermelhas indicam o padrão anormal de eletroforese para a paciente 24. Em B) - Sequenciamento ilustrando a mutação G¹⁰¹²→T (V338F) no exon 5 do gene da G6Pase dos pacientes 24 e 25 (P) e a sequência normal (N) – página 65.

Figura 22. Em A) SSCP do exon 1 de alguns pacientes com GSDIa. As setas mostram um padrão de migração de bandas alterado na paciente 27. Em B) Mutação A¹⁹²→T (D38V) no exon 1 do gene da G6Pase do paciente 27 – página 66.

Figura 23. Mutação de G → A na posição 641+10 do intron 4 em heterozigose no paciente 6 (P) e a sequência normal (N) – página 66.

Figura 24. A) Mutação G²⁸¹→A no exon 1 da paciente 11(P), alterando no códon 68 o aminoácido Glicina por Arginina. O pai (F) e a mãe (M) do paciente são heterozigotos para a mutação; B) Mutação silenciosa P145 em homozigose; C) Mutação em homozigose no intron 3 da paciente 11 (M) e a sequência normal (N) – página 67.

Figura 25. Mutação Q347X (C¹¹¹⁸→T) encontrada em homozigose no exon 5 dos pacientes 14 e 41; (P) paciente e (N) sequência normal – página 68.

Figura 26. Mutação C³²⁶→T (R83C) no exon 2 do gene da G6Pase presente nos pacientes 26, 32 e 51 (P) e a sequência normal (N) – página 68.

Figura 27. Padrão de digestão do produto da PCR do exon 5 com *Dra* I. Em presença da base T, o fragmento de 647pb é digerido em 572 e 75pb – página 69.

Figura 28. Análise de restrição para o polimorfismo T1176C com a enzima *Dra* I. M- marcador de peso molecular de 100pb-GibcoBRL. 1- produto da PCR não digerido; 2- ausência do sítio de restrição para *Dra* I, homozigoto para C; 3- heterozigoto T/C; 4- presença do sítio de *Dra* I, homozigoto para T – página 69.

Figura 29. Amplificação dos introns 1, 2, 3 e 4 do gene G6PC. M-marcador de peso molecular de 1Kb-GibcoBRL – página 70.

Figura 30. Amplificação por PCR dos minigenes. A) construção exon3-intron3-exon4 do paciente 11 e controle; B) construção exon4-intron4-exon5 do paciente 6 e de dois controles. M = marcador de peso molecular 1Kb-Gibco BRL – página 71.

Figura 31. PCR das colônias recombinantes, a seta indica a colônia cujo inserto apresenta o tamanho desejado. M = marcador de peso molecular de 1Kb-Gibco BRL – página 72.

Figura 32. Sequenciamento do clone recombinante contendo o minigene 4, mostrando a sequência do *primer* V12R e a inserção do sítio de restrição para *Bam*H I, na região 3' do fragmento amplificado – página 73.

Figura 33. Vetor pSVL e fragmento amplificado do paciente 6 (P6) e de um controle (C) já digeridos e purificados (M = Marcador de peso molecular de 1Kb-Gibco BRL) para clonagem em pSVL – página 74.

Figura 34. Um exemplo da utilização da PCR para constatar a presença ou não do inserto em colônias selecionadas. A banda de 86pb é referente a amplificação de seqüências do vetor pSVL sem o fragmento inserido. A banda de 1,6Kb corresponde ao minigene 4 clonado. M – marcador de peso molecular de 1Kb-Gibco BRL – página 74.

Figura 35. Dupla digestão dos plasmídios recombinantes. A) Vetor pSVL e minigene 3, controle (C) e mutante (paciente 11), o inserto possui 1,65Kb; B) Vetor pSVL e minigene 4, controle (C) e mutante (paciente 6), o inserto possui 1,6Kb. (M = marcador de peso molecular de 1Kb-Gibco BRL) – página 75.

Figura 36. Mecanismo de *splicing* normal entre os exons do gene da G6Pase e a posição dos *primers* utilizados na reação de PCR pós-transcricional – página 76.

Figura 37. Amplificação dos fragmentos expressos pelos minigenes em células COS-7. Em ambos os minigenes 3 e 4 (A e B) os produtos de amplificação dos controles e dos pacientes apresentam o mesmo tamanho, demonstrando que não houve formação de transcritos aberrantes pelos fragmentos mutantes clonados. M₁ – marcador de peso molecular de 100pb-MBI Fermentas; M₂ – marcador de peso molecular de 1Kb-Gibco BRL – página 76.

Tabela 1. Alterações encontradas no gene da G6Pase – página 16.

Tabela 2. Mutações no gene da G6Pase em pacientes caucasianos, chineses, hispânicos, japoneses, judeus e árabes com GSD1a – página 18.

Tabela 3. Análise da atividade da G6Pase em microsossomos de fígado humano – página 20.

Tabela 4. Dados clínicos dos pacientes em que foram encontradas alterações – página 29.

Tabela 5. Sequência dos *primers* usados para amplificação de cada exon e tamanho dos fragmentos obtidos – página 37.

Tabela 6. Sequência dos *primers* usados para amplificação de cada intron e tamanho dos fragmentos obtidos – página 43.

Tabela 7. Sequência dos *primers* usados para construção de minigenes e para verificação da presença de inserto nos plasmídios pGEM e pSVL e o tamanho dos fragmentos obtidos – página 45.

Tabela 8. Soluções utilizadas na preparação das células competentes – página 47.

Tabela 9. Soluções utilizadas na minipreparação de plasmídios – página 50.

Tabela 10. Sequência dos *primers* usados para amplificação dos fragmentos transcritos e tamanho dos fragmentos obtidos – página 60.

Tabela 11. Resumo das alterações detectadas – página 62.

Tabela 12. Genótipo dos pacientes com relação às mutações no gene G6PC – página 63.

Tabela 13. Resultado da análise do polimorfismo $T^{1176} \rightarrow C$ – página 70.

Tabela 14. Resumo das alterações encontradas – página 78.

Tabela 15. Distribuição e frequência das mutações em 16 alelos da G6Pase em pacientes com GSD1a – página 79.

A doença de depósito de glicogênio do tipo Ia (GSDIa), é a forma mais comum entre as glicogenoses do tipo I (GSDI), com uma frequência de 1:100.000 nascimentos. É uma doença de herança autossômica recessiva, clinicamente caracterizada por hipoglicemia, hepatomegalia, retardo no crescimento, hiperlipidemia, hiperuricemia e acidose láctica. Esses sintomas são provocados pela deficiência da enzima glicose 6-fosfatase (G6Pase), que cataliza as etapas finais da gliconeogênese e glicogenólise através da conversão da glicose 6-fosfato (G6P) em glicose e fosfato. No passado, muitos pacientes com GSDI morriam pela doença. Atualmente, com o diagnóstico precoce e início de um tratamento contínuo e adequado, complicações como adenomas hepáticos e renais podem ser prevenidas.

O isolamento do cDNA humano da G6Pase demonstrou que o gene G6PC é composto de cinco exons, possui um tamanho de 12,5Kb e se localiza no cromossomo 17. Desde sua clonagem, mais de 50 diferentes mutações foram descritas no gene. Em pacientes caucasianos provenientes dos EUA e do Noroeste europeu, as mutações R83C e Q347X são responsáveis por 22,5% e 22,4% de todos os alelos mutantes respectivamente.

O diagnóstico de GSDIa pode ser feito através de testes enzimáticos e confirmado pela análise de mutação no gene G6PC. A caracterização do gene da G6Pase possibilitou a identificação de mutações que causam GSDIa. Este fato nos dá a opção de aplicar um diagnóstico baseado em análise de DNA para detecção de portadores e diagnóstico pré-natal. A caracterização do gene também possibilita um *insight* em torno da relação estrutura-função da catálise da G6Pase, revelando a função estrutural de aminoácidos específicos.

No presente estudo, vinte e sete pacientes de GSDIa provenientes de 26 famílias não relacionadas foram investigados. O diagnóstico pela análise da atividade da enzima G6Pase em biópsia de fígado foi confirmado em apenas quatro pacientes.

A estratégia dos minigenes foi utilizada para verificar o efeito das mutações intrônicas sob o mecanismo de *splicing*, não sendo identificados transcritos aberrantes. A perda de exons ou incorporação de fragmentos intrônicos nos exons são mecanismos mutacionais comuns, frequentemente causados por mudanças nas sequências conservadas de regiões de sítios de *splicing*. Da mesma forma sequências fora dessas regiões também podem afetar a inclusão ou exclusão de exons. Essas alterações que atuam nos mecanismos de *splicing* podem estar localizadas em introns ou em exons, e padrões de *splicing* alternativos podem ser determinados pela visualização do tamanho do produto de transcrição.

Foram identificadas oito alterações no gene G6PC, incluindo uma nova mutação de ponto encontrada até o momento somente na população brasileira, publicada por nosso grupo, duas mutações intrônicas, uma mutação silenciosa e quatro mutações de ponto previamente descritas. Foi analisado também o polimorfismo T1176C que está em associação com a mutação R83C. Esse polimorfismo pode ser utilizado como marcador para o diagnóstico de portadores e pré-natal de famílias com GSDIa que têm mutações não identificadas e que são informativas para esse marcador. Esse estudo enfatiza que a análise molecular genética é uma alternativa confiável e conveniente ao ensaio enzimático feito em biópsia de fígado para o diagnóstico de GSDIa.

I. Introdução.....	1
1. Glicogenoses – doenças de depósito de glicogênio.....	2
1.1. Glicogenose do tipo I.....	3
2. Glicogenose do tipo Ia (Doença de Von Gierke).....	5
2.1. Aspectos clínicos e laboratoriais.....	6
2.2. Histopatologia.....	10
2.3. A enzima glicose 6-fosfatase.....	11
2.4. O gene G6PC.....	14
2.5. Diagnóstico.....	20
2.6. Tratamento.....	23
 II. Objetivos.....	 25
 III. Material e Métodos.....	 27
1. Casuística.....	28
2. Métodos.....	31
2.1. Estratégia utilizada.....	31
2.2. Descrição dos métodos.....	34
A. Extração de DNA de sangue periférico.....	34
B. Análise do gene G6PC.....	35
1. Amplificação dos exons do gene G6PC a partir de DNA genômico.....	35
2. Detecção de mutações por análise da conformação da fita simples.....	37
3. Sequenciamento.....	39
4. Estudo do polimorfismo T1176C.....	41
5. Amplificação dos introns do gene G6PC a partir de DNA genômico.....	42
C. Construção dos minigenes.....	44
1. Amplificação exon-intron-exon do gene G6PC a partir de DNA genômico.....	44
2. Clonagem no vetor pGEM.....	46
3. Identificação do inserto.....	48

3.1. Amplificação do inserto diretamente das colônias de bactérias recombinantes.....	49
3.2. Extração de plasmídio em pequena escala (minipreparação).....	50
4. Preparação do vetor pSVL e do inserto para clonagem.....	51
5. Clonagem no vetor pSVL.....	52
6. Identificação do inserto no vetor pSVL pela técnica da PCR.....	53
7. Extração de plasmídio.....	54
8. Cultura de células COS-7.....	54
9. Transfecção do plasmídio pSVL recombinante em células COS-7.....	55
10. Isolamento de mRNA total.....	57
11. Síntese de cDNA.....	58
12. Amplificação dos minigenes a partir do cDNA.....	59
IV. Resultados.....	61
1. Alterações encontradas.....	62
2. Resumo das alterações encontradas nos pacientes estudados.....	63
3. Análise das mutações no gene G6PC.....	64
3.1. Amplificação dos exons.....	64
3.2. Rastreamento de mutações pelas técnicas de SSCP e sequenciamento.....	64
4. Análise do polimorfismo T1176C.....	69
5. Análise dos introns do gene G6PC.....	70
5.1. Amplificação dos introns.....	70
5.2. Sequenciamento dos introns.....	71
6. Construção dos minigenes.....	71
6.1. Amplificação dos minigenes.....	71
6.2. Clonagem no vetor pGEM.....	72
6.3. Clonagem no vetor pSVL.....	73
6.4. Análise dos transcritos.....	75

V. Discussão.....	77
1. Mutações encontradas no gene G6PC.....	78
<i>Mutação R83C.....</i>	<i>80</i>
<i>Mutação Q347X.....</i>	<i>81</i>
<i>Mutação IVS4+10G>A.....</i>	<i>81</i>
<i>Mutações G68R, P145 e IVS3-58T>A.....</i>	<i>82</i>
<i>Mutação V338F.....</i>	<i>83</i>
<i>Mutação D38V.....</i>	<i>83</i>
2. O polimorfismo T1176C.....	84
3. Estratégia dos minigenes.....	85
4. Diagnóstico.....	86
 VI. Conclusões.....	 88
 VII. Summary.....	 91
 VIII. Referências bibliográficas.....	 93
 IX. Anexos.....	 107
1. Sequências flanqueadoras dos introns 1, 2, 3, e 4.....	108
2. Artigo aceito para publicação.....	109

I. Introdução

1. GLICOGENOSES - DOENÇAS DE DEPÓSITO DE GLICOGÊNIO

As doenças de depósito de glicogênio (GSDs) ou glicogenoses são desordens hereditárias que afetam o metabolismo do glicogênio. Todas as proteínas envolvidas na síntese ou degradação do glicogênio e sua regulação causam algum tipo de glicogenose, podendo este ser anormal tanto na sua quantidade quanto qualidade (CHEN & BURCHELL, 1995).

A primeira descrição clínica de um paciente com dificuldades na mobilização do glicogênio foi feita por SNAPPES & VAN CREVELD (1928), desde então, uma variedade de distúrbios no metabolismo do glicogênio têm sido descritas. A classificação bioquímica tornou-se possível quando detalhes das vias de metabolismo do glicogênio foram elucidados (CORI, 1954). As diferentes formas de GSD foram classificadas por números de acordo com a ordem cronológica em que foram identificadas e atualmente existem mais de doze tipos, sendo cada uma delas provocadas por diferentes defeitos genéticos que dificultam a quebra do glicogênio no fígado, músculo ou em ambos (TALENTE *et al.*, 1994; CHEN & BURCHELL, 1995).

O fígado e o músculo armazenam abundantes quantidades de glicogênio e são os tecidos mais seriamente afetados. Como o metabolismo de carboidratos no fígado é responsável pela homeostase da glicose no plasma, as glicogenoses que afetam o fígado, apresentam como características principais hepatomegalia e hipoglicemia. Em contraste, o papel do glicogênio no músculo é fornecer substratos que permitam a formação de ATP necessária para a contração muscular. Os sintomas predominantes das glicogenoses que afetam os músculos são câibras musculares, intolerância a exercícios, susceptibilidade a fadiga e fraqueza progressiva (CHEN & BURCHELL, 1995).

A frequência total de todas as formas de doença de depósito de glicogênio, baseada em dados europeus, é de aproximadamente 1:20.000 a 25.000 nascimentos. Os tipos I, II, III e VI são os mais comuns e responsáveis por mais de 90% dos casos (HERS *et al.*, 1989; CHEN 1991).

1.1. GLICOGENOSE DO TIPO I

Em 1929, o anátomo-patologista alemão Edgar Von Gierke descreveu pela primeira vez a glicogenose tipo I como hepato-nefromegalia glicogênica, sendo esta chamada até hoje de doença de Von Gierke.

CORI & CORI (1952) demonstraram em amostras de fígado congeladas, obtidas através de autópsias e biópsias, que a inatividade da enzima glicose 6-fosfatase (G6Pase) era o defeito enzimático responsável pela GSDI, estabelecendo pela primeira vez que desordens metabólicas poderiam surgir de deficiências enzimáticas.

Devido ao crescente número de pacientes identificados, tornou-se evidente que uma parte deles apresentavam sintomas clínicos de GSDI, mas não apresentavam deficiência na atividade da enzima G6Pase em fígado congelado. Em 1968, SENIOR & LORIDAN propuseram o termo glicogenose tipo Ib (GSDIb) para esses pacientes e deu-se o nome de glicogenose tipo Ia para os casos específicos em que a atividade da enzima glicose 6-fosfatase não era normal.

BIALEK *et al.* (1977) e NARISAWA *et al.* (1978), propuseram que um defeito no sistema de transporte microssomal de membrana da glicose 6-fosfato (G6P), era responsável pelo tipo Ib, o que foi demonstrado mais tarde por LANGE *et al.* (1980). O tipo Ic, uma terceira forma de glicogenose tipo I causada por um defeito no transporte microssomal de fosfato ou pirofosfato, foi descrita pela primeira vez por NORDLIE *et al.* (1983). E ainda um quarto subtipo, classificado como Id é provocado por uma deficiência no transporte microssomal da glicose (CHEN & BURCHELL, 1995). A atividade da glicose 6-fosfatase, em todos os tipos de célula, é fortemente associada ao retículo

endoplasmático e a membranas nucleares. A subunidade catalítica da enzima tem seu sítio ativo voltado para o lúmen do retículo (CHOU & MANSFIELD, 1999).

Em resumo, a hidrólise da glicose 6-fosfato *in vivo* envolve a participação de proteínas integrais de membrana (ARION *et al.* 1980) e portanto, a GSDI foi separada em subtipos correspondendo aos seguintes defeitos: na subunidade catalítica da G6Pase (Ia), na translocase da G6P (Ib), na proteína transportadora de pirofosfato/fosfato (Ic) e na proteína transportadora de glicose (Id) (CHEN & BURCHELL, 1995). O modelo do sistema microsomal da G6Pase está ilustrado na figura 1.

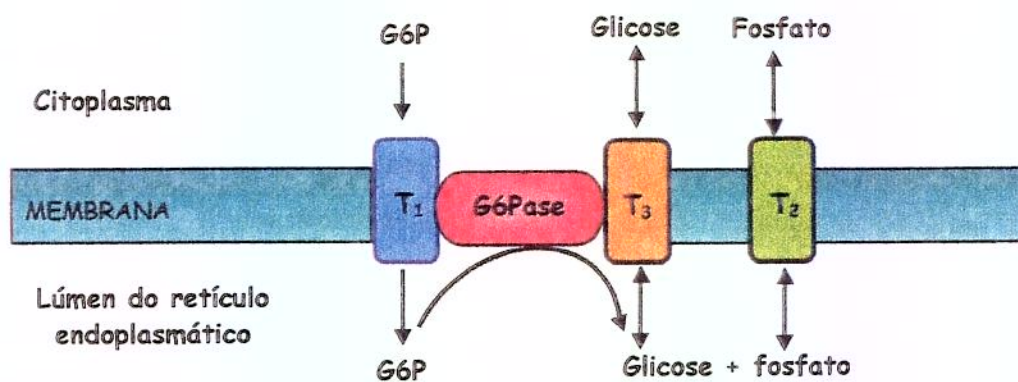


Figura 1 - Modelo do sistema microsomal hepático da glicose 6-fosfatase (G6Pase). G6P, glicose 6-fosfato; T₁, glicose 6-fosfato translocase; T₂, transportador de fosfato inorgânico; T₃, transportador de glicose.

Embora GSDIb, Ic e Id tenham sido classificadas de acordo com as deficiências em transportadores de glicose 6-fosfato, fosfato inorgânico e glicose respectivamente, a base molecular dessas doenças permaneceu obscura até que o gene responsável pela glicogenose tipo Ib (G6PT1) foi clonado facilitando o entendimento do metabolismo da glicose 6-fosfato (GERIN *et al.*, 1997; ANNABI *et al.*, 1998). Atualmente existe muita discussão em torno da classificação dos subtipos em Ib, Ic e Id. LIN *et al.* (1999) demonstraram que existem *loci* distintos para GSDIb e GSDIc, enquanto que VEIGA-DA-CUNHA *et al.* (1998 e 1999), sugerem a existência de um único *locus* para os dois subtipos.

Ambos os genes para GSDIb e GSDIc foram localizados no cromossomo 11q23 por estudos independentes (ANNABI *et al.*, 1998; FENSKE *et al.*, 1998), sugerindo que esses dois subtipos tenham a mesma base molecular. Mais de 40 mutações diferentes já foram descritas em pacientes com GSDIb. As mesmas mutações no gene G6PT1 também estavam presentes em seis pacientes com GSDIc e no único caso descrito de GSDId. Isso sugere que tanto a glicose 6-fosfato quanto o fosfato, são transportados em microssomos pela mesma translocase ou que os ensaios bioquímicos utilizados para diferenciar os transportadores de fosfato e G6P não são confiáveis. Portanto o gene G6PT1 parece ser responsável por todos os casos de GSDI que não sejam tipo Ia, e a classificação de GSD tipo I deve ser redefinida como GSDIa ou GSDI *non-a* que engloba os subtipos Ib, Ic e Id (VEIGA-DA-CUNHA *et al.*, 1999).

De acordo com VEIGA-DA-CUNHA *et al.* (2000), só existem na prática dois tipos de GSDI (Ia e Ib), que podem ser diferenciados por meio da análise da atividade enzimática da glicose 6-fosfatase em biópsia de fígado e por análise de mutações nos genes da glicose 6-fosfato (G6PC) e da glicose 6-fosfato translocase (G6PT1). A inatividade da enzima G6Pase indica que o paciente apresenta glicogenose tipo Ia, enquanto que a atividade normal da enzima indica glicogenose tipo Ib. O diagnóstico pode ser confirmado por análise de mutações nos respectivos genes.

2. GLICOGENOSE DO TIPO IA (DOENÇA DE VON GIERKE)

A glicogenose tipo Ia, como foi dito anteriormente, é provocada pela deficiência da atividade da enzima G6Pase. É uma doença de herança autossômica recessiva, com uma frequência estimada de 1:100.000 nascimentos e representa de 80 a 90% dos casos de GSD do tipo I (SHELLY *et al.*, 1993).

2.1. ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Os principais sintomas bioquímicos presentes em pacientes com GSDIa são hipoglicemia, acidose láctica, hiperuricemia e hiperlipidemia, como está demonstrado na figura 2. A inatividade da glicose 6-fosfatase provoca um acúmulo de glicose 6-fosfato no fígado e uma maior utilização deste substrato em vias secundárias aumentando com isso a produção de outros metabólitos responsáveis pelo surgimento de outros sintomas responsáveis por GSDIa.

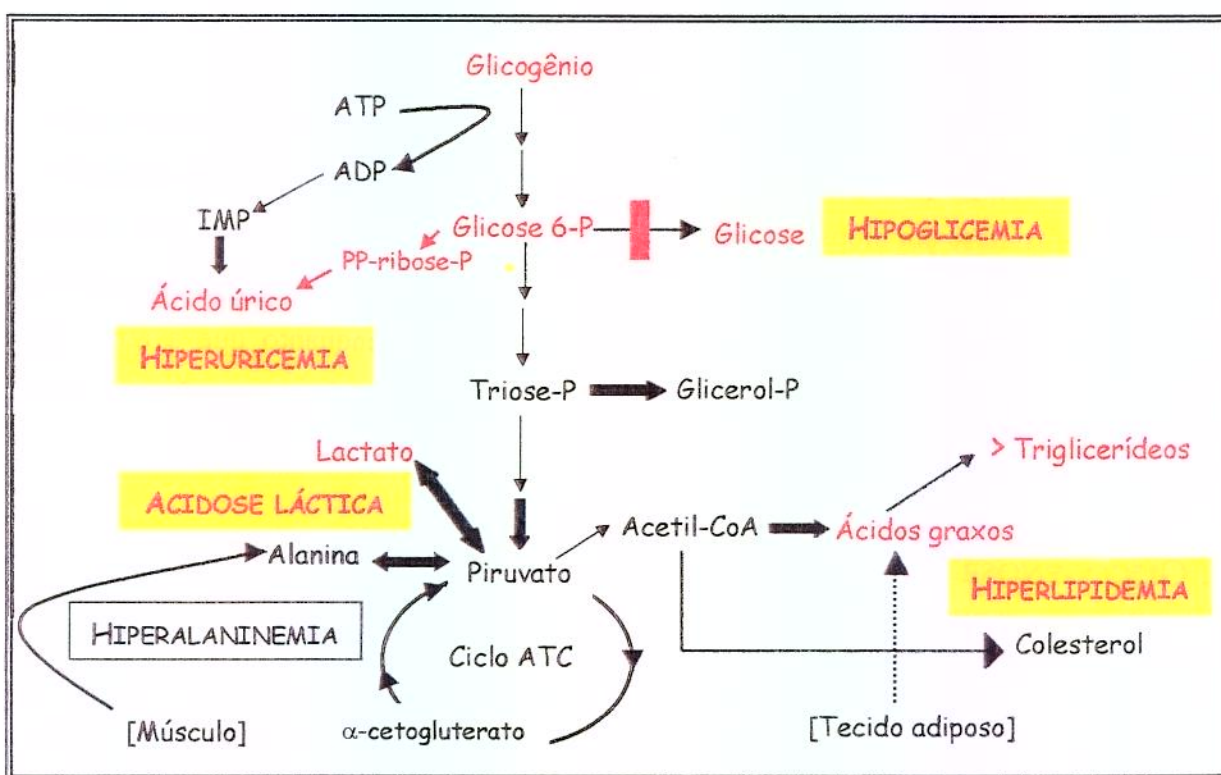


Figura 2 - Consequências metabólicas provocadas pela glicogenose tipo I. Acetil-CoA = acetil coenzima A; IMP = inosina-5' -monofosfato; ACT = ácido tricarboxílico.

A hipoglicemia acontece uma vez que a deficiência na atividade da G6Pase no fígado bloqueia os passos finais das vias glicolíticas e gliconeogênicas, o que interrompe a constante reciclagem de glicose no fígado (HUE 1981). Esses pacientes são incapazes de manter os níveis normais de glicose sanguínea durante o período de jejum, embora a propensão a hipoglicemia diminua com a idade. Como consequência também do bloqueio enzimático, a produção de glicose endógena seria seriamente comprometida, porém análises feitas em pacientes jovens e adultos, claramente indicam que eles ainda são capazes de produzir glicose (COLLINS *et al.*, 1990). A razão da produção de glicose endógena em pacientes jovens é aproximadamente a metade da razão em controles, e essa razão aumenta em adultos para dois terços do valor normal. O aumento da produção de glicose com a idade explica porque adultos com GSD são menos susceptíveis a hipoglicemia. O mecanismo de produção endógena de glicose ainda está sob investigação.

A glicose 6-fosfato formada a partir da glicogenólise, gliconeogênese e fosforilação da glicose pela enzima glicoquinase, não consegue atravessar a membrana dos hepatócitos como glicose e se acumula seguindo então, através da via glicolítica, de onde sai como lactato, provocando acidose láctica. A acidose láctica crônica abastece o cérebro como combustível alternativo durante a escassez de glicose (FERNANDES *et al.*, 1984).

Hipoglicemia e acidose láctica podem ocorrer após um curto período de jejum. No passado, muitos pacientes morriam durante a infância, pois não eram diagnosticados como sendo portadores de GSDI e portanto não seguiam um tratamento adequado (CHEN & BURCHELL, 1995). Atualmente, com o diagnóstico precoce e início do tratamento adequado, esses sintomas podem ser prevenidos.

Outros sintomas como hiperuricemia e hiperlipidemia são respectivamente provocados pelo aumento na produção de ácido úrico e aumento da síntese de triglicerídeos, de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), assim como a diminuição da lipólise periférica (LEVY *et al.*, 1988).

Durante o período neonatal, pacientes com GSDIa podem apresentar hipoglicemia e acidose láctica; contudo esses sintomas são mais visíveis a partir do terceiro mês de idade, assim como a hepatomegalia e hipoglicemia. As crianças apresentam fâcies de boneca, com excesso de tecido adiposo nas bochechas, abdômen protuberante, devido à hepatomegalia, nefromegalia, extremidades relativamente finas e baixa estatura. Alguns pacientes apresentam diarreia intermitente. O aparecimento de hematomas é comum e está associado à longos períodos de sangramento, devido ao decréscimo da agregação e adesão plaquetárias, secundárias a hipoglicemia. Existem casos raros de GSDI assintomáticos exceto pela notável hepatomegalia (CHEN & BURCHELL, 1995).

O plasma destes pacientes pode apresentar um aspecto leitoso como resultado dos altos níveis de triglicerídeos. O colesterol e os fosfolípidos também são elevados, porém menos proeminentes. As anormalidades lipídicas são caracterizadas por altas concentrações de VLDL, LDL e apoproteínas (LEVY *et al.*, 1988).

Em pacientes adultos em que a doença não foi adequadamente tratada, surgem complicações à longo prazo. Na adolescência o crescimento continua a ser retardado e portanto os adultos têm estatura menor que o padrão normal. A puberdade é atrasada, contudo a fertilidade é normal. Durante essa época os sintomas de gota geralmente começam devido à hiperuricemia. As anormalidades lipídicas levam a um risco aumentado para o surgimento de pancreatite (MICHELS & BEAUDET 1980; KIKUCHI *et al.*, 1991) e arteriosclerose (LEVY *et al.*, 1988).

Adenomas hepáticos, problemas renais, osteoporose e hipertensão pulmonar se desenvolvem na maioria dos pacientes com GSDI quando estes alcançam sua segunda ou terceira décadas de vida. A utilização de hormônios hepatotrópicos para estimulação do fígado no combate à hipoglicemia pode ser responsável pelo surgimento de adenomas hepáticos. Estes podem provocar hemorragias e podem transformar-se em malignos, podendo ser visualizados através de ultrassonografia (KARASAWA *et al.*, 1998).

A deficiência da G6Pase altera o metabolismo das células do túbulo renal, resultando em uma relativa deficiência de energia. Quase todos os pacientes com GSDIa podem apresentar cálculos renais, nefrocalcinose, hiperfiltração glomerular, aumento do fluxo de plasma renal e microalbuminúria.

Pacientes portadores de glicogenose tipo Ib podem apresentar, além dos sintomas descritos acima, neutropenia e disfunção dos neutrófilos, o que permitiria distingui-los clinicamente de pacientes com GSDIa. Esses sintomas resultam em infecções bacterianas recorrentes e indicam que mutações no gene G6PT1 comprometem outras funções além da subunidade catalítica da G6Pase e que também estão ausentes nos leucócitos (VAN DE WERVE *et al.*, 2000). É comum também o surgimento de ulcerações na mucosa intestinal e oral e casos de inflamação crônica intestinal (AMBRUSO *et al.*, 1985). Contudo, já foram descritos dois casos de pacientes que apresentavam mutações no gene G6PT1, responsável pelo subtipo Ib, mas que não apresentavam neutropenia característica desse subtipo (KURE *et al.*, 2000). Portanto quando nenhuma anormalidade for encontrada na enzima G6Pase pela análise enzimática ou genética, a investigação do gene transportador de G6P deve ser feita mesmo que o paciente não apresente neutropenia ou infecções recorrentes.

Ainda entre os tipos de glicogenose mais frequentemente observados está a GSD tipo III. Como na GSD tipo I, ocorre retardo de crescimento, que se normaliza na fase adulta. Pacientes com GSDIII possuem acúmulo de glicogênio no fígado e no músculo, podendo também apresentar cardiopatia (HOWELL *et al.*, 1983). A heterogeneidade clínica é grande, e desta forma a GSDIII, principalmente na infância, pode ser confundida com a GSDI. Porém no tipo III ocorre a deficiência de uma proteína bifuncional, isto é, que possui dois sítios catalíticos, responsáveis pela liberação sucessiva de resíduos de glicose a partir do glicogênio e pelas atividades catalíticas das enzimas oligo-1,4-1,4-gluconotransferase e amilo-1,6-glucosidase (GORDON *et al.*, 1972; BATES *et al.*, 1975). A deficiência da enzima no fígado está associada à hipoglicemia na infância, mas em adultos é incomum.

2.2. HISTOPATOLOGIA

A histologia do fígado de pacientes com GSDIa é caracterizada pela distensão de todos os hepatócitos devido ao acúmulo de glicogênio e gordura (figura 3).

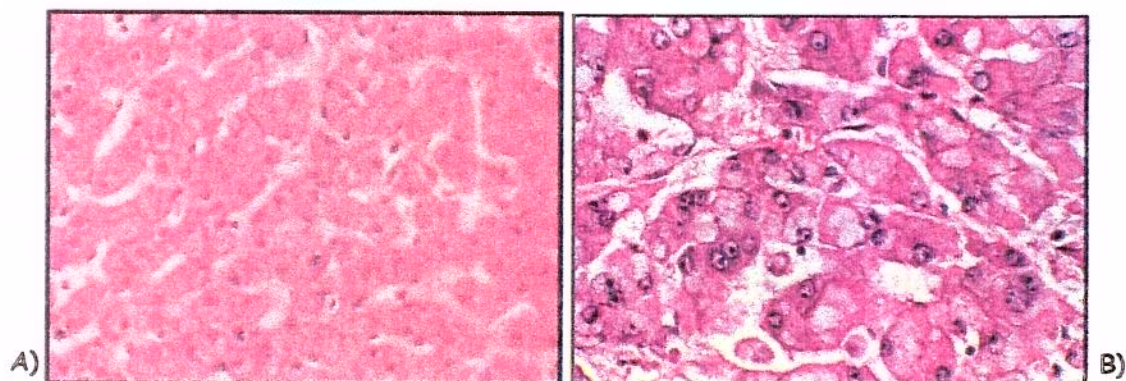


Figura 3 - (A) Corte histológico de tecido hepático normal; (B) Corte histológico de tecido hepático com glicogenose, observa-se o citoplasma claro dos hepatócitos, indicando o grande acúmulo de glicogênio. Cortes corados com hematoxilina e eosina (LEESON & LEESON, 1990).

A distribuição do glicogênio dentro das células do fígado é uniforme, exceto quando interrompida por vacúolos lipídicos que são freqüentes e grandes. Por isso os hepatócitos são palidamente corados e têm membranas plasmáticas proeminentes. O aumento das células e concomitantemente, o colapso dos sinusóides resultam em um parênquima cuja aparência lembra um mosaico. Uma característica importante e diferencial é o fenômeno de hiperglicogenose nuclear. A presença de glicogênio no núcleo de hepatócitos é observada em crianças normais, porém em pacientes portadores de GSDI, o núcleo é grotescamente aumentado, e caracteriza um fenômeno chamado de hiperglicogenização (MCADAMS *et al.*, 1974).

2.3. A ENZIMA GLICOSE 6-FOSFATASE

A atividade da glicose 6-fosfatase (G6Pase), em todos os tipos de célula, é fortemente associada ao retículo endoplasmático e a membranas nucleares. A subunidade catalítica da enzima tem seu sítio ativo voltado para o lúmen do retículo, o que significa que tanto o substrato quanto o produto devem atravessar a membrana do retículo endoplasmático como mostrado na figura 4 (CHOU & MANSFIELD, 1999). A atividade da subunidade catalítica é aumentada durante períodos de jejum e em casos de diabetes, diminuída pela insulina. O que significa que ela é regulada exatamente da forma inversa da enzima glicoquinase.

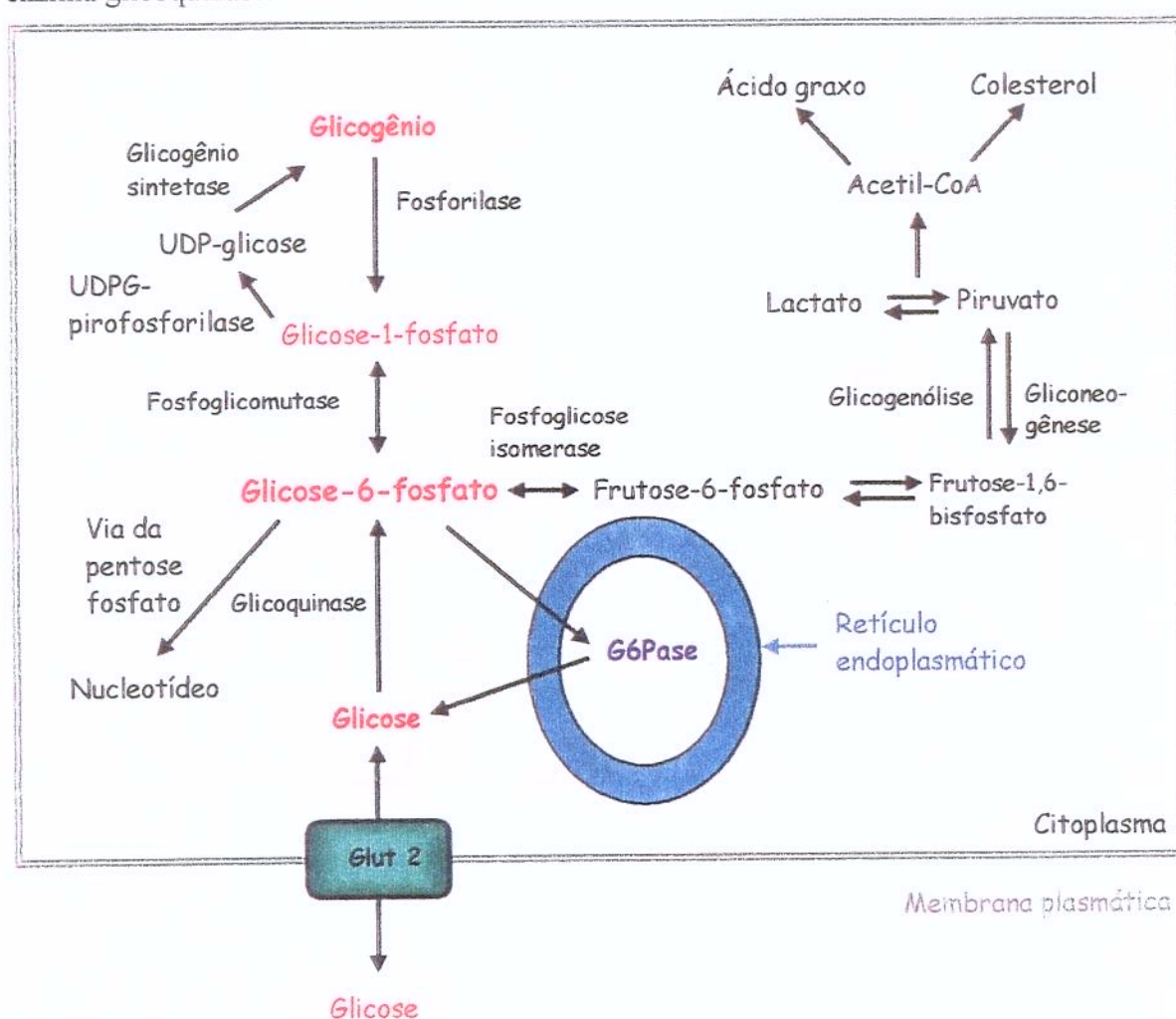


Figura 4 - Principais vias de síntese e quebra do glicogênio no fígado. GluT = proteína de transporte de glicose; UDP = uridina difosfato; UDPG = uridina difosfato-glicose.

A enzima G6Pase catalisa os passos finais da gliconeogênese e glicogenólise, assim como a conversão da glicose 6-fosfato em glicose e fosfato (figura 4). A G6Pase também utiliza como substrato o pirofosfato e o carbamilsulfato e é considerada a enzima chave na homeostase da glicose sanguínea. Sua atividade foi medida *in situ* por análises histoquímicas, sendo ela expressa principalmente no fígado e nos rins, e em menor quantidade na mucosa intestinal e no pâncreas (WEGMANN & MELLO DE OLIVEIRA *et al.*, 1969). Recentemente, sua presença também foi detectada em astrócitos do cérebro humano (BELL *et al.*, 1993) e em leucócitos e plaquetas humanas (NICHOLS *et al.*, 1984).

A estrutura secundária da enzima foi recentemente redefinida e contém 9 domínios transmembrânicos em forma de hélice, com a região N-terminal localizada no lúmen do retículo endoplasmático e a região C-terminal no citoplasma (figura 5). A topologia deste modelo sugere que a G6Pase humana tem, além dos domínios transmembrânicos, quatro *loops* citoplasmáticos e quatro *loops* voltados para o lúmen do retículo (PAN *et al.*, 1998).

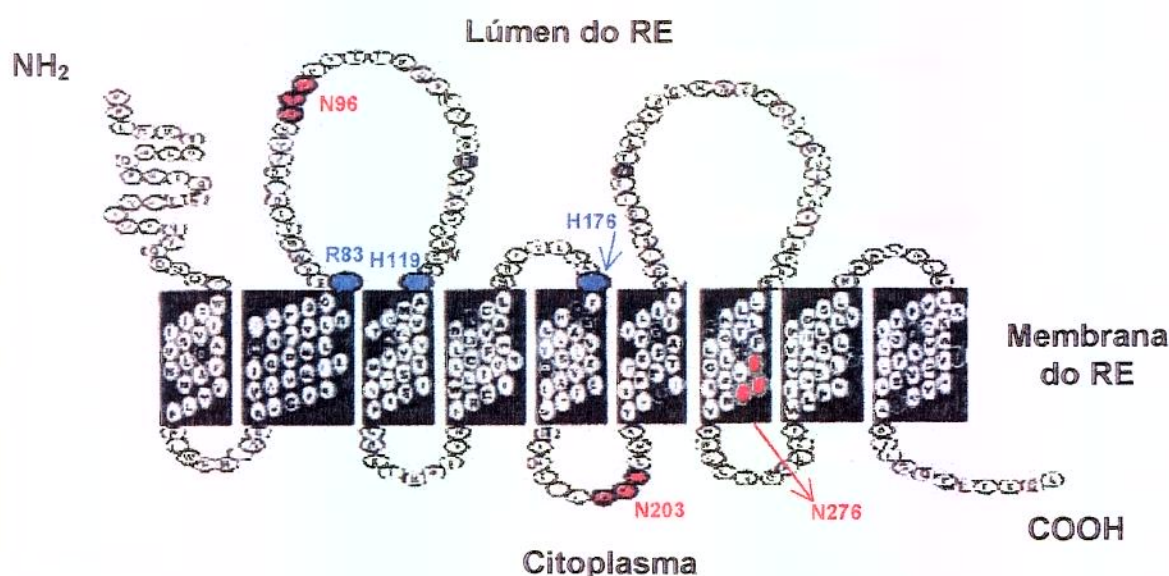


Figura 5 – Estrutura da enzima G6Pase. Os aminoácidos que contribuem para o sítio ativo da enzima estão em azul, e os três sítios de glicosilação estão em vermelho. RE – retículo endoplasmático.

A G6Pase é uma glicoproteína que apresenta três sítios potenciais de glicosilação ligados à asparagina, são eles N⁹⁶TS, N²⁰³AS, e N²⁷⁶SS, por isso pode-se dizer que ela pertence a uma classe de glicoproteínas de membrana que são N-glicosiladas (LEI *et al.*, 1993; SHELLY *et al.*, 1993). Todos os três sítios são conservados na G6Pase de mamíferos. Contudo, pesquisas demonstraram que a G6Pase só é realmente glicosilada na posição Asn96, pois este é o único dos três sítios que está voltado para o lúmen do retículo, sendo então um aceptor potencial de oligossacarídeos. Os outros dois sítios de glicosilação se localizam no *loop* citoplasmático e no sétimo domínio transmembrânico respectivamente (PAN *et al.*, 1998).

Os aminoácidos Arg83, His119 e His176, presentes na enzima G6Pase, são cruciais para a ligação da glicose 6-fosfato ao sítio ativo da enzima e sua posterior hidrólise em glicose e fosfato (CHOU & MANSFIELD, 1999). Por meio de estudos de mutagênese sítio dirigida esses aminoácidos foram substituídos por similares ou não, e o efeito dessas substituições na atividade enzimática foi examinado. Mostrou-se que todas as mutações aboliam a atividade da G6Pase, comprovando a importância desses resíduos na hidrólise da G6P (LEI *et al.*, 1995a).

Atualmente já foram encontradas várias mutações e deleções que resultaram em troca de aminoácido em um dos domínios transmembrânicos, indicando a importância da integridade estrutural desses segmentos. Foram encontradas também mutações no domínio N-terminal e nos *loops* voltados para o lúmen do retículo. Ainda não foram encontradas alterações nos *loops* citoplasmáticos, o que significa que esta é uma região que compromete menos a atividade catalítica da G6Pase (RAKE *et al.*, 2000a).

2.4. O GENE G6PC

Embora já se soubesse que um defeito na enzima G6Pase fosse o responsável pela GSDIa, foi difícil purificá-la devido a sua alta hidrofobicidade e forte associação ao retículo endoplasmático. Em 1993, o cDNA da G6Pase de camundongo foi isolado de uma biblioteca de fígado de camundongo através de rastreamento diferencial, tendo como vantagem um camundongo albino mutante que apresentava baixos níveis de G6Pase em comparação com o tipo selvagem (SHELLY *et al.*, 1993). O cDNA da G6Pase de humanos foi isolado como resultado de sua homologia com o cDNA de camundongos (LEI *et al.*, 1993). O cDNA da G6Pase também foi caracterizado em rato (LANGE *et al.*, 1994) e cão (KISHNANI *et al.*, 1997). A enzima G6Pase de todos os quatro mamíferos é um polipeptídeo de 357 aminoácidos, e apresenta de 87-91% de homologia na sequência de aminoácidos.

Em humanos o gene G6PC está localizado no cromossomo 17, região q21, possui um transcrito de 12,5Kb e consiste em cinco exons (figura 6). Este gene codifica uma proteína extremamente hidrofóbica, cuja massa molecular é de 35 kDa (LEI *et al.*, 1993).

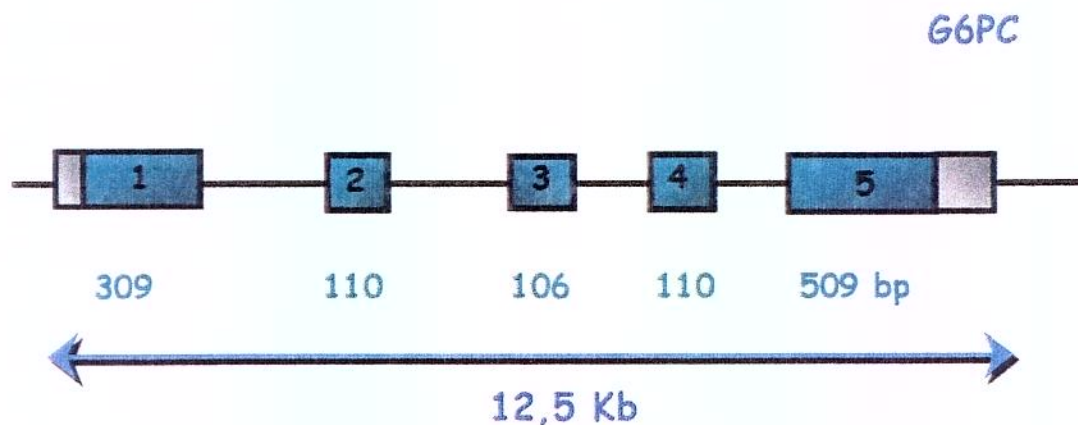


Figura 6 - Organização do gene G6PC que codifica a enzima glicose 6-fosfatase. Estão demonstrados os cinco exons que compõem o gene e o tamanho de cada um.

Mais de 50 mutações que afetam a atividade da G6Pase já foram descritas no gene G6PC. Algumas mutações são mais freqüentes, como as mutações R83C e Q347X na população americana e representam 70% dos alelos nos pacientes caucasianos portadores de GSDIa (LEI *et al.*, 1993; LEI *et al.*, 1995a).

A tabela 1 mostra as alterações encontradas no gene G6PC até o momento, incluindo mutações *missense* e *nonsense*, um polimorfismo, mutações que provocam alteração em sítio de *splicing*, deleções e inserções, enquanto a tabela 2 mostra a prevalência da maioria destas mutações no gene da G6Pase em pacientes de GSDIa caucasianos, chineses, hispânicos, japoneses, judeus e árabes (CHOU & MANSFIELD, 1999).

Tabela 1- Alterações encontradas no gene da G6Pase.

	MUTAÇÃO	AMINOÁCIDO		EXON	REFERÊNCIA
1	T ⁹³ → G	M5R	Met ⁵ → Arg	1	Trioche <i>et al.</i> , 2000
2	C ¹⁴⁹ → T	Q24X	Glu ²⁴ → stop	1	Rocha <i>et al.</i> , 2000
3	A ¹⁹² → T	D38V	Asp ³⁸ → Val	1	Chevalier-Porst <i>et al.</i> , 1996
4	T ²⁶⁶ → C	W63R	Trp ⁶³ → Arg	1	Stroppiano <i>et al.</i> , 1999
5	G ²⁶⁸ → A	W63X	Trp ⁶³ → stop	1	Lei <i>et al.</i> , 1995c
6	G ²⁸¹ → A	G68R	Gly ⁶⁸ → Arg	1	Sartorato <i>et al.</i> , 1998
7	G ²²⁸ → A	W50X	Trp ⁵⁰ → stop	1	Seydewitz & Matern, 1999
8	A ²⁴⁰ → C	Q54P	Glu ⁵⁴ → Pro	1	Trioche <i>et al.</i> , 1999
9	A ¹³⁸ → G	Q20R	Glu ²⁰ → Arg	1	Seydewitz & Matern, 1999
10	G ²⁸⁸ → A	W70X	Trp ⁷⁰ → stop	1	Trioche <i>et al.</i> , 1999
11	T ³⁰⁸ → C	W77R	Trp ⁷⁷ → Arg	1	Chevalier-Porst <i>et al.</i> , 1996
12	G ³⁰⁷ → C	K76N	Lys ⁷⁶ → Asn	1	Kozák <i>et al.</i> , 2000
13	A ⁴⁶ → G	T16A	Thr ¹⁶ → Ala	1	Wu <i>et al.</i> , 2000a
14	C ³²⁶ → T	R83C	Arg ⁸³ → Cys	2	Lei <i>et al.</i> , 1993
15	G ³²⁷ → A	R83H	Arg ⁸³ → Ile	2	Hwu <i>et al.</i> , 1995
16	G ³²⁰ → A	G81R	Gly ⁸¹ → Arg	2	Seydewitz & Matern, 1999
17	G ⁴⁰⁷ → A	E110K	Glu ¹¹⁰ → Lys	2	Chevalier-Porst <i>et al.</i> , 1996
18	T ⁴⁰² → C	T108I	Thr ¹⁰⁸ → Ile	2	Trioche <i>et al.</i> , 1999
19	C ⁴¹¹ → T	T111I	Thr ¹¹¹ → Ile	2	Trioche <i>et al.</i> , 2000
20	G ⁴⁴⁴ → A	G122D	Gly ¹²² → Asp	2	Akanuma <i>et al.</i> , 2000
21	A ³⁵⁶ → T	H119L	His ¹¹⁹ → Leu	3	Wu <i>et al.</i> , 2000b
22	G ⁴⁴⁹ → A	A124T	Ala ¹²⁴ → Thr	3	Chevalier-Porst <i>et al.</i> , 1996
23	T ⁵⁷⁶ → G	V166G	Val ¹⁶⁶ → Gly	4	Parvari <i>et al.</i> , 1995
24	C ⁵⁹⁵ → A	Y172X	Tyr ¹⁷² → stop	4	Stroppiano <i>et al.</i> , 1999
25	C ⁶¹¹ → T	P178S	Pro ¹⁷⁸ → Ser	4	Lei <i>et al.</i> , 1995b
26	G ⁶³⁰ → T	G184V	Gly ¹⁸⁴ → Val	4	Stroppiano <i>et al.</i> , 1999
27	G ⁶³⁰ → A	G184E	Gly ¹⁸⁴ → Glu	4	Chevalier-Porst <i>et al.</i> , 1996
28	G ⁶⁴¹ → A	G188S	Gly ¹⁸⁸ → Ser	4	Lei <i>et al.</i> , 1995b
29	C ⁵⁸⁷ → T	R170X	Arg ¹⁷⁰ → stop	4	Rake <i>et al.</i> , 1999
30	G ⁵⁴⁶ → T	W156L	Trp ¹⁵⁶ → Leu	4	Seydewitz & Matern, 1999
31	G ⁶⁴¹ → A	G188R	Gly ¹⁸⁸ → Arg	4	Trioche <i>et al.</i> , 1998
32	A ⁶¹⁵ → C	H179P	His ¹⁷⁹ → Pro	4	Akanuma <i>et al.</i> , 2000
33	T ⁵⁷⁶ → C	V166A	Val ¹⁶⁶ → Ala	4	Kozák <i>et al.</i> , 2000
34	G ⁸⁰⁰ → A	A241T	Ala ²⁴¹ → Thr	5	Trioche <i>et al.</i> , 2000
35	T ¹⁰⁴³ → C	F322L	Phe ³²² → Leu	5	Trioche <i>et al.</i> , 2000
36	G ⁸⁸⁷ → C	C270R	Cys ²⁷⁰ → Arg	5	Trioche <i>et al.</i> , 2000
37	^a T ¹¹⁷⁶ → C	L366S	Leu ³⁶⁶ → Ser	5	Lam <i>et al.</i> , 1998b
38	^b A ⁶⁵³ → G	Y192A	Tyr ¹⁹² → Ala	5	Lee <i>et al.</i> , 1996
39	T ⁷²¹ → C	L211P	Leu ²¹¹ → Pro	5	Chevalier-Porst <i>et al.</i> , 1996
40	G ⁷⁴³ → A	G222R	Gly ²²² → Arg	5	Stroppiano <i>et al.</i> , 1999
41	G ⁷⁴³ → C	G222R	Gly ²²² → Arg	5	Lei <i>et al.</i> , 1995c
42	T ⁷⁸⁵ → A	W236R	Trp ²³⁶ → Arg	5	Lei <i>et al.</i> , 1995c
43	C ⁸⁰³ → T	Q242X	Gln ²⁴² → stop	5	Lei <i>et al.</i> , 1995c
44	G ⁸⁸⁸ → T	G270V	Gly ²⁷⁰ → Val	5	Lei <i>et al.</i> , 1995c

	MUTAÇÃO	AMINOÁCIDO		EXON	REFERÊNCIA
45	C ⁹⁶² → T	R295C	Arg ²⁹⁵ → Cys	5	Lei <i>et al.</i> , 1993
46	C ⁸⁷¹ → A	N264K	Asn ²⁶⁴ → Lys	5	Keller <i>et al.</i> , 1998
47	T ⁹⁷¹ → C	S298P	Ser ²⁹⁸ → Pro	5	Stroppiano <i>et al.</i> , 1998
48	T ¹¹⁰¹ → A	I341N	Ile ³⁴¹ → Asn	5	Lee <i>et al.</i> , 1996
49	T ¹¹¹³ → G	L345R	Leu ³⁴⁵ → Arg	5	Lei <i>et al.</i> , 1995c
50	C ¹¹¹⁸ → T	Q347X	Gln ³⁴⁷ → stop	5	Lei <i>et al.</i> , 1994
51	G ⁸⁷⁶ → T	G266V	Gly ²⁶⁶ → Val	5	Rake <i>et al.</i> , 1999
52	G ¹⁰⁹¹ → T	V338F	Val ³³⁸ → Phe	5	Rake <i>et al.</i> , 1999

^aregião polimórfica; ^bprovavelmente um erro na sequência original e não uma mutação, uma vez que tem sido observada sistematicamente por pesquisadores em pacientes não portadores de GSD1a

	SÍTIO DE SPLICING	INTRON	REFERÊNCIA
1	G→A (-1) acceptor	1	Akanuma <i>et al.</i> , 2000
2	A→G (+4) doador	1	Chevalier-Porst <i>et al.</i> , 1996
3	G→A (+1) acceptor	4	Seydewitz <i>et al.</i> , 1999
4	G→T (+86) acceptor	4	Kajihara <i>et al.</i> , 1995

	DELEÇÃO/ INSERÇÃO	AMINOÁCIDO		EXON	REFERÊNCIA
1	79delC	-	Frameshift	1	Kozák <i>et al.</i> , 1998
2	158delC	35X	Frameshift	1	Lei <i>et al.</i> , 1993
3	175delGG	59X	Frameshift	1	Rake <i>et al.</i> , 1999
4	339delG	G87del	Frameshift	2	Lam <i>et al.</i> , 1997
5	341delG	I101X	Frameshift	2	Lam <i>et al.</i> , 1998b.
6	461del5	-	Frameshift	3	Kozák <i>et al.</i> , 1998
7	518delA/ 518insTG	203X	Frameshift	3	Stroppiano <i>et al.</i> , 1999
8	540del5	201X	Frameshift	4	Kozák <i>et al.</i> , 2000
9	872delC	300X	Frameshift	5	Trioche <i>et al.</i> , 2000
10	793delG	300X	Frameshift	5	Trioche <i>et al.</i> , 2000
11	1057delTTC	ΔF327	Frameshift	5	Lei <i>et al.</i> , 1993
12	867delA	300X	Frameshift	5	Rake <i>et al.</i> , 2000b
13	822delC	248WRAA	Frameshift	5	Lei <i>et al.</i> , 1995c
14	97insTGAA	11X	Frameshift	1	Stroppiano <i>et al.</i> , 1999
15	459insTA	130X	Frameshift	3	Lei <i>et al.</i> , 1993
16	813insG	254X	Frameshift	5	Chevalier-Porst <i>et al.</i> , 1996
17	813insG/ 822delC	CEQP245/ 248WRAA	Frameshift	5	Lei <i>et al.</i> , 1995c

Tabela 2 – Mutações no gene da G6Pase em pacientes caucasianos, chineses, hispânicos, japoneses, judeus e árabes com GSDIa.

<i>Mutações</i>	<i>Caucasianos</i>	<i>Chineses</i>	<i>Hispânicos</i>	<i>Japoneses</i>	<i>Judeus</i>	<i>Árabes</i>
158delC	7/144	-	-	-	-	-
D38V	5/144	-	-	-	-	-
W63X	2/144	-	-	-	-	-
W77R	1/144	-	-	-	-	-
309+4 A→G	1/144	-	-	-	-	-
R83C	43/144	1/32	5/18	-	32/34	2/6
R83H	1/144	12/32	-	-	-	-
341delG	-	1/32	-	-	-	-
E110K	2/144	-	-	-	-	-
E110Q	1/144	-	-	-	-	-
A124T	1/144	-	-	-	-	-
459insTA	-	-	9/18	-	-	-
V166G	-	-	-	-	-	4/6
P178S	-	-	1/18	-	-	-
G184E	2/144	-	-	-	-	-
G188S	2/144	-	-	-	-	-
G188R	3/144	-	-	-	-	-
L211P	1/144	-	-	-	-	-
G727T	-	3/32	-	21/22	-	-
G222R	2/144	-	-	-	-	-
W236R	-	-	1/18	-	-	-
Q242X	3/144	-	-	-	-	-
813insG	1/144	-	-	-	-	-
CEQP245-248WRAA	1/144	-	-	-	-	-
N264K	1/144	-	-	-	-	-
G270V	3/144	-	-	-	-	-
R295C	2/144	-	-	-	-	-
ΔF327	6/144	-	-	-	-	-
I341N	-	1/32	-	-	-	-
L345R	1/144	-	-	-	-	-
Q347X	46/144	-	-	-	2/34	-
Não-identificadas	6/144	14/32	2/18	1/22	-	-

Os dados são expressos por x/y, onde x é o número de alelos que contém mutação no gene da G6Pase e y o número total de alelos do gene da G6Pase analisados em um determinado grupo étnico. Cada indivíduo tem dois alelos do gene da G6Pase. As mutações prevalentes estão em negrito. Os dados desta tabela foram obtidos a partir de CHOU & MANSFIELD (1999).

A localização de novas mutações envolve o desenvolvimento de métodos nem sempre informativos, tais como o rastreamento das mutações, com diferentes técnicas como SSCP (*single-strand conformation polymorphism*), DGGE (*denaturing gradient gel eletrophoresis*), enzimas que clivam regiões 5' dos *loops* resultantes da conformação secundária do DNA em fita simples (*Cleavase I - Gibco*). Além disso, resulta difícil concluir que uma mutação é a causa da doença, isto é, se a troca na sequência de DNA modifica o fenótipo.

As mutações devem ser analisadas, segundo alguns critérios recomendados (COTTON & SCRIVER, 1998), a fim de que possam ser relacionadas a doença e distinguidas de simples artefatos, ou mesmo se seriam uma variação neutra (polimorfismo). Na doença de Von Gierke existe grande heterogeneidade nos fenótipos observados e uma correlação genótipo-fenótipo pode ser de grande ajuda para ajustes na dieta e estratégias de tratamento do paciente (RAKE *et al.*, 1999).

Outro ponto importante se refere às mutações que envolvem alterações em sítios de *splicing*, estas que representam 15% das mutações encontradas em doenças genéticas humanas (KRAWCZAK *et al.*, 1992). A natureza patológica de uma mutação pode, eventualmente ser visualizada por um produto anormal de transcrição. Mutações em regiões envolvidas em mecanismos de *splicing* podem gerar transcritos aberrantes, mesmo sem alterações envolvendo códons sinônimos, aquelas onde o aminoácido é conservado (RICHARD & BECKMAN, 1995).

2.5. DIAGNÓSTICO

O método mais eficaz atualmente utilizado para um diagnóstico definitivo de GSDIa, é a análise da atividade enzimática da glicose 6-fosfatase em microsossomos hepáticos intactos e rompidos, como está demonstrado na tabela 3. Porém este é um procedimento invasivo, que requer biópsia de fígado, já que a glicose 6-fosfatase não é normalmente expressa em outras células como fibroblastos da pele ou linfócitos (BURCHELL 1990). Por intermédio deste método é possível se detectar não só a deficiência da G6Pase, como também de um de seus outros sistemas de translocases envolvidos com a GSDI.

Tabela 3 – Análise da atividade da G6Pase em microsossomos de fígado humano.

	Microsossomos intactos		Microsossomos rompidos	
	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	K_m (mM)	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	K_m (mM)
Glicose 6-fosfato como substrato				
Valores controle	0,2	2	0,4	1
Caso 1: GSDIa	0	ND	0	ND
Caso 2: GSDIb	0	ND	0,5	1
Caso 3: GSDIc	0,1	7	0,5	1
Pirofosfato como substrato				
Valores controle	0,1	2	0,3	1
Caso 1: GSDIa	0	ND	0	ND
Caso 2: GSDIb	0,1	3	0,3	1
Caso 3: GSDIc	0	ND	0,3	2

ND = não detectável. Para diferenciar entre os vários tipos de GSDI, é necessário medir a atividade enzimática da G6Pase em microsossomos rompidos e intactos usando pelo menos dois tipos de substrato. Os ensaios e os cálculos cinéticos foram feitos de acordo com BURCHELL *et al.* 1988. Exemplos de dados obtidos de três pacientes de GSDI foram comparados com valores normais. A atividade da G6Pase em microsossomos rompidos é a medida de sua atividade sem as limitações impostas pelas proteínas de membrana.

A clonagem do cDNA da G6Pase e a caracterização do gene humano correspondente, possibilitaram o rastreamento de mutações que causam GSDIa, o que permite a introdução de um diagnóstico não-invasivo baseado em técnicas de biologia molecular. Pode-se então diagnosticar precocemente pacientes, ajudando no prognóstico da doença por meio de amostras de sangue, pele ou em caso de teste pré-natal através de vilosidade coriônica (PARVARI *et al.*, 1997).

O diagnóstico de glicogenose tipo Ia e Ib pode ser baseado em anormalidades clínicas e bioquímicas combinado com análise de mutações ao invés de ensaios enzimáticos feitos através de biópsia de fígado. Sintomas como hepatomegalia, hipoglicemia e acidose láctica são os mais marcantes em pacientes com GSDI, enquanto que os portadores de GSDIb sofrem não só dos sintomas descritos anteriormente, como também de infecções bacterianas recorrentes e inflamações intestinais, devido a neutropenia e disfunção dos neutrófilos. A figura 7 mostra um fluxograma diagnóstico para GSDIa e GSDIb baseado em RAKE *et al.* (2000a). Se o paciente sofre de neutropenia e disfunção dos neutrófilos, mutações no gene da glicose 6-fosfato translocase (G6PT1) devem ser excluídas primeiro. Contudo, deve-se ter em mente que especialmente nos pacientes jovens de GSDIb, estas características específicas não são obrigatórias. Se, pelo menos duas mutações em heterozigose forem encontradas nos genes G6PC ou G6PT1, a análise da atividade enzimática em biópsia de fígado não é mais necessária para se estabelecer um diagnóstico definitivo de GSDIa ou GSDIb. Porém se não forem encontradas mutações em nenhum dos dois genes, deve-se fazer um teste de tolerância a glicose. Observa-se nos pacientes com GSDI queda da concentração de lactato no sangue em um curto espaço de tempo. Portanto se a suspeita de GSDI permanecer, ensaios enzimáticos em tecido hepático devem ser feitos. O diagnóstico baseado em análise de DNA requer pelo menos duas mutações. Consequentemente, o diagnóstico de GSDIa e Ib não deve ser estabelecido oficialmente se somente uma mutação no gene G6PC ou G6PT1 for encontrada. Contudo, as chances de ser uma doença semelhante a GSDIa ou Ib são praticamente zero. Portanto deve-se discutir para cada paciente individualmente se com uma única mutação em heterozigose identificada há necessidade ou não de se fazer uma biópsia de fígado para estabelecer um diagnóstico definitivo.

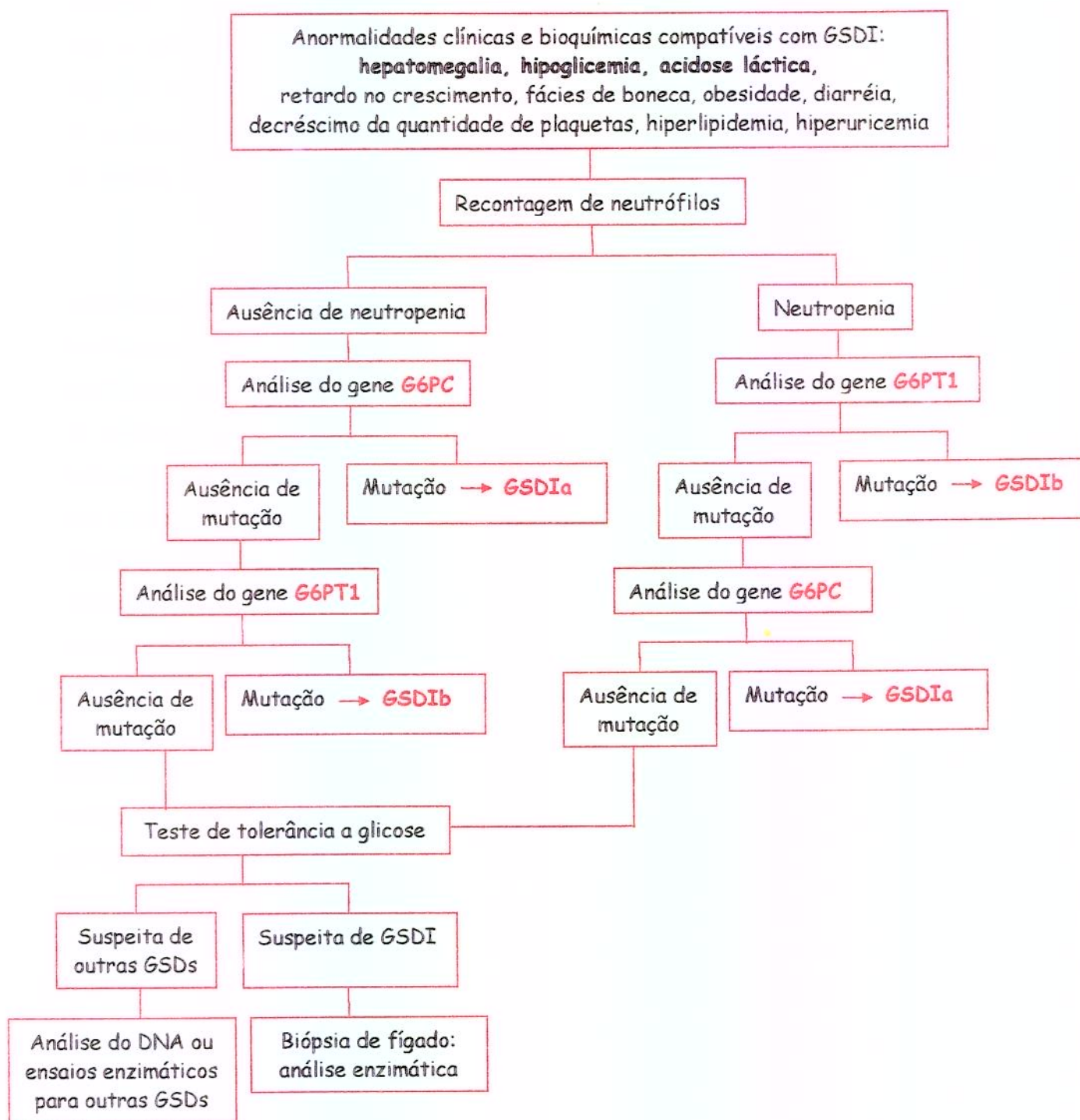


Figura 7 – Fluxograma para o diagnóstico das glicogenoses tipo Ia e Ib.

O diagnóstico bioquímico da glicogenose tipo III pode ser obtido pela análise do glicogênio leucocitário ou por meio da observação da enzima bifuncional deficiente no fígado e/ou músculo. A análise em fibroblastos de pele e linfócitos também têm sido utilizados para a análise qualitativa da enzima, permitindo a observação da ausência ou de baixos níveis da proteína nestes tecidos (DING *et al.*, 1990; BROWN *et al.*, 1982).

2.6. TRATAMENTO

O tratamento atualmente aplicado a pacientes com GSDI consiste em infusão nasogástrica noturna de glicose e administração de amido de milho cru, com o objetivo de prevenir a hipoglicemia e suas consequências bioquímicas (WOLFSDORF & CRIGLER, 1997). Ambos os tratamentos aliviam significativamente as anormalidades metabólicas da glicogenose tipo Ia, melhorando muito seu prognóstico. Contudo a base do processo patológico continua sem tratamento, e como resultado, complicações de longo prazo se desenvolvem em pacientes adultos. Além disso, a eficácia do tratamento a base de dieta é freqüentemente limitado devido à falta de complacência de alguns pacientes.

Uma alternativa a esses tratamentos é a terapia gênica somática. Essa técnica foi recentemente demonstrada e se dá por meio da administração de um vetor adenoviral recombinante contendo o gene normal da G6Pase de camundongos (Ad-mG6Pase), em camundongos com deficiência no gene da glicose 6-fosfatase (G6Pase^{-/-}) que manifestaram sintomas característicos de GSDIa em humanos. Alcançou-se uma proporção de sobrevivência de 100% quando camundongos G6Pase^{-/-} foram tratados com Ad-mG6Pase, e dentre esses 90% sobreviveram até os três meses de idade. A atividade hepática da G6Pase em camundongos impregnados com Ad-mG6Pase foi restaurada em 19%, persistindo por setenta dias. A administração do vetor adenoviral também melhorou o crescimento dos camundongos G6Pase^{-/-} e normalizou as taxas de glicose plasmática, o colesterol, triglicerídeos e ácido úrico. Além disso, o fígado se apresentou com níveis de depósito de glicogênio próximo do normal, sugerindo que essa doença em humanos pode vir a ser corrigida por terapia gênica (ZINGONE *et al.*, 2000).

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo a determinação de mutações em exons e introns do gene da G6Pase em indivíduos portadores de glicogenose tipo Ia e por intermédio da construção de minigenes foram analisadas mutações que poderiam estar provocando alterações em sítio de *splicing* do gene. Esta técnica permite a observação da formação de alelos nulos pela deleção de exons ou por retenções intrônicas na sequência por meio do estudo dos transcritos produzidos (KAJIHARA *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 1997; KUIVENHOVEN *et al.*, 1996).

II. Objetivos

Objetivo geral

- ◆ Identificação de mutações em exons e introns do gene da glicose 6-fosfatase, responsável pela glicogenose tipo Ia (Doença de Von Gierke).

Objetivo específico

- ◆ Identificação de mutações que alteram os sítios de *splicing* do gene da G6Pase, por meio da construção de minigenes.

III. Material e Métodos

1. CASUÍSTICA

Foram estudados 46 indivíduos provenientes de 26 famílias, entre eles 27 pacientes com quadro clínico sugestivo de glicogenose tipo Ia. Quatorze pacientes foram provenientes do Ambulatório de Erros Inatos do Metabolismo – Hospital de Clínicas-Unicamp, onze do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Serviço de Genética Médica e dois do Instituto da Criança – Unidade Genética, Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina USP.

Em apenas quatro dos 27 pacientes estudados (pacientes nº 24, 26, 27 e 51) foi realizado o estudo bioquímico da atividade da G6Pase através de biópsia hepática, confirmando o diagnóstico de GSDIa. A tabela 4 mostra os dados clínicos dos pacientes em que foram encontradas mutações.

Tabela 4 - Dados clínicos dos pacientes em que foram encontradas alterações.

Paciente	6	11	14	24*	25*
Sexo	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino
Idade de início	3 meses	5 meses	2 meses	7 meses	6 meses
Idade atual	9 anos	4 anos	9 anos 2 meses	6 anos	5 anos
Consanguinidade	Ausente	Primos 2º grau	Primos 1º grau	Primos 3º grau	Primos 3º grau
Biópsia hepática	Compatível com GSD tipo I, sem análise enzimática.	Compatível com GSD tipo I, sem análise enzimática.	Compatível com GSD tipo I, sem análise enzimática.	Atividade da enzima G6Pase não detectada. Estrutura lobular preservada, hepatócitos com aumento de volume, citoplasma repleto com hiperglicogenização nuclear. Esteatose macro e micronodular	Não realizada
Triglicédeos	525	713	1011	1539	1545
Colesterol	221	259	390	243	291
Glicemia	44	64	59	69	70
Ácido úrico	7,3	8,8	6,6	NI	7,4
Enzimas hepáticas	TGP-15, TGO-13	ALT-111, AST-49, TGP-122, TGO-258	TGP-140, TGO-113,	TGP-133, TGO-150	TGP-100, TGO-104
Sinais e sintomas	Hepatomegalia, hipoglicemia hipouricemia, hiperlipidemia e fígado de boneca.	Hepatomegalia, hipoglicemia hipouricemia, hiperlipidemia, fígado de boneca, crises convulsivas, retardo do crescimento, sonolência intensa e sudorese aos 9 meses. retardo do DNPM.	Hepatomegalia, hipoglicemia hipouricemia, hiperlipidemia e fígado de boneca.	Hepatomegalia, hipoglicemia neonatal, acidose láctica, fígado de boneca, retardo no crescimento, hiperlipidemia, hipouricemia, alterações de função hepática.	Hepatomegalia, hipoglicemia neonatal, acidose láctica, fígado de boneca, retardo no crescimento, hiperlipidemia, hipouricemia, alterações de função hepática.

DNPM - desenvolvimento neuro-psicomotor; NI - não informado; *Pacientes provenientes do Hospital das Clínicas de Porto Alegre - RS; As pacientes 24 e 25 são irmãs.

Tabela 4 (continuação) - Dados clínicos dos pacientes em que foram encontradas alterações.

Pacientes	26*	27*	32*	41	51*
Sexo	Masculino	Feminino	Feminino	Masculino	Feminino
Idade de início	4 meses	39 anos	NI	3 anos	4 meses
Idade atual	6 anos	51 anos	NI	24 anos	1 ano
Consanguinidade	Primos 3º grau	Primos 1º grau	NI	Primos 1º grau	Ausente
Biópsia hepática	Compatível com GSD tipo I, atividade da enzima G6Pase não detectada.	Compatível com GSD tipo I, atividade da enzima G6Pase não detectada.	Não realizada.	Compatível com GSD tipo I, sem análise enzimática.	Compatível com GSD tipo I, atividade da enzima G6Pase não detectada.
Triglicérides	2503	NI	NI	783	1265
Colesterol	560	NI	NI	254	NI
Glicemia	123	NI	NI	64	NI
Ácido úrico	10,6	NI	NI	NI	6,5
Enzimas hepáticas	TGP- 33; TGO-80	NI	NI	NI	NI
Sinais e sintomas	Hepatomegalia. hipoglicemia, acidose láctica, crises convulsivas, retardo do DNPM, hiperlipidemia, hiperuricemia.	Hepatomegalia, acidose láctica, hiperlipidemia, hiperuricemia, nefromegalia, uveíte não-granulomatosa bilateral anterior.	Hepatomegalia, hipoglicemia, hipotrigliceridemia, baixa estatura.	Hepatomegalia, hipoglicemia, convulsões na infância, adenoma hepático.	Hepatomegalia, hipoglicemia, acidose láctica, crises convulsivas, fácies de boneca, hiperuricemia, hiperlipidemia.

DNPM – desenvolvimento neuro-psicomotor; NI- não informado; * Pacientes provenientes do Hospital das Clínicas de Porto Alegre – RS.

Valores normais para referência:

Triglicerídeos: até 150mg/dl. Enzimas hepáticas:

Colesterol: até 200mg/dl. Transaminase oxalacética (TGO) – 12 a 46 UI/ml.

Glicemia: 65 a 105mg/dl. Transaminase piruvica (TGP) – 3 a 5 UI/ml.

Ácido úrico: 2,4 a 5,7mg/dl. Aspartato aminotransferase (AST) – até 128 UI/ml.

Alanino aminotransferase (ALT) – até 40 UI/ml.

2. MÉTODOS

2.1. ESTRATÉGIA UTILIZADA

Após o prévio rastreamento de alterações nos exons do gene G6PC, foram pesquisadas as regiões intrônicas flanqueadores dos exons no gene. Uma vez encontrada uma mutação intrônica, foram construídos minigenes contendo seqüências isoladas do DNA genômico dos pacientes e clonadas em um vetor de expressão para análise do mRNA produzido, a fim de se pesquisar se essas alterações provocam erros em mecanismos de *splicing*.

Os exons foram amplificados dois a dois, com o respectivo intron reproduzindo a seqüência observada no gene do paciente. Por intermédio do tamanho do mRNA formado, foi analisado se este provocava alguma alteração nos sítios de *splicing*. As figuras 8 e 9 à seguir esquematizam a estratégia utilizada na construção de minigenes e na clonagem desses minigenes no vetor de expressão pSVL.

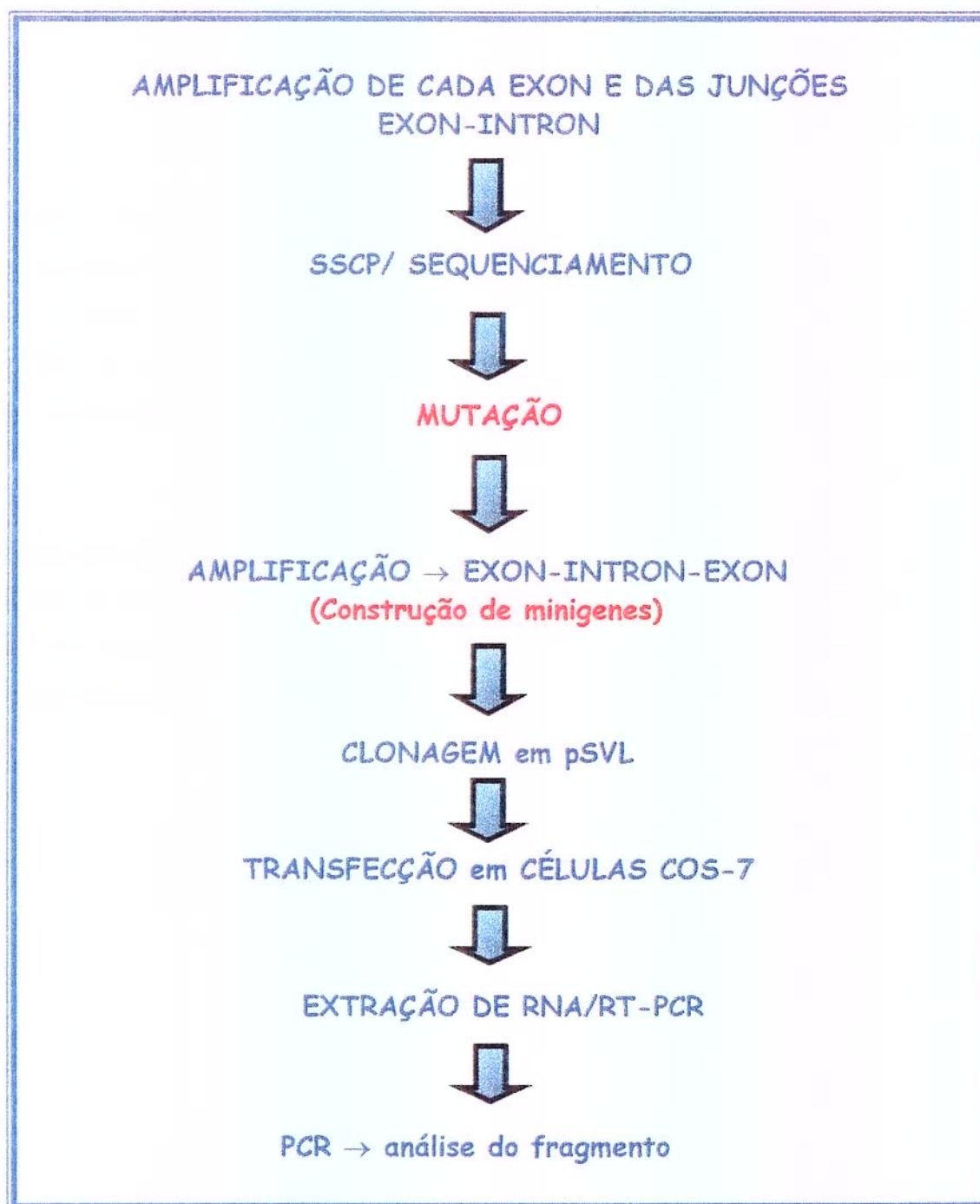


Figura 8- Estratégia seguida para construção de minigenes e detecção de alterações no mecanismo de *splicing* do gene da G6Pase.

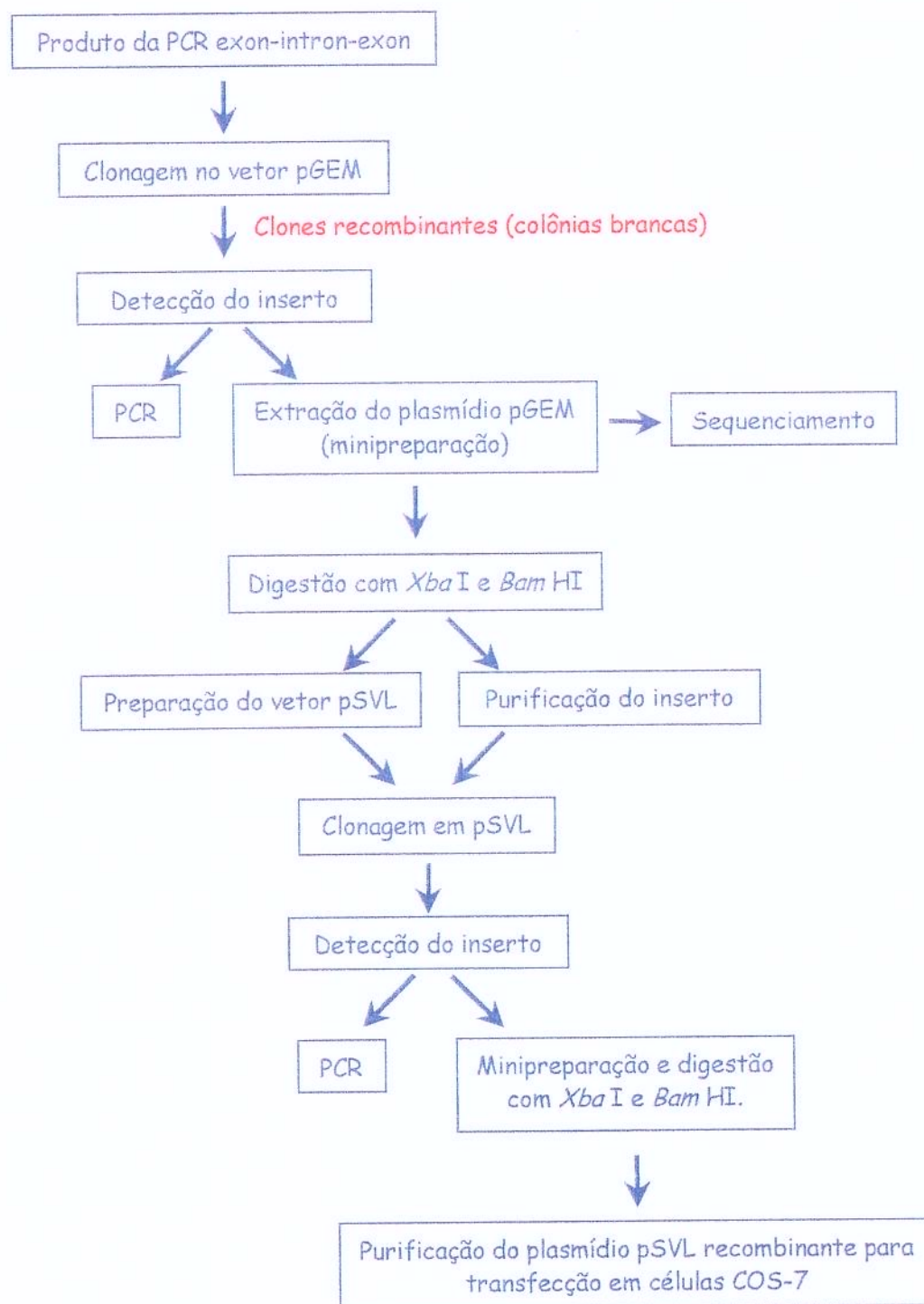


Figura 9 - Esquema das etapas de clonagem do minigene no vetor pSVL.

2.2. DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS

A. EXTRAÇÃO DE DNA DE SANGUE PERIFÉRICO

O DNA dos pacientes foi extraído segundo método descrito por WOODHEAD *et al.* (1986), com algumas modificações. Foram coletados 10ml de sangue periférico, em tubos à vácuo (*Vacutainer*) contendo 0,5ml de EDTA 10% como agente anti-coagulante.

Ao sangue coletado, adicionou-se 35ml da solução A que é composta de: Triton-100X 1%, $MgCl_2$ 5mM, sacarose 0,32M e Tris-HCl 10mM pH 8,0. A mistura foi colocada em gelo por 30 minutos para que as hemácias fossem lisadas. Centrifugou-se a 2500 rpm por 10 min a 4°C e retirou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o *pellet* novamente em 20ml de solução A, agitando-se por inversão até o *pellet* se desprender do fundo do tubo, centrifugou-se novamente por 15 minutos a 2500 rpm, o sobrenadante foi desprezado. As etapas de lise foram repetidas várias vezes até o *pellet* estivesse limpo (livre dos restos de hemácias lisadas).

Continuando o procedimento, ressuspendeu-se o *pellet* em 1ml de solução B, 2X concentrada (Na_2EDTA 20 mM; NaCl 20 mM; Tris-HCl 20 mM pH 8,0) e adicionou-se 250µl de solução C preparada na hora. A solução C é composta de: 50% da solução B, 50% de SDS 10% e 1mg de Proteinase K (Boehringer Mannheim, Germany). Incubou-se em banho-maria a 37°C durante a noite. Após a incubação, tratou-se a solução com 1,25ml de fenol saturado com tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0, agitou-se por inversão por 5 minutos e centrifugou-se a 2500 rpm por 10 minutos. Em seguida, retirou-se a camada aquosa e repetiu-se a extração. Retirou-se a fase superior que, após a segunda extração de fenol foi tratada com clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1.

O DNA foi precipitado adicionando-se 0,1 volumes de acetato de sódio 3M, pH 5,5 e 2 volumes de etanol absoluto. O precipitado de DNA foi retirado da solução com auxílio de um bastão e, lavou-se com etanol 70% para eliminar o excesso de sal. O DNA foi dissolvido em quantidade apropriada (200-500µl) de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA

1 mM pH 8,0) e a concentração foi determinada por leitura de absorção óptica a 260nm em espectrofotômetro.

B. ANÁLISE DO GENE G6PC:

1. AMPLIFICAÇÃO DOS EXONS DO GENE G6PC A PARTIR DE DNA GENÔMICO

Cada um dos 5 exons do gene da G6Pase foi amplificado pela técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase), utilizando-se os *primers* cujas seqüências são mostradas na tabela 5. A figura 10 indica a localização de cada *primer* e o tamanho dos produtos de amplificação na seqüência do gene. O ciclo utilizado é mostrado na figura 11 e a reação de amplificação se deu nas seguintes condições:

- ◆ 500ng de DNA genômico
 - ◆ 5µl de tampão de PCR 10X (Tris-HCl 200mM pH8,4; KCl 500mM; MgCl₂ 1,5mM)
 - ◆ 0,2mM dNTPs
 - ◆ 0,1µg de cada *primer* (direto e inverso)
 - ◆ 2,5U/µl de enzima *Taq* polimerase
- para um volume final de reação de 50µl.

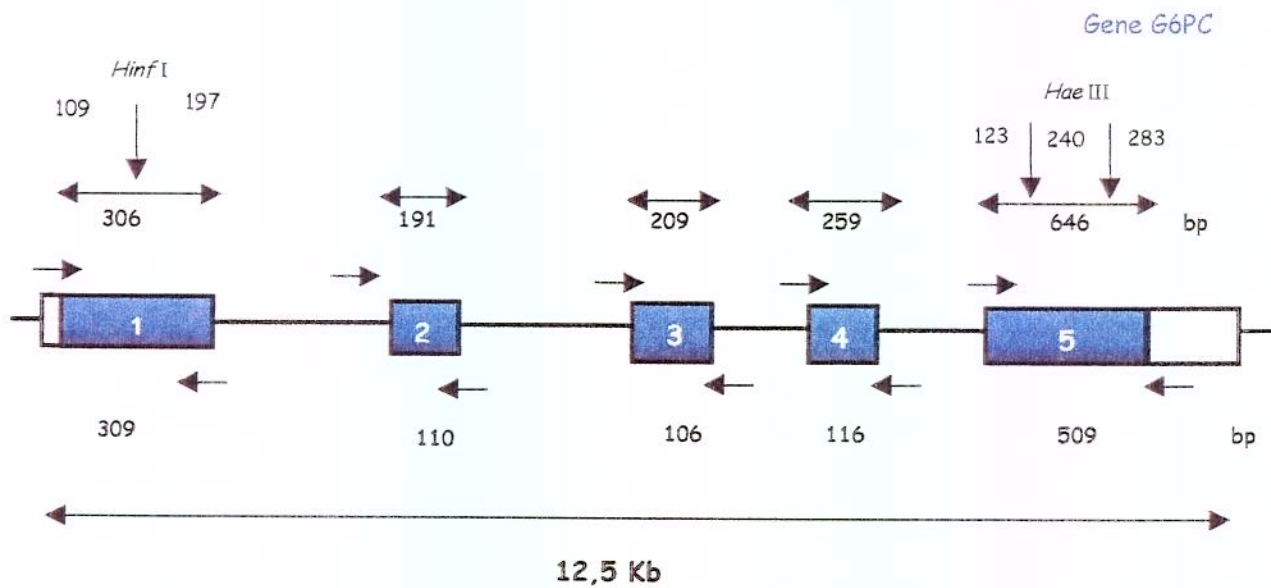


Figura 10 – Posição dos *primers* utilizados na amplificação de cada exon do gene G6PC. Tamanho da região codificante (abaixo) e tamanho dos fragmentos de amplificação (acima).

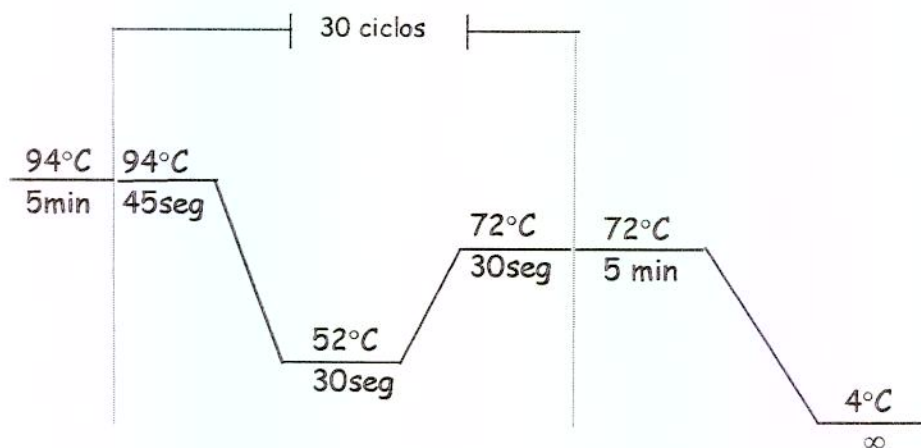


Figura 11 - Ciclo utilizado na amplificação dos exons do gene da G6Pase.

Tabela 5 - Sequência dos *primers* usados para amplificação de cada exon e tamanho dos fragmentos obtidos.

Exon	Sequência dos <i>primers</i> (5'→3')	Enzima	Fragmentos (bp)
1	VGD-1 TCT GCT GAC ATC TTC CT VGR-1 GCC TCT TTT CTT GCT GA	<i>Hinf</i> I	Total 306 Digerido:109+197
2	VGD-2 GCA TTC ATT CAG TAA CCC VGR-2 TCC ACT CAG CTT CTG TCT	-	191
3	VGD-3 CAC CTT TAC TCC ATT CTC VGR-3 GTG GTG TGT CAG CTA CA	-	209
4	VGD-4 GCC AGG CTC CAA CAT TT VGR-4 GGA GAG AAA CGG AAT GG	-	259
5	VGD-5 CTT CCT ATC TCT CAC AG VGR-5 TCA CTT GCT CCA AAT ACC	<i>Hae</i> III	Total: 646 Digerido:123+240+283

Os *primers* acima foram baseados em LEI *et al.* 1993.

2. DETECÇÃO DE MUTAÇÕES POR ANÁLISE DA CONFORMAÇÃO DA FITA SIMPLES: (SSCP - SINGLE-STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM)

Os exons do gene da G6Pase foram amplificados utilizando-se os *primers* listados na tabela 5. Os exons 1 e 5 foram digeridos com as enzimas de restrição *Hinf* I e *Hae* III à fim de produzir fragmentos com tamanhos inferiores a 300bp.

A análise dos fragmentos pela técnica de PCR-SSCP foi inicialmente descrita por ORITA *et al.* (1989) e foi realizada utilizando-se géis de poliacrilamida 10% contendo 10% de glicerol (PAGE-polyacrilamide gel eletrophoresis) ou géis pré-moldados (*PhastGel*) para o sistema *Phast System* (Pharmacia LKB), ambos com subsequente coloração com prata.

Para os géis manuais foram utilizadas placas 165mm X 140mm. Os géis apresentavam a seguinte composição:

- ♦ 15ml de glicerol 20%
- ♦ 7,5ml de acrilamida/bisacrilamida 40%
- ♦ 0,6ml de TAE 50X (Tris-Acetato-EDTA)
- ♦ para um volume final de 30ml.

Para a polimerização adicionou-se 192µl de persulfato de amônio 10% e 38,5µl de TEMED. Foram aplicados 5µl do produto de reação com 5µl de *stop solution* (formamida 95%, 20 mM de EDTA pH 8,0 e 0,05% de azul de bromofenol) no gel que foi submetido à eletroforese com 225V por 6 horas em tampão TAE 1X e temperatura aproximada de 20°C. Os géis no sistema manual foram corados pela prata da seguinte forma:

- a) Fixação - 10% etanol; 0,5% ácido acético, por 20 minutos à temperatura ambiente.
- b) Impregnação - solução de nitrato de prata 0,15 %, por 10 minutos.
- c) Lavagem com 200 ml de água destilada.
- d) Revelação - 6g NaOH, 1,2 ml de formaldeído, completar o volume para 200ml
- e) Interrupção - repetir solução de fixação.

Os géis no sistema *Phast System* foram corados pela prata da seguinte forma:

- a) Etanol 10% e ácido acético 0,5% por 1.5 min a 40°C;
- b) Solução de nitrato de prata 0,2%, dissolvida em solução de etanol 10% e ácido acético 0,5% por 8 min a 40°C;
- c) Água MilliQ (2X) por 0,2 min a 20°C;
- d) Solução de hidróxido de sódio 2% com 100µl/ml de formaldeído por 5 min a 20°C;
- e) Etanol 10% e ácido acético 0,5% por 2 min a 40°C;
- f) Solução de glicerol 10% por 5 min a 40°C.

Ao se utilizar géis pré-moldados de 12,5% com tampão nativo (L-alanina 0,88M; Tris 0,25M, pH8,8) foi necessário se fazer uma pré-corrida. As condições de corrida foram entre 150 e 300 Vh na temperatura de 4°C. Para géis pré-moldados de 20% utilizou-se tampão SDS (tricina 0,20M; Tris 0,20M; SDS 0,55%, pH8,1), sem pré-corrida e nas mesmas condições do gel de 12,5%.

Após a secagem dos géis à temperatura ambiente, realizou-se a análise visual do padrão de migração de bandas.

3. SEQUENCIAMENTO

Para análise das mutações mais frequentes (R83C e Q347X) foram feitos os sequenciamentos dos exons 2 e 5. Também foram sequenciados alguns exons de determinados pacientes que apresentavam alterações pela técnica de SSCP, *shifts* de bandas que poderiam indicar a presença de mutações. Sequências flanqueadoras dos introns de todos os pacientes também já foram sequenciadas a fim de se localizar mais mutações intrônicas que poderiam ser responsáveis pelo fenótipo do paciente.

Utilizou-se para o sequenciamento o kit *Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing kit* (Amersham), que se baseia no método de terminação de cadeia usando didesoxinucleotídeos (ddNTP) descrito por SANGER *et al.* (1977). Foram utilizados 10µl do produto da PCR, sendo 5µl para cada uma das reações (direta e inversa). Cada 5µl do produto de amplificação foi previamente tratado com Exonuclease I e com Fosfatase alcalina. A reação contendo 5µl do produto de PCR, 1µl de Exonuclease I (10U/µl) e 1µl de Fosfatase alcalina (2U/µl) foi incubada à 37°C por 15 minutos. A seguir, as enzimas foram inativadas por aquecimento a 80°C por 15 minutos. O ciclo utilizado durante a reação de sequenciamento está mostrado na figura 12 e a mistura de reação foi feita como se descreve a seguir:

- ◆ 7µl da reação de pré-tratamento do produto da PCR
- ◆ 1µl do *primer* 2pmoles/µl (direto ou inverso)
- ◆ 2µl de tampão (260mM Tris-HCl, pH 9,5; 65mM MgCl₂)
- ◆ 2µl da enzima *Thermo Sequenase* (4U/µl).
- ◆ 8µl de H₂O

Foram distribuídos 4,5µl dessa reação para cada um dos 4 tubos contendo a mistura de terminação que é composta de:

- ◆ 2µl dGTP *termination master mix* (7,5µM dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
- ◆ 0,5µl do respectivo ddNTP marcado com $\alpha^{33}\text{P}$:
- ◆ ddGTP - 0,3µM [$\alpha^{33}\text{-P}$] ddGTP (1500Ci/mmol, 450µCi/ml), 11,25µCi
- ◆ ddATP - 0,3µM [$\alpha^{33}\text{-P}$] ddATP (1500Ci/mmol, 450µCi/ml), 11,25µCi
- ◆ ddTTP - 0,3µM [$\alpha^{33}\text{-P}$] ddTTP (1500Ci/mmol, 450µCi/ml), 11,25µCi
- ◆ ddCTP - 0,3µM [$\alpha^{33}\text{-P}$] ddCTP (1500Ci/mmol, 450µCi/ml), 11,25µCi

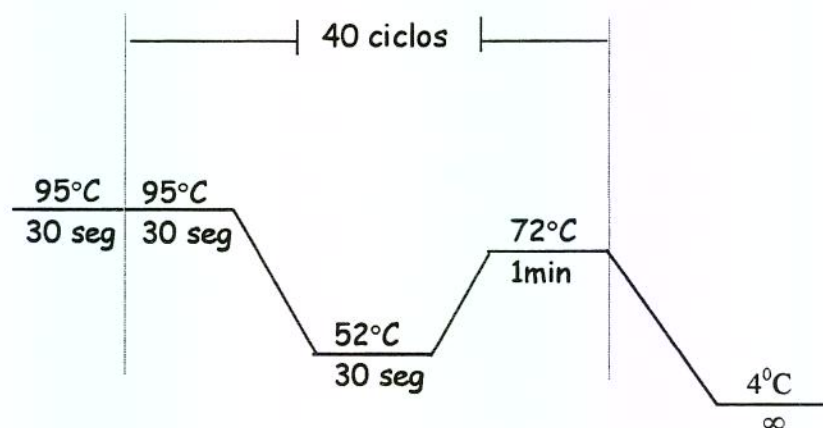


Figura 12 – Ciclo utilizado na reação de sequenciamento.

Após os ciclos, foram acrescentados 4µl de *stop solution* (95% formamida, 20mM EDTA, 0,05% azul bromofenol, 0,05% xileno cianol). Para o sequenciamento foram utilizados géis de poliacrilamida a 6% com a seguinte composição:

- ◆ 7,5ml de acrílamida/bisacrílamida 40%
- ◆ 6,0ml de TBE 10X
- ◆ 25,2g de uréia
- ◆ H₂O para um volume final de 60ml.

Para a polimerização acrescentou-se 500 μ l de persulfato de amônio (10%) e 50 μ l de TEMED (Pharmacia). Os géis foram montados em placas de 42cm x 33,5cm e 39,5cm x 33,5cm. A placa maior foi tratada com *Repel Silane* (Pharmacia) para que o gel ficasse aderido a placa menor. Entre as placas foram utilizados espaçadores com a espessura de 0,4 mm.

As amostras foram previamente desnaturadas a 95°C por 5 minutos e 3 μ l foram aplicados no gel de sequenciamento que foi submetido às seguintes condições de eletroforese: 1700V, 50W e 25mA. O tempo de corrida foi variável de acordo com o tamanho de cada fragmento a ser sequenciado.

O gel aderido à placa menor foi retirado com um papel 3MM e secado a vácuo por 1 hora a 80°C, sendo posteriormente exposto usando filme sensível (Kodak Biomax) por aproximadamente 24 horas.

4. ESTUDO DO POLIMORFISMO T1176C:

O exon 5 foi amplificado usando-se os *primers* da tabela 5. O produto de 647bp foi digerido com a enzima *Dra* I. Na presença da base T o fragmento é digerido apresentando bandas em gel de agarose de 572 e 75bp. Na presença da base C o produto não é digerido. O resultado da análise de restrição foi verificado em gel de agarose 1,5%. A digestão foi feita a 37°C por duas horas como descrito a seguir:

- ◆ 17 μ l da PCR
- ◆ 1 μ l da enzima *Dra* I (10U/ μ l)
- ◆ 2 μ l de tampão (10mM Tris-HCL; 10mM MgCl₂; 0,1mg/ml BSA).

5. AMPLIFICAÇÃO DOS INTRONS DO GENE G6PC A PARTIR DE DNA GENÔMICO:

Para a amplificação e posterior sequenciamento dos quatro introns foram desenhados e sintetizados *primers* cujas seqüências e o tamanho dos produtos de amplificação são mostrados na tabela 6. A figura 13 indica o tamanho dos introns e a localização de cada *primer* na seqüência do gene. A reação de PCR se deu nas seguintes condições:

- ◆ 500ng de DNA genômico
- ◆ 5µl de tampão 10X (Tris-HCl 50mM pH8,0; KCl 50mM; 1mM DTT, 0,1mM EDTA)
- ◆ 1µl de MgSO₄ 50 mM
- ◆ 1,5µl de primer 10µM cada
- ◆ 1,5µl de dNTPs 5mM
- ◆ 0,5µl da Platinum *Pfx* DNA polimerase 2,5U/µl (Gibco)
- ◆ para um volume final de reação de 50µl

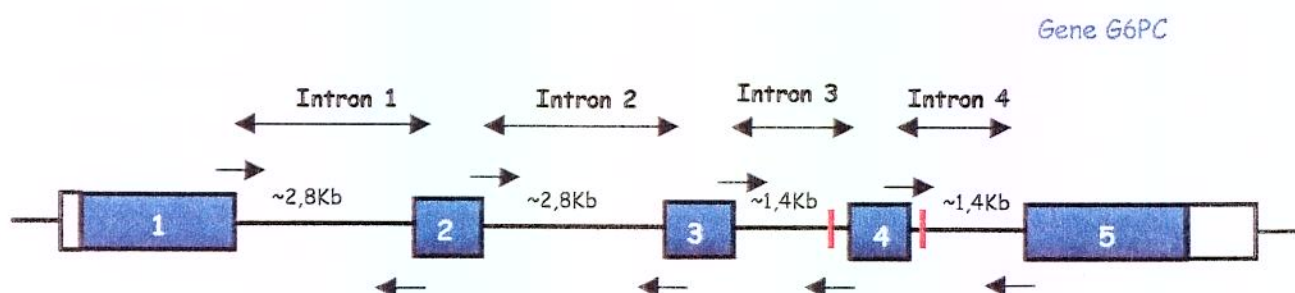
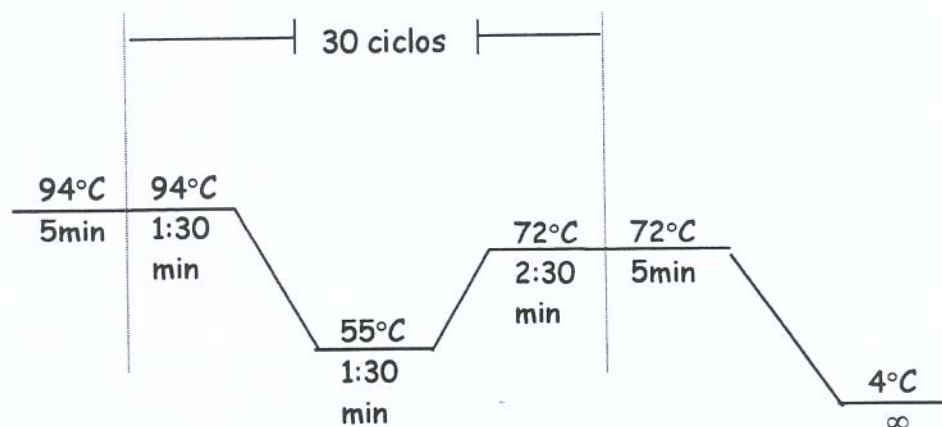


Figura 13 – Posição dos *primers* utilizados na amplificação de cada intron do gene G6PC e tamanho dos introns em quilo bases. As barras vermelhas indicam a posição das mutações no intron 3 (IVS3-58T>A) do paciente 11 e no intron 4 (IVS4+10G>A) do paciente 6.

Tabela 6 - Sequência dos *primers* usados para amplificação de cada intron e tamanho dos fragmentos obtidos.

Intron	Sequência dos <i>primers</i> (5' → 3')	Fragmentos (bp)
1	INT1F- GGA GAC TGG CTC AAC CTC G INT1R- CAC CAG TAT GGA CGC TGT CC	~2860
2	INT2F- GCA GTT CCC TGT AAC CTG INT2R- AGT ATA CAC CTG CTG TGC C	~2874
3	INT3F- CAG GGA AAG ATA AAG CCG INT3R- GCT GCA CAG CCC AGA AT	~1500
4	INT4F- GTG CTT GAA TGT CAT TTT GTG GTT GGG INT4R- GAG GCT ACA ATA GAG CTG AGG CGG AAT	~1860

O ciclo utilizado na reação de PCR dos introns é mostrado na figura 14.

**Figura 14** - Ciclo utilizado na amplificação dos introns do gene da G6Pase.

C. CONSTRUÇÃO DOS MINIGENES

1. AMPLIFICAÇÃO EXON-INTRON-EXON DO GENE G6PC A PARTIR DE DNA GENÔMICO

A partir do DNA genômico dos pacientes 11 e 6, nos quais foram previamente encontradas mutações no intron 3 e no intron 4 do gene da G6Pase (figura 13), foi feita a amplificação pela técnica de PCR da sequência exon3-intron3-exon4 e exon4-intron4-exon5 utilizando-se os *primers* MIN3F4 e MIN3R4, e V11F e V12R respectivamente (tabela 7). Esses *primers*, possuem alterações de dois nucleotídeos para criação de sítios de restrição de *Xba* I e *Bam*H I no fragmento amplificado, possibilitando a clonagem direcional no vetor pSVL (Pharmacia).

Para a reação de PCR utilizou-se primeiramente a enzima *Taq* DNA polimerase (Gibco), porém esta inseriu vários erros na sequência por não possuir atividade editorial, os quais foram detectados pelo sequenciamento do clone. Passou-se a usar então a enzima *Pfx* DNA polimerase (Gibco) por possuir maior processividade e fidelidade, além de sua atividade exonucleásica 3'→5'.

Tanto a reação de PCR, quanto o ciclo utilizado, foram os mesmos descritos anteriormente para a amplificação dos introns (figura 14), somente mudando a temperatura de anelamento dos *primers*, que foi de 58°C para o minigene 3 e 65°C para o minigene 4. O tempo para extensão de ambos os fragmentos foi de 2 minutos.

Tabela 7 - Sequência dos *primers* usados para construção de minigenes e para verificação da presença de inserto nos plasmídios pGEM e pSVL e o tamanho dos fragmentos obtidos.

Exon-Intron-Exon	Sequência dos <i>primers</i> (5' → 3')	Fragmento (pb)
Exon3-Intron3-Exon4	MIN3F4 - CCA TGG GCA CAG CAG GT C * TAG ACT AC MIN3R4 - CTG ACG GAT T CCA GCA ACA ACT TGA TG	~ 1600
Exon4-Intron4-Exon5	V11F - GGG ATT CT A GAC TGT GCA GCT GAA TGT CTG V12R - CTG GG TTT CTC CAG GAT CCA CAG GAG GTC	~ 1650
pGEM	T7 - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG SP6 - TAT TTA GGT GAC ACT ATA G	~ 1756 c/ inserto 126 s/ inserto
pSVL	PSVLF - TCA CTG CAT TCT AGT TGT GGT PSVLR - CTT CTG CTC TAA ACC GGA TC	~ 1716 c/ inserto 86 s/ inserto

*As bases em vermelho são aquelas que foram alteradas da sequência normal para a criação dos sítios de restrição de *Xba* I e *Bam*H I.

Os *primers* diretos, apresentam sítios para a enzima *Xba* I e os *primers* inversos para a enzima *Bam*H I. Dessa forma, o fragmento amplificado pode ser ligado ao vetor direcionalmente e em uma cadeia aberta de leitura correta, o que pode ser observado na figura 15. Somente os *primers* usados para amplificação do intron 4 foram obtidos de KAJIHARA *et al.* (1995), os *primers* para o intron 3 foram desenhados por nós.

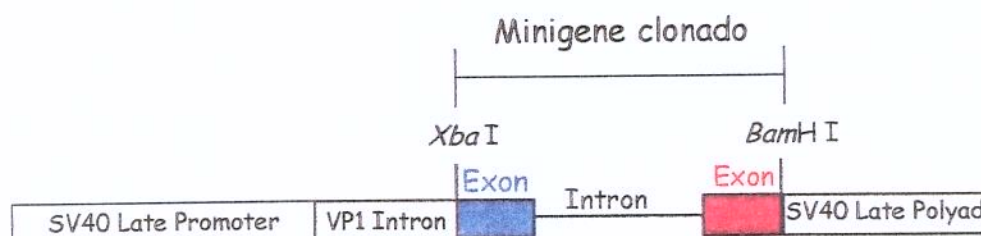


Figura 15 - Um detalhe do vetor de expressão pSVL mostrando seus sítios de restrição para *Xba* I e *Bam*H I e o fragmento clonado.

2. CLONAGEM NO VETOR pGEM

Devido à dificuldade encontrada na clonagem do inserto em pSVL, optou-se por uma clonagem inicial apenas do minigene 4 em pGEM, para obtenção de grandes quantidades de inserto e para uma digestão *Xba* I/*Bam*H I mais otimizada para depois proceder-se a clonagem em pSVL.

O Kit *pGEM-T Easy Vector System* (Promega), que usa como vetor o plasmídeo pGEM, permite a clonagem direta de produtos da PCR sem a necessidade de digestão e purificação. A ligação utilizando o pGEM, foi feita a 4°C durante a noite da seguinte maneira:

- ◆ 5µl de tampão 2x *Rapid Ligation*
- ◆ 1µl da enzima T4 DNA ligase (3U//µl)
- ◆ 0,5µl do vetor pGEM (50ng/µl)
- ◆ 3,5µl de produto da PCR

Após a reação de ligação foi necessário fazer com que o plasmídeo contendo o fragmento de interesse (minigene 4) fosse introduzido em células competentes DH5α descritas por HANAHAN (1983). A preparação de células competentes para transformação foi feita a partir da técnica descrita por NISHIMURA *et al.* (1991). As soluções utilizadas estão na tabela 8 e a preparação das células competentes consistiu das seguintes etapas:

1. A partir de uma única colônia de *E. Coli* a cultura foi cultivada a 37°C em 5ml de meio LB líquido durante à noite;
2. Diluiu-se 1:100 em 10ml de TYM;
3. Incubou-se a 37°C até alcançar a O.D.₆₀₀ = 0,2 - 0,6. (O.D.= densidade óptica);
4. Colocou-se num recipiente com 40ml de TYM;
5. Incubou-se a cultura a 37°C em 50ml até atingir O.D.₆₀₀ = 0,5 - 0,9;
6. Colocou-se em um recipiente com 200ml de TYM;
7. Incubou-se novamente a 37°C em 250ml até atingir a O.D.₆₀₀ = 0,6;

8. Resfriou-se rapidamente em banho de gelo por 10min;
9. Centrifugou-se por 15min a 4.200 rpm e 4°C em recipientes gelados;
10. O *pellet* foi ressuspensão gentilmente em 100ml de TBF1 gelado;
11. Centrifugou-se novamente por 8min a 4.200 rpm e 4°C em recipientes gelados;
12. As células foram então ressuspensas em 10ml de TBF2 gelado;
13. Alíquotas de 100µl foram armazenadas a - 80°C.

Tabela 8 – Soluções utilizadas na preparação das células competentes.

TYM (g/l)	TBF1(g/l)	TBF2 (g/l)
1,5ml MgSO ₄ 1M	0,3g Kac 5M	0,02g MOPS 1M pH 7.0
2,5g de Triptona	3,2ml KCl 3M	750µl CaCl ₂ 1M
5g de meio LB (20g/l)	1ml CaCl ₂ 1M	33µl KCl 3M
-	17,2ml glicerol 15%	1,75ml de glicerol 15%
Autoclavar	Filtrar	Autoclavar
Completar para 250ml	Completar para 100ml	Completar para 10ml

O processo de transformação consistiu basicamente de choque térmico, como é descrito a seguir:

1. Adicionou-se 5µl de ligação a 100µl de células competentes DH5α;
2. Incubou-se em gelo por 30 - 60min;
3. Colocou-se em banho à 42°C por 1min;
4. Colocou-se imediatamente em gelo por 2min;
5. Acrescentou-se 950µl de meio LB líquido;
6. Incubou-se a 37°C por 1hora sob agitação;
7. 200 a 300µl das células transformadas foram espalhadas em placas contendo 20ml de meio LB ágar e ampicilina (25mg/ml). Foram espalhados nas placas 14µl de Xgal (50mg/ml) e 50µl de água destilada antes de serem semeadas as células transformadas.

A ampicilina serve como marca de seleção das colônias que foram transformadas com êxito e que contêm o plasmídeo, podendo ser recombinantes ou não. O vetor pGEM possui também o gene da β -galactosidase, o que permite selecionar além das colônias transformadas, aquelas em que o plasmídeo possui o fragmento de interesse. Através da utilização de um composto análogo a lactose, conhecido como Xgal, as colônias recombinantes foram visualizadas e desenvolveram cor branca e as não recombinantes cor azul.

As colônias recombinantes foram selecionadas, e as bactérias recombinantes foram colocadas para crescer em agitador com 5ml de meio LB líquido e 10 μ l de ampicilina (25mg/ml) durante 12 horas a 37°C. As que cresceram foram analisadas para ver se continham o plasmídeo recombinante. Os plasmídios podem ser extraídos por minipreparação e depois digeridos ou os insertos podem ser detectados pela técnica da PCR.

3. IDENTIFICAÇÃO DO INSERTO

Para identificar a presença do inserto nas colônias brancas selecionadas, este foi amplificado pela técnica da PCR, utilizando *primers* específicos para o vetor pGEM (tabela 7). Após a detecção da colônia recombinante, o plasmídeo foi extraído em pequena escala e posteriormente digerido com *Xba* I e *Bam*H I para liberação do inserto para clonagem no vetor pSVL.

3.1. AMPLIFICAÇÃO DO INSERTO DIRETAMENTE DAS COLÔNIAS DE BACTÉRIAS RECOMBINANTES

A reação de PCR para detectar a presença do inserto no vetor pGEM foi feita da seguinte maneira:

- ♦ 2,75µl de tampão Gibco PCR 10X (Tris-HCl 200mM pH8,4; KCl 500mM)
- ♦ 1,0µl MgCl₂ 50mM
- ♦ 0,275µl dNTPs 5mM
- ♦ 1,1µl do mix de *primers* $\begin{cases} 0,25\mu\text{l primer T7 } 20 \text{ pMOL}/\mu\text{l} \\ 0,25\mu\text{l primer SP6 } 20 \text{ pMOL}/\mu\text{l} \end{cases}$
- ♦ 0,5µl de enzima *Taq* polimerase
- ♦ para um volume final de reação de 25µl.

O DNA plasmidial foi colocado diretamente dentro do tubo de PCR, através de uma alçada na colônia recombinante. O ciclo demonstrado a seguir na figura 16 foi usado na reação de amplificação do inserto.

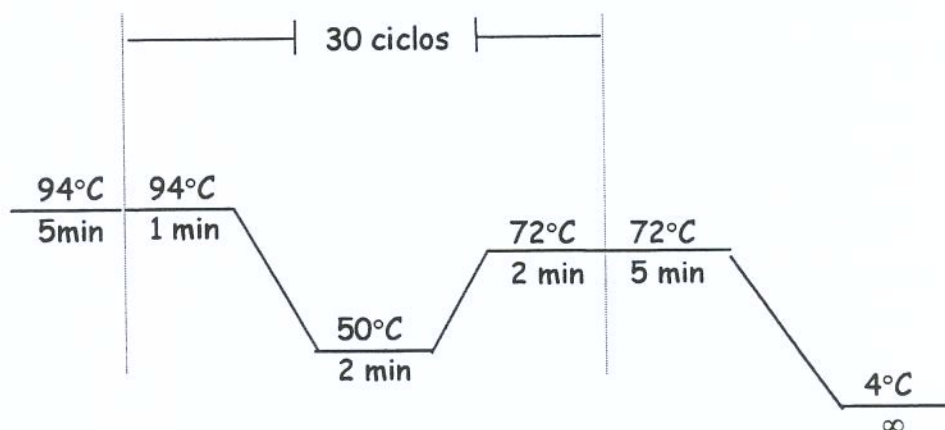


Figura 16 - Ciclo usado na reação de amplificação do inserto.

3.2. EXTRAÇÃO DE PLASMÍDIO EM PEQUENA ESCALA (MINI-PREPARAÇÃO)

As soluções utilizadas para extração de plasmídios em pequena escala estão listadas na tabela 9. A minipreparação foi feita de acordo com as seguintes etapas:

1. 1,5ml de cultura de bactérias foram centrifugados por 2 min;
2. Foi descartado o sobrenadante;
3. Agitou-se em vortex e adicionou-se 100µl de solução 1;
4. Agitou-se em vortex e deixou-se 5min à temperatura ambiente;
5. Foram adicionados 200µl de solução 2;
6. Agitou-se por inversão e deixou-se a temperatura ambiente por 5min exatos;
7. Foram adicionados 150µl de solução 3;
8. Agitou-se por inversão e incubou-se em banho de gelo por 5min;
9. Centrifugou-se por 5min (12-14.000 rpm);
10. O sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo;
11. No novo tubo adicionou-se 450µl de fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico (25:24:21);
12. Agitou-se em vortex e centrifugou-se por 5min;
13. Retirou-se a fase aquosa e transferiu-se para outro tubo;
14. Adicionou-se 1ml de etanol absoluto e deixou-se à temperatura ambiente por 2min;
15. Centrifugou-se por 10min e descartou-se o sobrenadante;
16. Foram adicionados 500µl de etanol absoluto e centrifugou-se 5min;
17. Descartou-se o sobrenadante e deixou-se secar à temperatura ambiente;
18. Foram adicionados 30µl de TE 1X com RNase (1µl de RNase 100µg/ml em 1000µl TE1X).

Tabela 9 – Soluções utilizadas na minipreparação de plasmídios.

Solução 1	Solução 2	Solução 3
2,5ml de glicose 1M	1ml de SDS 20%	11,5ml ác. acético
1ml de EDTA 0,5M	400µl de NaOH	60ml de KAc 5M
0,625ml de Tris – HCl pH8 2M	Completar com H ₂ O para 20ml	Completar com H ₂ O para 100ml
Completar com H ₂ O para 50ml		

Após a extração do plasmídeo recombinante, este foi sequenciado para confirmação da inserção dos sítios de restrição de *Xba* I e *Bam*H I pelos *primers* mutantes e para verificar se tratava-se do inserto realmente desejado. O sequenciamento foi realizado utilizando-se os *primers* T7 e SP6, descritos na tabela 7.

4. PREPARAÇÃO DO VETOR pSVL E DO INSERTO PARA CLONAGEM

Tanto o vetor pSVL (Pharmacia - LKB) quanto o inserto foram previamente digeridos com *Bam*H I e *Xba* I e purificados para a ligação. A figura 17 mostra o mapa do vetor de expressão pSVL e seus sítios de clonagem. A digestão e purificação do vetor e do inserto foram feitas de acordo com o seguinte protocolo:

Inserto	Plasmídeo
♦ 17µl da minipreparação	♦ 4µl de pSVL (500µg/ml)
♦ 2µl tampão react 2 10X	♦ 2µl tampão react 2 10X
♦ 1µl <i>Xba</i> I 2u/µl	♦ 1µl <i>Xba</i> I 2u/µl
♦ 20µl Volume final	♦ Completar para 20µl

Incubação a 37°C por 2 horas e posterior digestão com *Bam*H I:

Inserto e plasmídeo

- ♦ 20µl da digestão com *Xba* I 2u/µl
- ♦ 2µl de NaCl 0,5M
- ♦ 1µl de *Bam*H I 25u/µl
- ♦ 2µl tampão react 3 10X
- ♦ Completar volume para 40µl

Todo o volume da digestão foi aplicado em gel de agarose 1,5% com tampão de corrida TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) e brometo de etídio para excisão de banda do plasmídeo e do inserto a fim de que pudessem ser purificados utilizando o kit *ConcertTM Rapid Gel Extraction System* (Gibco BRL).

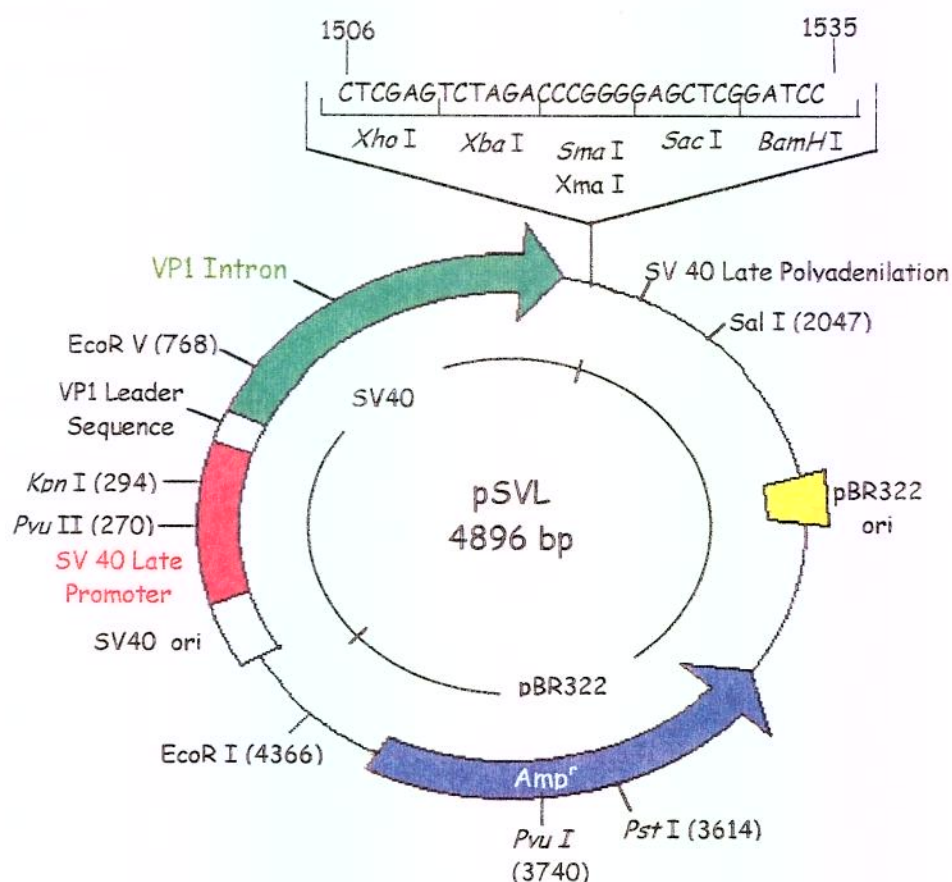


Figura 17 - Mapa do vetor de expressão pSVL.

5. CLONAGEM NO VETOR pSVL

Após a purificação e quantificação em gel de agarose do plasmídeo pSVL e do inserto pôde-se calcular em nanogramas a quantidade de inserto a ser usada na ligação. A quantificação do plasmídeo foi feita usando-se um marcador de peso molecular quantitativo, o *Low DNA Mass Ladder* (GIBCO BRL), e a quantidade de inserto foi calculada usando-se a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{ng vetor} \times \text{tamanho (Kb) inserto}}{\text{tamanho (Kb) vetor}} \times 3 = \text{quantidade de inserto em ng}$$

A ligação do plasmídeo pSVL ao inserto (minigene 3 contendo mutação no intron 3 e minigene 4 contendo mutação no intron 4), foi testada com e sem a purificação de ambos após a digestão. As quantidades do vetor pSVL e do inserto a serem colocadas na reação mudam de acordo com a concentração e tamanho dos mesmos. A reação de ligação utilizada é descrita abaixo:

- ◆ 3µl tampão 5x (250mM Tris-HCl, 50mM MgCl₂, 5mM ATP, 5mM DTT)
 - ◆ 1µl de enzima T4 DNA ligase 1U/µl (Gibco)
 - ◆ 1µl do vetor pSVL 40ng/µl
 - ◆ 5µl de inserto 10ng/µl
- } Ambos previamente digeridos

A transformação foi feita como descrito anteriormente para o plasmídeo pGEM (item 2). Porém o vetor pSVL somente pode ser selecionado através do gene de resistência a ampicilina (Amp^r), o que dificulta ainda mais a seleção de colônias recombinantes.

6. IDENTIFICAÇÃO DO INSERTO NO VETOR pSVL PELA TÉCNICA DA PCR DIRETAMENTE DAS COLÔNIAS

A reação de PCR foi feita utilizando-se para isso *primers* específicos para o vetor pSVL (tabela 7) como descrito a seguir:

- ◆ 5µl de tampão Gibco PCR 10X (Tris-HCl 200mM pH8,4; KCl 500mM)
- ◆ 1,5µl MgCl₂ 50mM
- ◆ 5µl dNTPs 2mM
- ◆ 0,2µg de cada *primer* (direto e inverso)
- ◆ 2,5U de enzima *Taq* polimerase
- ◆ para um volume final de reação de 50µl.

O DNA plasmidial foi colocado diretamente dentro do tubo de PCR, através de uma alçada na colônia recombinante.

O ciclo usado na reação de amplificação do inserto, foi igual ao usado para a amplificação de introns (figura 14), mudando-se apenas a temperatura de anelamento para 58°C. Foram rastreadas 200 colônias para o minigene 4 e 50 colônias para o minigene 3.

7. EXTRAÇÃO DE PLASMÍDIO

O plasmídeo foi extraído das colônias recombinantes selecionadas e uma pequena alíquota foi digerida com *Xba* I e *Bam*H I para mais uma confirmação da presença ou não do inserto. Os plasmídios recombinantes foram extraídos e purificados através do Kit *GFX™ Micro Plasmid Prep Kit* (Amershan Pharmacia), para o posterior experimento de transfecção.

8. CULTURA DE CÉLULAS COS-7

As células COS-7 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Carlos Frederico Martins Menck, do Departamento de Microbiologia, ICB, USP. Estas células são fibroblastos de macaco (células CV-1) transformadas pelo vírus SV40 que é deficiente na região de origem de replicação. Elas expressam o antígeno T constitutivamente e quando transfectadas com um vetor contendo uma origem de replicação normal para SV40, têm todos os outros genes virais necessários para gerar múltiplas cópias do vetor, proporcionando altos níveis de expressão (GLUZMAN *et al.*, 1981).

Após obtenção de células confluentes em garrafas de 25cm², estas foram retiradas utilizando-se solução de tripsina (0,5 ml por 5 minutos) para o desgarramento das células. Foram colocados 5ml de soro fetal bovino (SFB) para a inativação da tripsina e posteriormente 20ml de meio DMEM (*Dulbeco's modified Eagle Medium* - Cultilab) contendo 10% de SFB (Cultilab). Homogeneizou-se o material distribuindo-se cerca de 10ml dessa mistura para cada garrafa de 25cm². Incubou-se em estufa seca a 37°C. No dia seguinte o meio de cultura foi trocado por meio novo. Após a obtenção de vários tubos com células confluentes, estas foram congeladas até que o experimento de transfecção tivesse

início. Para isso foi utilizado um meio de congelamento contendo glicerol (Nutricell) e o congelamento das células foi feito da seguinte forma:

1. As culturas foram tripsinizadas, com imediata inibição por SFB;
2. Centrifugou-se à 1.000 rpm por 5min;
3. Retirou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 1ml de meio de congelamento;
4. Armazenou-se a -70°C em ampolas de congelamento até a necessidade de utilização.

9. TRANSFEÇÃO DO PLASMÍDIO PSVL RECOMBINANTE EM CÉLULAS COS-7

A transfecção em células COS-7 foi feita através da técnica de co-precipitação por CaCl_2 e utilizou-se para isso o Kit *Calcium Phosphate Transfection System* (Life Technologies). As células COS-7 foram plaqueadas 24 horas antes e incubadas a 37°C em estufa contendo 5% de dióxido de carbono. O meio das células foi trocado 3 horas antes da transfecção e a concentração do plasmídeo pSVL transfectado que deu melhores resultados foi de $2,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Foram utilizados $25\mu\text{l}$ do plasmídeo nesta concentração para um volume final de $430\mu\text{l}$. A técnica de transfecção foi feita de acordo com as seguintes etapas:

1. Utilizou-se 1ml da solução de suspensão de fosfato de cálcio e DNA para cada placa de células de 100mm. Esta solução foi feita da seguinte forma:
 - a) Preparou-se 0,5ml de 1X HBS (HEPES, NaCl) no momento do uso para cada placa de 100mm. Para preparar 1ml de HBS 1X foram adicionados 0,885ml de H_2O estéril à 0,1ml de 10X HBS em um tubo estéril e misturou-se bem. Adicionou-se a esta solução $15\mu\text{l}$ de solução de NaOH e homogeneizou-se.
 - b) Foram utilizados dois tubos estéreis para cada amostra de DNA que foi precipitado. Adicionou-se ao **tubo 1**, 0,5ml de 1X HBS e $10\mu\text{l}$ de solução de fosfato (fosfato de sódio mono e dibásicos). Ao **tubo 2** adicionou-se 0,43ml de H_2O estéril menos um volume Y (volume do DNA carreador = DNA de espermatozóide de salmão) e menos um volume Z (volume de DNA plasmidial).

DNA: A quantidade total de DNA carreador mais DNA plasmidial deve ser igual a 20µg;

DNA carreador: 20µg de DNA carreador menos X µg de DNA plasmidial = total de µg do DNA carreador;

DNA plasmidial: O volume de DNA plasmidial (volume Z) utilizado foi de 25µl (2,5µg/µl). Portanto:

$$0,43\text{ml H}_2\text{O} - (\text{volume Y} + \text{volume Z}) \leq 20\mu\text{g}$$

- c) Adicionaram-se os DNAs ao **tubo 2** misturando-os gentilmente com a H₂O.
 - d) Adicionou-se ao **tubo 2** 10µl da solução de cálcio e misturou-se gentilmente adicionando-se posteriormente mais 50µl da mesma solução.
 - e) Uma pipeta estéril de 1ml foi colocada no **tubo 1** e borbulhou-se gentilmente ar para dentro da solução para que esta pudesse se misturar lentamente.
 - f) A solução contendo os DNAs (carreador e plasmidial) e cálcio do **tubo 2** foi pipetada e adicionada lentamente ao **tubo 1**, enquanto o ar era borbuhlado simultaneamente na solução do **tubo 1**. Após a mistura das duas soluções observou-se a formação de um precipitado branco.
 - g) A suspensão foi deixada em temperatura ambiente por 20 minutos.
2. O precipitado foi misturado com uma pipeta até que estivesse totalmente ressuspendido e a suspensão foi adicionada à placas com cultura de células contendo 10ml de meio DMEM com 10% de soro fetal bovino.
 3. As placas contendo o precipitado foram deixadas na estufa a 37°C de 10 à 24 horas.
 4. O meio com o precipitado foi removido e adicionou-se meio novo que foi deixado por 24 horas.
 5. O meio foi removido e as células COS-7 raspadas da placa com uma espátula estéril para extração do RNA mensageiro.

10. ISOLAMENTO DE MRNA TOTAL

Após 48 horas da transfecção, as células COS-7 foram raspadas da placa de cultura com o auxílio de uma espátula e ressuspensas no próprio meio DMEM. Uma alíquota da suspensão celular foi colocada em tubo de microcentrífuga e centrifugada até formar *pellet*. A partir daí deu-se início a extração de RNA mensageiro total, transcrito a partir dos minigenes 3 e 4 contendo a sequência normal e mutante clonadas no plasmídio pSVL. Foi utilizado o Kit *QuickPrep Micro mRNA Purification* (Amershan) que durante a extração já separa o RNA total do RNA mensageiro total através de uma coluna de oligo(dT). As etapas da extração do RNA são descritas a seguir:

1. Uma alíquota da suspensão celular foi centrifugada até formar *pellet* e depois retirou-se o sobrenadante.
2. Adicionou-se 0,4ml de tampão de extração (solução aquosa contendo tiocianato de guanidina e N-lauroil sarcosina) às células, agitando-se até obter uma solução homogênea.
3. Diluiu-se a amostra acrescentando-se 0,8ml de tampão de eluição (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) e agitou-se o tubo.
4. Centrifugou-se cada amostra por 1 minuto e colocou-se de 1 à 1,5ml do homogeneizado celular sobre o *pellet* de oligo(dT) – celulose (25mg/ml).
5. O tubo foi fechado e invertido para ressuspender o oligo(dT), misturando-se gentilmente por 3 minutos.
6. Centrifugou-se o tubo por 10 segundos a 14.000rpm e removeu-se o sobrenadante com pipeta.
7. Adicionou-se 1ml de *High Salt Buffer* (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0,5 M NaCl) e ressuspendeu-se o oligo(dT)-celulose por inversão.
8. Centrifugou-se por 10 segundos e removeu-se o sobrenadante com pipeta. Repetiu-se a mesma lavagem por 4 vezes.
9. Adicionou-se 1ml de *Low Salt Buffer* (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0,1 M NaCl) ao *pellet* de oligo(dT) e ressuspendeu-se por inversão.

10. Centrifugou-se por 10 segundos e removeu-se o sobrenadante com pipeta. Repetiu-se a mesma lavagem mais uma vez.
11. Ressuspendeu-se a resina em 300µl de *Low Salt Buffer* e transferiu-se para uma coluna de microcentrífuga que foi colocada dentro de um tubo de microcentrífuga de 2ml. Centrifugou-se 5 segundos a 14.000 rpm.
12. Descartou-se o que passou para o tubo de 2ml e a coluna foi recolocada no tubo. Adicionou-se 500µl de *Low Salt Buffer*. Repetiu-se este passo por mais duas vezes.
13. A coluna foi removida e recolocada sobre tubo de microcentrífuga estéril. Adicionou-se 200µl de tampão de eluição pré-aquecido a 65°C sobre a resina.
14. Centrifugou-se por 5 segundos a 14.000rpm e a coluna foi removida. O tubo contendo o RNA mensageiro foi armazenado em freezer -70°C até a sua utilização.

11. SÍNTESE DE cDNA

A reação de síntese do cDNA a partir dos mRNAs extraídos foi feita utilizando-se o Kit *ThermoScript RT-PCR System* (Gibco BRL). Foram sintetizados cDNAs usando-se oligo(dT) como *primer*. Na reação foram colocados 4µl de mRNA de cada amostra que apresentou uma concentração variável de 1 a 2µg/µl. A reação foi feita de acordo com as etapas descritas a seguir:

1. Em um tubo de 0,2ml foram colocados:

- ♦ 1µl de oligo(dT)₂₀ 50µM
- ♦ 4µl de RNA 1µg/µl
- ♦ 5µl de H₂O DEPC

A reação foi incubada por 5 minutos a 65°C e colocada em seguida em banho de gelo.

2. Enquanto isso preparou-se a reação abaixo em gelo:

- ◆ 4µl de tampão de cDNA 5X (250 mM Tris-acetato, 375 mM de acetato de potássio, 40mM de acetato de magnésio)
- ◆ 1µl de DTT 0,1M
- ◆ 1µl de RNaseOUT 40U/µl
- ◆ 2µl de dNTPs 10mM
- ◆ 1µl da enzima ThermoScript RT 15U/µl
- ◆ 1µl de H₂O DEPC

3. Pipetou-se a reação acima e colocou-se em cada tubo no gelo contendo oligo(dT) e RNA mensageiro, obtendo-se um volume final de 20µl.

4. As amostras foram colocadas em máquinas pré-aquecidas e incubadas a 55°C por 45 minutos e 85°C por 5 minutos. Adicionou-se 1µl de RNase H (2U/µl) e incubou-se a 37°C por 20 minutos.

5. O cDNA foi armazenado a -20°C até ser utilizado para amplificação pela técnica da PCR.

12. AMPLIFICAÇÃO DOS MINIGENES A PARTIR DO CDNA

Os cDNAs correspondentes aos transcritos dos minigenes 3 e 4, controle normal e mutante, foram amplificados utilizando-se *primers* cujas seqüências e os tamanhos de amplificação são mostrados na tabela 10, os *primers* V6F e V4R foram descritos por KAJIHARA *et al.* (1995). Os tamanhos dos fragmentos de amplificação do transcrito normal e mutante foram comparados com o objetivo de analisar se as mutações intrônicas clonadas provocavam ou não alteração de sítio de *splicing*. O ciclo utilizado na reação de PCR está representado na figura 18. A reação de amplificação se deu nas condições descritas a seguir:

- ♦ 1µl de cDNA
- ♦ 5µl de tampão de amplificação *Pfx* 10X (Tris-HCl 50mM pH8,0; KCl 50mM; 1mM DTT, 0,1mM EDTA)
- ♦ 1µl de MgSO₄ 50 mM
- ♦ 1,0µl de cada primer 10µM
- ♦ 1,0µl de dNTPs 10mM
- ♦ 0,2µl da Platinum *Pfx* DNA polimerase 2,5U/µl (Gibco)
- ♦ para um volume final de reação de 50µl.

Tabela 10 - Seqüência dos *primers* usados para amplificação dos fragmentos transcritos e tamanho dos fragmentos obtidos.

Minigene	Seqüência dos <i>primers</i> (5'→ 3')	Fragmentos (bp)
3	V3F- ACT ACG TGA TGG TCA CAT CT V3R- CAG CAA CAA CTT GAT GAG GA	171
4	V6F- GTC GTG CAG CTG AAT GTC TG V4R- TCC AGA GTC CAC AGG AGG TC	236

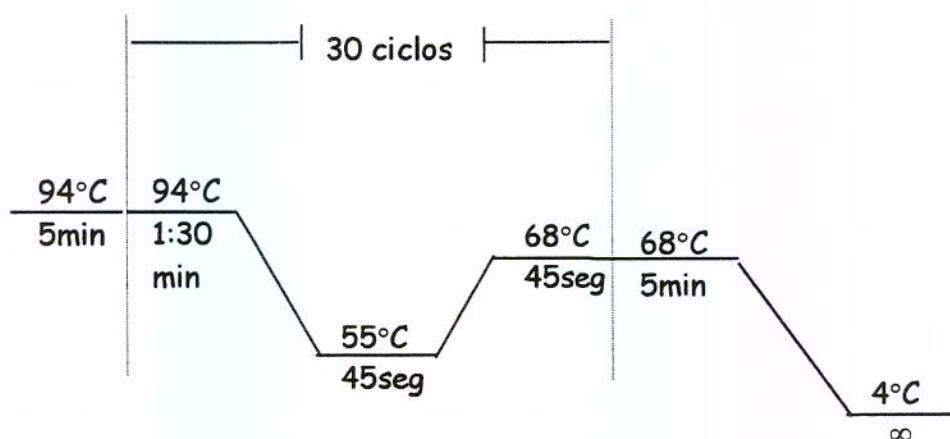


Figura 18 – Ciclo utilizado na amplificação dos fragmentos transcritos a partir dos minigenes 3 e 4.

IV. Resultados

1. ALTERAÇÕES ENCONTRADAS

Foram encontradas oito alterações no gene G6PC, responsável pela glicogenose tipo Ia incluindo, uma nova mutação de ponto que foi publicada durante o desenvolvimento do trabalho, duas novas alterações intrônicas, uma nova mutação silenciosa e quatro mutações de ponto conhecidas. Foi estudada também a região polimórfica previamente descrita na posição 1176. O genótipo C/C foi encontrado em 70,4% dos indivíduos portadores de GSDIa estudados, enquanto que o genótipo T/T foi observado em apenas 7,4% dos pacientes. As mutações encontradas nas regiões intrônicas foram estudadas por meio da técnica de minigenes para análise do mecanismo de *splicing* e comprovou-se que as mutações IVS3-58T>A e IVS4+10G>A não provocam a formação de transcritos aberrantes. A tabela 11 apresenta um resumo de todas as alterações encontradas.

Tabela 11 - Resumo das alterações detectadas.

	Nucleotídeo	Aminoácido	Exon	Método de detecção	Referências
1	A ¹⁹² →T	D38V	1	SSCP/Sequenciamento	Chevalier-Porst <i>et al.</i> 1996
2 ^a	G ²⁸¹ →A	G68R	1	Sequenciamento	Sartorato <i>et al.</i> 1998
3	C ³²⁶ →T	R83C	2	Sequenciamento	Lei <i>et al.</i> 1994
4	G ⁵¹¹ →A	P145	3	Sequenciamento	este trabalho
5	641-58T→A	-	3/4	Sequenciamento	este trabalho
6	641+10 G→A	-	4/5	Sequenciamento	este trabalho
7	G ¹⁰¹² →T	V338F	5	SSCP/Sequenciamento	Rake <i>et al.</i> 1998
8	C ¹¹¹⁸ →T	Q347X	5	Sequenciamento	Lei <i>et al.</i> 1994
9 ^b	T ¹¹⁷⁶ →C	L366S	5	Dra I	Lam <i>et al.</i> 1998b

(a) Mutação nova publicada no decorrer deste trabalho; (b) região polimórfica.

A figura 19 esquematiza a localização da mutação *missense* nova, as alterações intrônicas, a mutação silenciosa e as mutações previamente descritas encontradas nos indivíduos estudados, incluindo o polimorfismo T1176C.

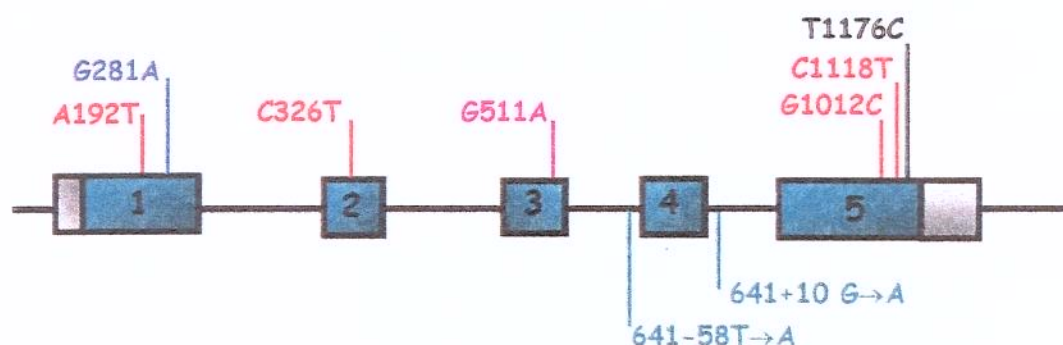


Figura 19 - Mutação *missense* nova (azul); mutações já citadas na literatura (vermelho); alterações intrônicas (verde), mutação silenciosa (rosa) e polimorfismo (preto).

2. RESUMO DAS ALTERAÇÕES ENCONTRADAS NOS PACIENTES ESTUDADOS

A tabela 12 mostra as alterações e o polimorfismo encontrados nos indivíduos estudados que apresentam sinais clínicos de glicogenose tipo I.

Tabela 12 – Genótipo dos pacientes com relação às mutações no gene G6PC.

FAMÍLIA	PACIENTES	MUTAÇÃO		POLIMORFISMO T1176C alelo 1/alelo 2
		ALELO 1	ALELO 2	
4	6 (F)	641+10G→A	normal	C/C
6	11 (F)	G ²⁸¹ →A G ⁵¹¹ →A 641-58T→A	G ²⁸¹ →A G ⁵¹¹ →A 641-58T→A	C/C
7	14 (F)	C ¹¹¹⁸ →T	C ¹¹¹⁸ →T	C/C
11 ^a	24 (F) 25 (F)	G ¹⁰¹² →T G ¹⁰¹² →T	G ¹⁰¹² →T G ¹⁰¹² →T	T/T T/T
12	26 (M)	C ³²⁶ →T	C ³²⁶ →T	C/C
13	27 (F)	A ¹⁹² →T	A ¹⁹² →T	C/C
16	32 (F)	C ³²⁶ →T	C ³²⁶ →T	C/C
20	41 (M)	C ¹¹¹⁸ →T	C ¹¹¹⁸ →T	C/C
26	51 (F)	C ³²⁶ →T	C ³²⁶ →T	C/C

(M) masculino; (F) feminino; (a) os indivíduos 24 e 25 são irmãs.

3. ANÁLISE DAS MUTAÇÕES NO GENE G6PC

3.1. AMPLIFICAÇÃO DOS EXONS

Os cinco exons do gene G6PC foram amplificados através da técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase), usando *primers* da tabela 5. A figura 20 mostra a amplificação de todos os exons numa corrida de eletroforese em gel de agarose 0,8%, mostrando o tamanho previsto para cada exon, conforme a tabela 5.

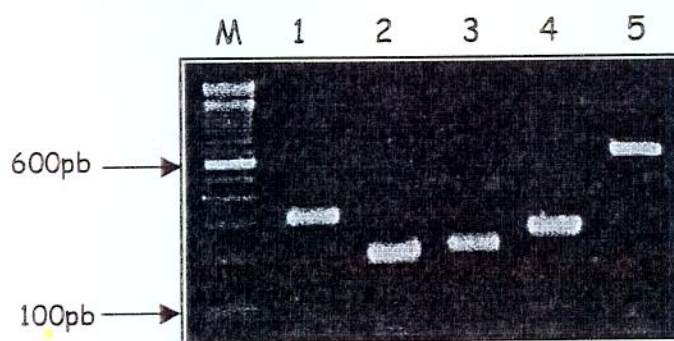


Figura 20 – Amplificação dos 5 exons do gene G6PC através da reação da PCR. M – marcador de peso molecular de 100pb-Gibco BRL.

3.2. RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES PELAS TÉCNICAS DE SSCP E SEQUENCIAMENTO

Através da técnica de SSCP foram identificados padrões anormais de migração das bandas em eletroforese somente nos pacientes 24, 25 e 27, sendo as outras mutações identificadas diretamente por sequenciamento. A análise por SSCP não se mostrou informativa, uma vez que, surgiram vários falsos positivos e negativos. Portanto, todos os exons foram sequenciados independentemente do resultado da técnica de SSCP.

Detectou-se através desta técnica uma mutação de sentido trocado, já descrita na literatura em homozigose $G^{1012} \rightarrow T$ (GTC $\rightarrow$ TTC, V338F) nas pacientes 24 e 25 que são duas irmãs. A mutação provoca a substituição do aminoácido Valina (Val) por Fenilalanina (Phe) (figura 21).

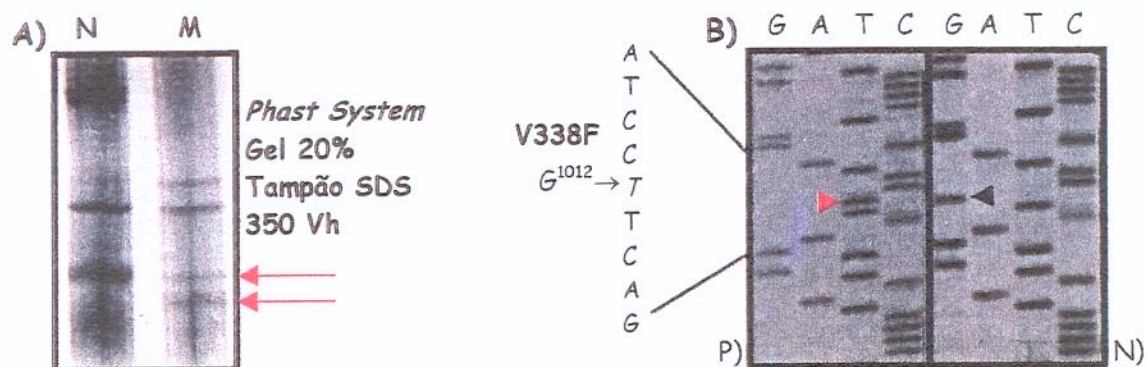


Figura 21 – Mutação V338F. Em A) - Resultado da técnica de SSCP a partir da digestão do exon 5 da paciente 24 (M) e de um controle (N) com a enzima *Hae* III. As setas vermelhas indicam o padrão anormal de eletroforese para a paciente 24. Em B) - Sequenciamento ilustrando a mutação $G^{1012} \rightarrow T$ (V338F) no exon 5 do gene da G6Pase das pacientes 24 e 25 (P) e a sequência normal (N).

Utilizando-se a técnica de SSCP e sequenciamento foi encontrada também a mutação D38V que provoca a troca da base A por T na posição 192 (GAC $\rightarrow$ GTC) no exon 1 do gene G6PC (figura 22). Essa alteração identificada na paciente 27, provoca a troca de Ácido Aspártico (Asp) por Valina (Val).

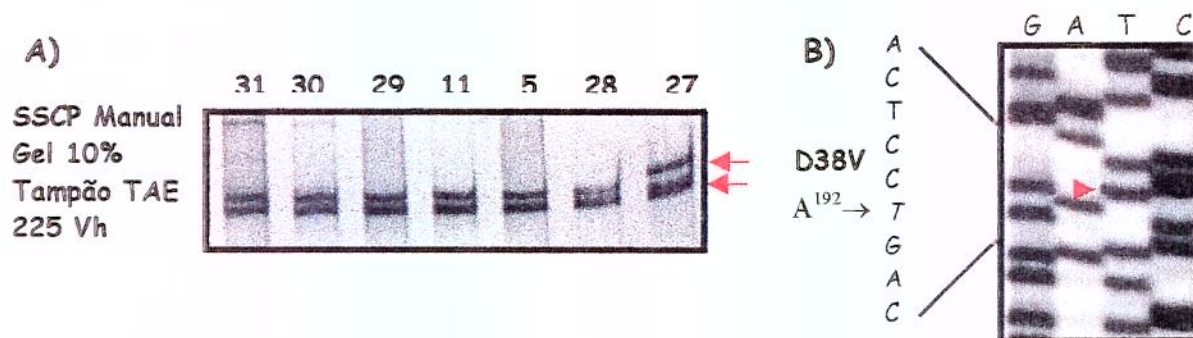


Figura 22 – Em A) SSCP do exon 1 de alguns pacientes com GSDIa. As setas mostram um padrão de migração de bandas alterado na paciente 27. Em B) Mutação $A^{192} \rightarrow T$ (D38V) no exon 1 do gene da G6Pase da paciente 27.

A figura 23 ilustra a mutação intrônica encontrada no intron 4 da paciente 6 em heterozigose. Esta alteração foi visualizada através do sequenciamento do exon 4 e utilizando-se a técnica de minigenes foi possível analisar se esta mutação era responsável por alterações no mecanismo de *splicing* ou não, o que será descrito mais adiante.

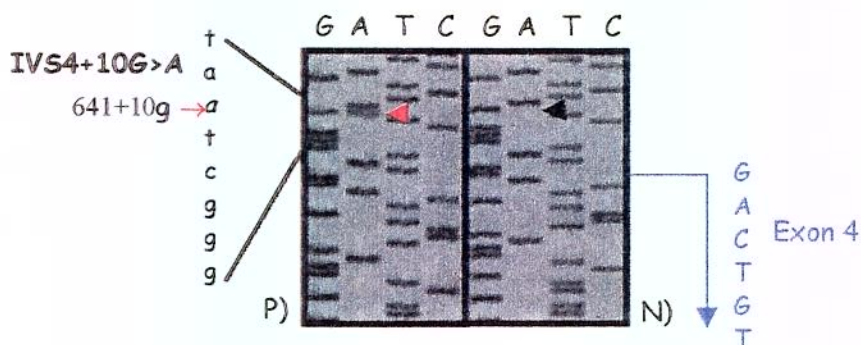


Figura 23 - Mutação de $G \rightarrow A$ na posição 641+10 do intron 4 em heterozigose no paciente 6 (P) e a seqüência normal (N).

Na paciente 11 foram encontradas três alterações, sendo uma mutação de ponto nova, uma mutação silenciosa e uma mutação intrônica. A mutação nova foi detectada no exon 1, em homozigose e provoca a troca da base C para T na posição 281. Esta mutação de sentido trocado converte o aminoácido Glicina para Arginina no códon 68 (GGA→AGA, G68R). A mutação silenciosa foi encontrada no exon 3 em homozigose e provoca a troca da base G para A na posição 511, o que não altera o aminoácido Prolina no códon 145 (CCG→CCA, P145). A mutação no intron 3, IVS3-58T>A, visualizada através do sequenciamento do exon 4, foi encontrada em homozigose e provoca a troca da base T para A na posição 641-58 e também foi utilizada a técnica de minigenes para análise do seu efeito. A figura 24 mostra as três alterações detectadas neste paciente.

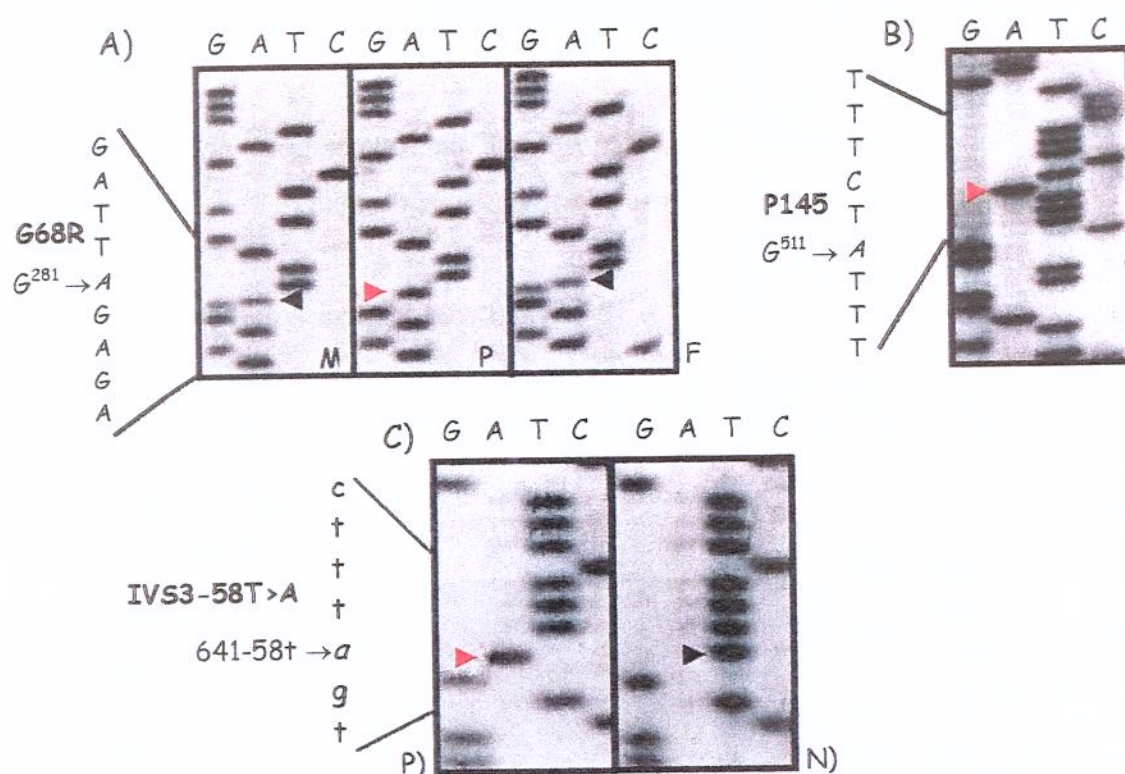


Figura 24 – A) Mutação $G^{281} \rightarrow A$ no exon 1 da paciente 11(P), alterando no códon 68 o aminoácido Glicina por Arginina. O pai (F) e a mãe (M) da paciente são heterozigotos para a mutação; B) Mutação silenciosa P145 em homozigose; C) Mutação em homozigose no intron 3 da paciente 11 (M) e a sequência normal (N).

Os pacientes 14 e 41 são homozigotos para a mutação já descrita na literatura Q347X, que leva a substituição do aminoácido Glutamina por um códon de terminação. O sequenciamento direto do produto da PCR revelou uma transição de C para T na posição 1118 (CAG→TAG) no exon 5. A figura 25 ilustra a mutação Q347X presente em ambos os pacientes.

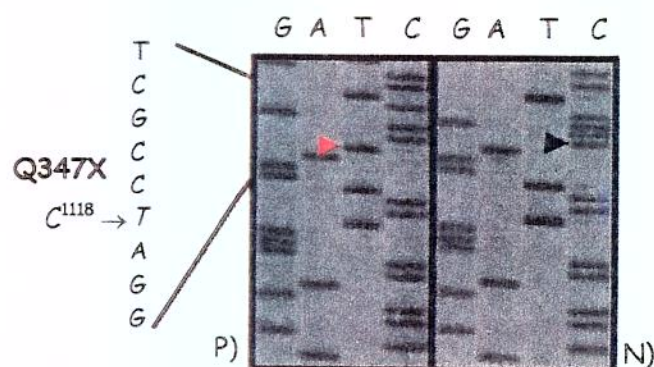


Figura 25 - Mutação Q347X ($C^{1118} \rightarrow T$) encontrada em homozigose no exon 5 dos pacientes 14 e 41; (P) paciente e (N) sequência normal.

Foram encontradas nos pacientes 26, 32 e 51, através da técnica de sequenciamento, a mutação de sentido trocado R83C ($C^{326} \rightarrow T$) em homozigose no exon 2. Esta mutação provoca a substituição do aminoácido Arginina no códon 83 por Cisteína (CGT→TGT) como pode ser observado na figura 26.



Figura 26 – Mutação $C^{326} \rightarrow T$ (R83C) no exon 2 do gene da G6Pase presente nos pacientes 26, 32 e 51 (P) e a sequência normal (N).

4. ANÁLISE DO POLIMORFISMO T1176C

A figura 27 mostra o padrão da digestão do exon 5 do gene da G6Pase pela enzima de restrição *Dra* I, utilizado na análise do polimorfismo T1176C. O produto da PCR de 647bp quando digerido com a enzima *Dra* I em presença da base T, é cortado apresentando bandas em gel de agarose de 572 e 75bp. Na presença da base C o produto da PCR não é digerido, como pode ser observado no gel da figura 28. O estudo desse polimorfismo foi feito em todos os pacientes em um total de 27 indivíduos. Foram estudados também 50 indivíduos não portadores de glicogenose tipo Ia, o resultado pode ser observado na tabela 13.

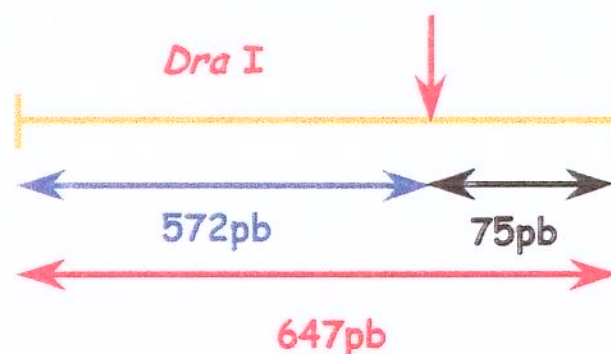


Figura 27 – Padrão de digestão do produto da PCR do exon 5 com *Dra* I. Em presença da base T, o fragmento de 647pb é digerido em 572 e 75pb.

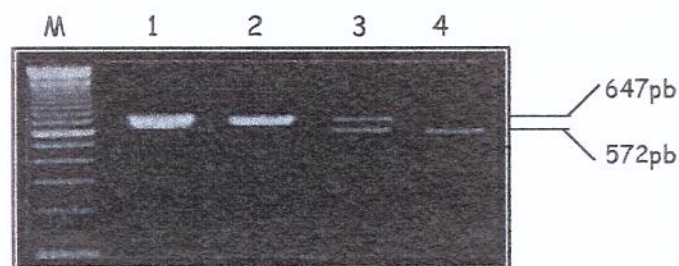


Figura 28 – Análise de restrição para o polimorfismo T1176C com a enzima *Dra* I. M- marcador de peso molecular de 100pb-GibcoBRL. 1- produto da PCR não digerido; 2- ausência do sítio de restrição para *Dra* I, homozigoto para C; 3- heterozigoto T/C; 4- presença do sítio de *Dra* I, homozigoto para T.

Tabela 13 – Resultado da análise do polimorfismo T¹¹⁷⁶→C.

Indivíduos analisados	Número de indivíduos analisados	Polimorfismo T1176C Alelo1/Alelo 2	Porcentagem (%)
Portadores de GSDIA	26	C/C	73
		T/T	3,8
		T/C	23,2
Não portadores de GSDIa	50	C/C	60
		T/T	10
		T/C	30

5. ANÁLISE DOS INTRONS DO GENE G6PC

5.1. AMPLIFICAÇÃO DOS INTRONS

Os introns 1, 2, 3 e 4 foram amplificados através da técnica da PCR utilizando-se os *primers* descritos na tabela 6, como pode ser observado na figura 29. Inicialmente foi utilizada a enzima *Taq* DNA polimerase para a amplificação dos introns, contudo esta não se mostrou muito eficaz na amplificação de fragmentos longos, sendo substituída pela enzima *Pfx* DNA polimerase (Gibco BRL).



Figura 29 - Amplificação dos introns 1, 2, 3 e 4 do gene G6PC. M-marcador de peso molecular de 1Kb-GibcoBRL.

5.2. SEQUENCIAMENTO DOS INTRONS

As seqüências flanqueadoras dos introns 1, 2, 3 e 4 de todos os outros pacientes e de indivíduos normais não portadores de GSDIa foram sequenciadas e não revelaram outras mutações intrônicas. O sequenciamento dos introns 3 e 4 foi facilitado uma vez que estes foram clonados no vetor pSVL para transfecção, pois o seu sequenciamento a partir da PCR é muito difícil devido ao tamanho dos fragmentos. O sequenciamento dos introns 1 e 2 foi realizado à partir do produto da PCR. O fato de se tratar de fragmentos grandes (~3Kb) dificultou a leitura, sendo necessário vários tempos de corrida. As seqüências estão editadas no anexo I.

6. CONSTRUÇÃO DE MINIGENES

6.1. AMPLIFICAÇÃO DOS MINIGENES

Para a construção de minigenes, cujo objetivo foi estudar o efeito das mutações intrônicas no mecanismo de *splicing* do gene G6PC, foi feita a amplificação do minigene 3 (exon3-intron3-exon4) do paciente 11 e do minigene 4 (exon4-intron4-exon5) da paciente 6, nos quais foram detectadas previamente as mutações IVS3-58T>A e IVS4+10G>A. Para a construção foram utilizados *primers* mutantes descritos na tabela 7. O resultado da amplificação da reação da PCR é observado na figura 30.

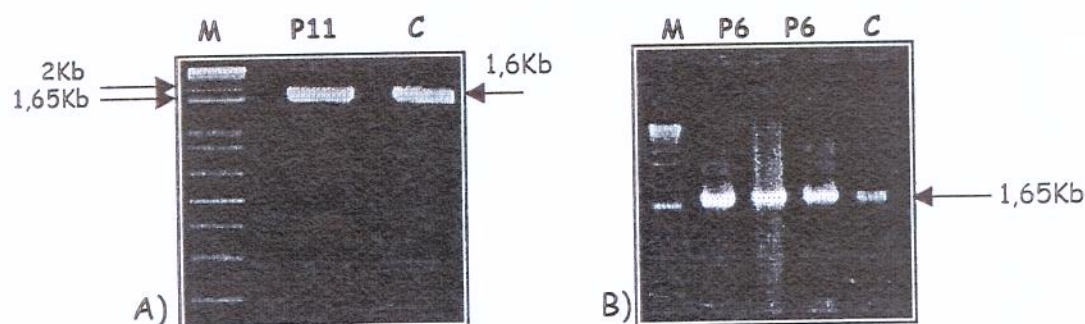


Figura 30 - Amplificação por PCR dos minigenes. A) construção exon3-intron3-exon4 do paciente 11 e controle; B) construção exon4-intron4-exon5 da paciente 6 e de dois controles. M = marcador de peso molecular 1Kb-Gibco BRL.

Ambos os minigenes foram amplificados utilizando-se a enzima *Pfx* (Gibco) pela sua facilidade de amplificar fragmentos maiores e pela atividade editorial 3'→5' da enzima, que minimiza erros na sequência amplificada.

6.2. CLONAGEM NO VETOR pGEM

Após a amplificação do minigene 4 (exon4-intron4-exon5), este foi clonado no vetor pGEM, e a seleção das colônias recombinantes foi feita utilizando-se os *primers* T7 e SP6. Entre as vinte colônias brancas selecionadas, apenas uma continha o inserto do tamanho desejado, como pode ser observado na figura 31. O minigene 3 (exon3-intron3-exon4) foi clonado diretamente no vetor pSVL.

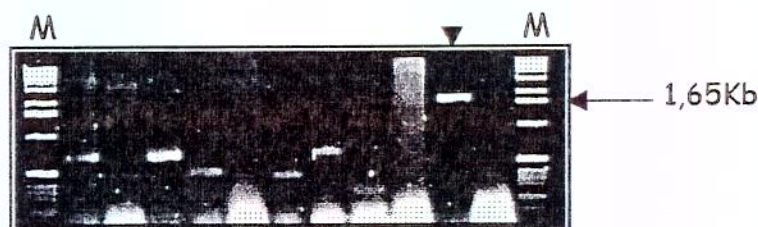


Figura 31 - PCR das colônias recombinantes, a seta indica a colônia cujo inserto apresenta o tamanho desejado. M = marcador de peso molecular de 1Kb-Gibco BRL.

O fragmento clonado (minigene 4) foi então sequenciado para confirmar se haviam erros na sequência do inserto e se os sítios de restrição para as enzimas *Xba* I e *Bam*H I haviam sido inseridos pelos *primers* mutantes. Também era importante determinar qual o alelo havia sido clonado, se o normal ou mutante, já que a mutação em questão é encontrada em heterozigose no paciente. O sequenciamento revelou que o inserto clonado se tratava do alelo normal, como mostrado na figura 32. O alelo mutante foi obtido em clonagens posteriores da mesma forma descrita.

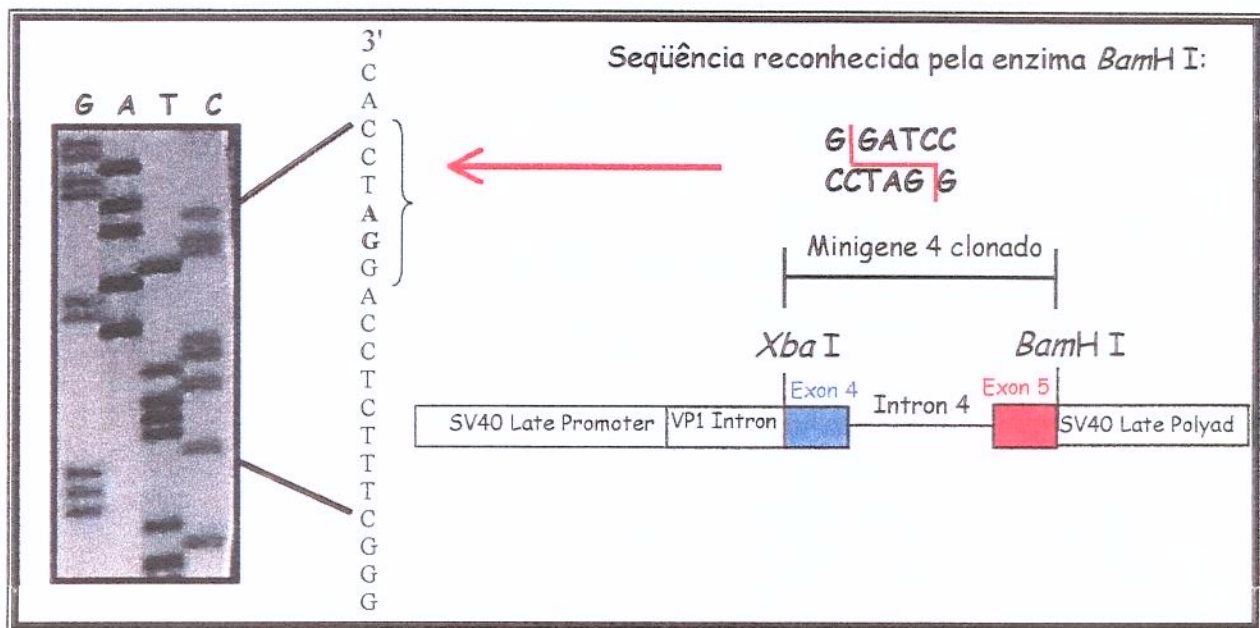


Figura 32 - Sequenciamento do clone recombinante contendo o minigene 4, mostrando a sequência do *primer* V12R e a inserção do sítio de restrição para *Bam*H I, na região 3' do fragmento amplificado. As bases trocadas no *primer* mutante para inserção do sítio de *Bam*H I estão em negrito.

6.3. CLONAGEM NO VETOR PSVL:

Para a clonagem no vetor pSVL, tanto o plasmídeo pSVL quanto o inserto (minigenes 3 e 4, controle e mutante) passaram por uma digestão dupla com *Xba* I e *Bam*H I para que extremidades coesivas compatíveis fossem criadas, possibilitando o processo de ligação do inserto no vetor proporcionando uma clonagem direcional. A figura 33 mostra o plasmídeo pSVL e o fragmento a ser clonado (minigene 4) já digeridos e purificados com o kit *ConcertTM Rapid Gel Extraction System*. A purificação de ambos é necessária para otimizar a clonagem, porém melhores resultados foram alcançados, tanto na clonagem do minigene 3 quanto do 4, sem a purificação do inserto, provavelmente porque durante o processo de purificação a extremidades coesivas podem ser perdidas comprometendo o processo de ligação.

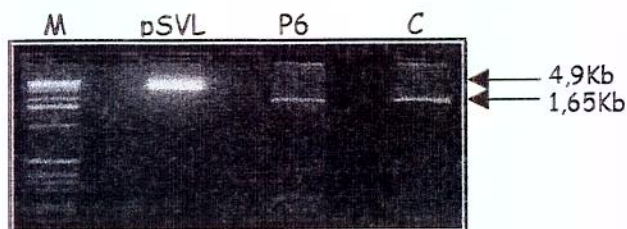


Figura 33 - Vetor pSVL e fragmento amplificado do paciente 6 (P6) e de um controle (C) já digeridos e purificados (M = Marcador de peso molecular de 1Kb-Gibco BRL) para clonagem em pSVL.

A seleção dos clones recombinantes foi feita em placas de meio LB sólido contendo ampicilina. A verificação da presença do inserto foi feita primeiramente por PCR utilizando *primers* que flanqueiam o sítio de inserção do fragmento no plasmídio (tabela 7). Um exemplo do rastreamento das colônias por PCR é mostrado na figura 34, nesse caso foi clonado o minigene 4. Entre 200 colônias rastreadas apenas uma continha o inserto do tamanho desejado.

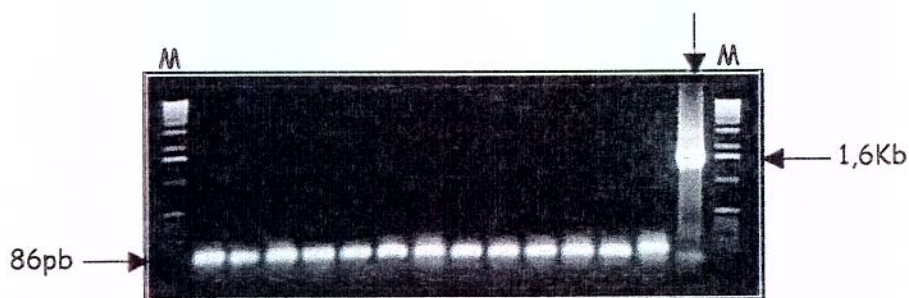


Figura 34 – Um exemplo da utilização da PCR para constatar a presença ou não do inserto em colônias selecionadas. A banda de 86pb é referente a amplificação de seqüências do vetor pSVL sem o fragmento inserido. A banda de 1,6Kb corresponde ao minigene 4 clonado. M – marcador de peso molecular de 1Kb-Gibco BRL.

Na clonagem do minigene 3 fez-se também um rastreamento por PCR em 50 colônias e apenas uma apresentou o tamanho desejado. Como a mutação no intron 3 é observado em homozigose no paciente, não foi necessário fazer-se outra clonagem.

Após um rastreamento inicial das colônias por PCR, aquelas que continham plasmídios recombinantes com o inserto do tamanho correto, foram colocadas em meio líquido à 37°C durante a noite e seus plasmídios foram extraídos em pequena escala para digestão com *Xba* I e *Bam*H I e sequenciados utilizando-se os *primers* pSVLF e pSVLR descritos na tabela 7. Desse modo confirmou-se a inserção dos sítios de restrição (*Xba* I e *Bam*H I) e a presença do inserto correto (figura 35).

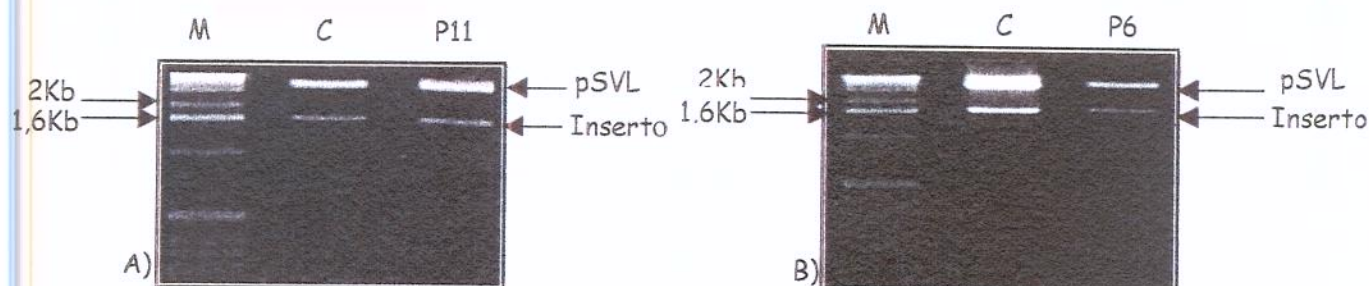


Figura 35 – Dupla digestão dos plasmídios recombinantes. A) Vetor pSVL e minigene 3, controle (C) e mutante (paciente 11), o inserto possui 1,65Kb; B) Vetor pSVL e minigene 4, controle (C) e mutante (paciente 6), o inserto possui 1,6Kb. (M = marcador de peso molecular de 1Kb-Gibco BRL).

6.4. ANÁLISE DOS TRANSCRITOS

Os plasmídios contendo os minigenes 3 e 4, controle e mutante, foram purificados e transfectados em células COS-7 para expressão transiente de seus mRNAs. Após a transfecção, os RNAs mensageiros de cada amostra foram extraídos e através de um RT-PCR, cujos *primers* utilizados são mostrados na tabela 10, amplificou-se os fragmentos que foram obtidos a partir da expressão de cada minigene nas células COS-7. A figura 36 mostra como ocorre o *splicing* normal nos minigenes 3 e 4 e a localização dos *primers* nos exons correspondentes. Foram alcançados melhores resultados utilizando-se oligo(dT) ao invés de *primers* randômicos para a síntese de cDNA.

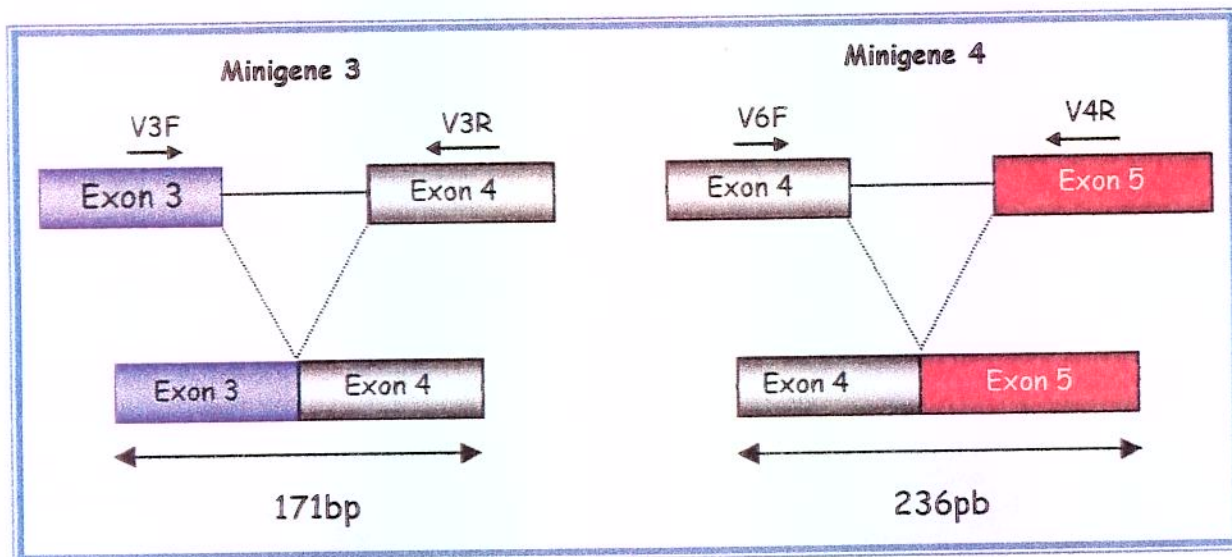


Figura 36 – Mecanismo de *splicing* normal entre alguns dos exons do gene da G6Pase e a posição dos *primers* utilizados na reação de PCR pós-transcricional.

Através da comparação entre os tamanhos dos fragmentos provenientes dos minigenes normal e mutante e sequenciamento desses fragmentos, observou-se que em nenhum dos dois casos, ocorreu alteração no sítio de *splicing* provocado pelas mutações encontradas nos introns de ambos os pacientes (figura 37).

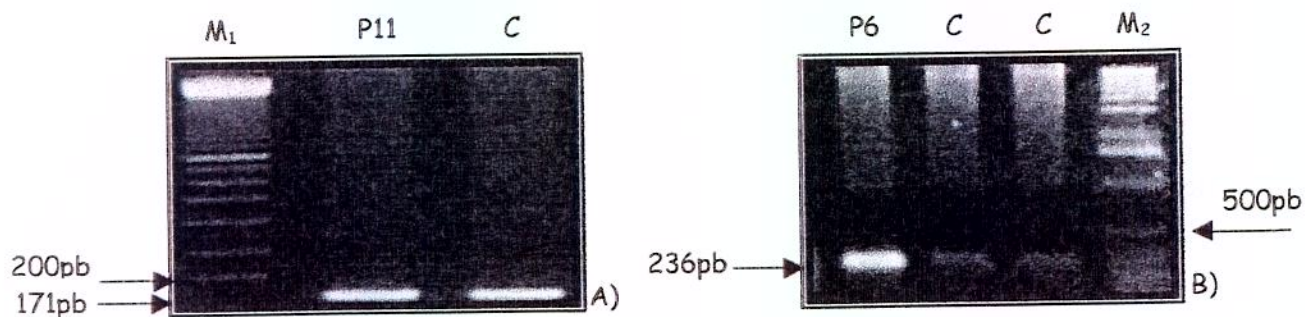


Figura 37 – Amplificação dos fragmentos expressos pelos minigenes em células COS-7. Em ambos os minigenes 3 e 4 (A e B) os produtos de amplificação dos controles e dos pacientes apresentam o mesmo tamanho, demonstrando que não houve formação de transcritos aberrantes pelos fragmentos mutantes clonados. M₁ – marcador de peso molecular de 100pb-MBI Fermentas; M₂ – marcador de peso molecular de 1Kb-Gibco BRL; C– controle; P– paciente.

1. MUTAÇÕES ENCONTRADAS NO GENE G6PC

Dentre as oito alterações detectadas neste trabalho, cinco conduzem à substituição de aminoácidos em regiões conservadas na enzima G6Pase, sugerindo que esses resíduos são importantes para a atividade da enzima. As mutações aqui apresentadas foram as únicas detectadas em toda a região codificante, em seus respectivos alelos, exceto as duas mutações intrônicas encontradas nos pacientes 6 e 11. Estas mutações intrônicas foram pesquisadas em indivíduos normais, não portadores de glicogenose tipo Ia e não foram detectadas. A maioria das mutações foram encontradas em homozigose, em pacientes filhos de pais consanguíneos, sugerindo que a GSD é rara na população brasileira. Na tabela 14 podem ser observadas as mutações discutidas, bem como a idade do diagnóstico e a idade atual dos pacientes.

Tabela 14 – Resumo das alterações encontradas.

FAMÍLIA	PACIENTE	IDADE INÍCIO	IDADE ATUAL	MUTACÃO		POLIMORFISMO T1176C alelo 1/alelo 2
				ALELO 1	ALELO 2	
4	6 (F)	3 meses	9 anos	IVS4+10G>A	Normal	C/C
6	11 (F)	5 meses	4 anos	G68R P145 IVS3-58T>A	G68R P145 IVS3-58T>A	C/C
7	14 (F)	2 meses	9 anos	Q347X	Q347X	C/C
11	24 (F) 25 (F)	7 meses 7 meses	3 anos 2 anos	V338F	V338F	T/T T/T
12	26 (M)			R83C	R83C	C/C
13	27 (F)	39 anos	51 anos	D38V	D38V	C/C
16	32 (F)			R83C	R83C	C/C
20	41 (M)	3 anos	24 anos	Q347X	Q347X	C/C
26	51 (F)			R83C	R83C	C/C

(M) masculino, (F) feminino

Muitas mutações que provocam a GSDIa mostram uma prevalência surpreendente em grupos étnicos específicos, o que possibilita testar mutações específicas no gene da G6Pase em pacientes dessas regiões antes de se analisar o gene por inteiro. A alteração mais frequentemente observada nos indivíduos com deficiência da atividade da G6Pase estudados neste trabalho foi a mutação *missense* R83C (326C→T), seguida da mutação *nonsense* Q347X (1118C→T). Essas alterações são as mais comuns entre portadores caucasianos de GSDIa nos Estados Unidos (LEI *et al.*, 1995c) e no Noroeste e Sul europeus, sendo responsáveis por aproximadamente 70% de todos os alelos mutantes nessas regiões (CHEVALIER-PORST *et al.*, 1996; RAKE *et al.*, 2000a). Como as origens étnicas da população brasileira são altamente heterogêneas, sendo compostas por imigrantes europeus, africanos, asiáticos, assim como por grupos ameríndios, resulta em uma complexa mistura racial. A contribuição portuguesa é uma das mais antigas e predominantes, tendo início no século XVI juntamente com a colonização do Brasil. Essas observações indicam que as mutações R83C e Q347X são relativamente comuns entre caucasianos e devem ter se espalhado pelo Brasil através da migração europeia dos últimos séculos. A tabela 15 apresenta a distribuição e a frequência das mutações nos alelos mutantes dos pacientes de GSDIa estudados.

Tabela 15 - Distribuição e frequência das mutações em 16 alelos da G6Pase em pacientes com GSDIa.

Mutação	Nucleotídeo	Exon	No. de alelos	Frequência (%)
R83C	326C→T	2	6	37,5
Q347X	1118C→T	5	4	25
G68R	281G→A	1	2	12,5
V338F	1012G→T	5	2	12,5
D38V	192A→T	1	2	12,5
Total			16	100

Em 18 pacientes com sintomas clínicos de GSDIa não foram encontradas mutações na região codificante que pudessem ser responsáveis pela doença. Esses pacientes não foram submetidos a biópsia de fígado para análise bioquímica da atividade da enzima G6Pase e foram inicialmente classificados como tipo Ia, podendo na verdade, se tratar de pacientes de GSDI *non-a* ou GSD III, devido a semelhança de sintomas clínicos, ou ainda de outras deficiências de reserva.

A seguir são discutidos os achados relativos a cada paciente, levando-se em conta as características bioquímicas da enzima mutante e analisando a ocorrência destas alterações nos casos descritos na literatura pertinente.

Mutação R83C

Nos pacientes 26, 32 e 51, os dois primeiros filhos de casais consanguíneos, foi encontrada no exon 2 a mutação R83C, que provoca a substituição de uma Arginina na posição 83 por uma Cisteína. Esta alteração é uma das mais freqüentes não só em portadores caucasianos de GSDIa nos EUA, como também em norte-americanos de origem hispânica (28%), populações de origem judaica (93%) e pacientes de origem turca (60%) (LEI *et al.*, 1995b; PARVARI *et al.*, 1995 e 1997, RAKE *et al.*, 2000a). Foi a mutação mais comum encontrada na amostra estudada, com uma freqüência de 37,5% dentre os alelos mutantes. A Arginina do códon 83 contribui para o centro ativo da enzima. A estrutura estridente que requer este códon, sugere que este aminoácido da G6Pase também esteja envolvido no posicionamento do fosfato presente na glicose 6-fosfato, que é o substrato da enzima (LEI *et al.*, 1995b). Esta mutação já foi examinada através de experimentos de expressão transiente, e o mutante R83C não apresentou atividade detectável da glicose 6-fosfatase (LEI *et al.*, 1993). A substituição do aminoácido Arginina na posição 83 por outros aminoácidos de diversas estruturas, inclusive Lisina, o que é uma troca conservativa, produz mutantes G6Pase sem atividade enzimática, demonstrando que a Arginina no códon 83 é absolutamente necessária para a atividade catalítica da enzima (LEI *et al.*, 1995b).

Mutação Q347X

A mutação Q347X, comum em pacientes caucasianos norte-americanos e europeus (LEI *et al.*, 1995b; CHEVALIER-PORST *et al.*, 1996), foi encontrada em homozigose no exon 5 dos pacientes 14 e 41, ambos filhos de casal consanguíneo e é uma das mais freqüentes em nossa amostra, como pode ser observado na tabela 15. Essa mutação promove a conversão de uma Glutamina na posição 347 à um códon de terminação. A enzima G6Pase codificada a partir de um mutante Q347X é uma proteína truncada de 346 aminoácidos, 11 aminoácidos menor na região carboxi-terminal do que a G6Pase selvagem que apresenta 357 resíduos totais. Experimentos de mutagênese sítio dirigida e expressão transiente demonstraram que esta mutação provoca a inatividade da enzima G6Pase (LEI *et al.*, 1994).

Mutação IVS4+10G>A

Foi encontrada na paciente 6 a mutação 641+10G>A em heterozigose no intron 4 do gene G6PC. Essa paciente não é filha de casal consanguíneo, porém apresenta sintomas clínicos característicos de GSDIa, como hepatomegalia e hipoglicemia, podendo esta alteração ser responsável pelo seu fenótipo. Contudo através da construção de minigenes constatou-se que essa mutação não alterou a edição do mRNA, pois provavelmente sua localização não interferiu no mecanismo de *splicing* do minigene 4. Nessa paciente não foi encontrada nenhuma mutação em região codificante ou outra mutação intrônica que pudesse justificar o seu fenótipo. Seu diagnóstico foi baseado apenas em sintomas clínicos característicos de glicogenose tipo I. A ausência da análise da atividade da enzima glicose 6-fosfatase no fígado provoca em muitos casos um diagnóstico impreciso, podendo este tratar-se de um caso de glicogenose tipo I *non-a* ou mesmo de glicogenose tipo III.

Mutações G68R, P145 e IVS3-58T>A

A paciente 11 é filha de casal consanguíneo e portadora da substituição de uma Glicina na posição 68 por uma Arginina, da mutação silenciosa P145 e da alteração no intron 3 (641-58T→A), todas em homozigose.

A mutação G68R no exon 1 do gene G6PC se localiza na hélice transmembrânica da enzima G6Pase e embora nenhum estudo de expressão desta mutação tenha sido feito, uma alteração nessa região pode influenciar na estabilidade estrutural da enzima e consequentemente em sua atividade. Esta mutação foi descrita por nós, somente uma vez, em um paciente de Campinas, cuja origem étnica não foi informada.

A mutação silenciosa Pro145 no exon 3, é aparentemente neutra, porém até que se analise o seu impacto sobre o processamento e estabilidade do RNA mensageiro, torna-se difícil determinar a neutralidade ou a não patogenicidade desta mutação. Pesquisou-se a presença desta alteração nos outros pacientes de GSDIa para analisar se poderia ser apenas uma região polimórfica, concluindo-se que esta é, realmente, uma mutação silenciosa.

A mutação 641-58T→A no intron 3 da paciente 11, também foi analisada através da construção de minigenes, e observou-se que não ocorreu alteração no mecanismo de *splicing* provocado por esta mutação. Com estes resultados pode-se supor que a mutação responsável pelo fenótipo da paciente 11 seja a encontrada no exon 1 (G68R) e que nem a mutação silenciosa P145 nem a alteração em homozigose no intron 3, contribuam para este fenótipo.

Mutação V338F

Esta mutação foi encontrada no exon 5 do gene G6PC de duas irmãs (pacientes nº 24 e 25), filhas de casal consanguíneo, e foi recentemente descrita em um paciente de GSDIa de origem alemã que era heterozigoto composto para essa alteração (RAKE *et al.*, 1999). Essas pacientes foram submetidas a biópsia de fígado para análise da atividade enzimática da G6Pase, a qual não foi detectada. Embora ainda não tenham sido feitos estudos de expressão para demonstrar se essa mutação provoca uma deficiência na atividade da G6Pase, ela foi a única mutação encontrada na região codificante do gene G6PC das duas irmãs em homozigose, o que indica que provavelmente altera a atividade da enzima G6Pase no fígado. De acordo com RAKE *et al.* (1999), a substituição do aminoácido Valina por Fenilalanina no códon 338 pode afetar a atividade e estabilidade da G6Pase, pois a Fenilalanina contém um anel aromático ao invés de um alifático não-polar presente na Valina.

Mutação D38V

A paciente 27 apresenta no exon 1 do gene G6PC a mutação D38V em homozigose. Ela tem 51 anos de idade, é filha de casal consanguíneo e três dos seus irmãos são afetados. Dois foram à óbito em consequência de complicações relacionadas a GSDIa, como adenomas hepáticos. O heredograma da família pode ser observado na figura 37. A paciente apresenta sintomas brandos de glicogenose e nunca observou episódio de hipoglicemia. Esta mutação foi previamente descrita em pacientes do Noroeste e Sul europeus (RAKE *et al.*, 1999) e provoca a troca de um aminoácido ácido (Ácido Aspártico) por um não-polar hidrofóbico (Valina) no meio do primeiro domínio transmembrânico da proteína. Análises desta alteração por mutação sítio dirigida e experimentos de expressão transiente, demonstraram que a mutação D38V faz com que não haja qualquer atividade da enzima (CHEVALIER-PORST *et al.*, 1996). A análise bioquímica da atividade da G6Pase em biópsia hepática foi realizada na paciente e em sua irmã, e em ambas é nula. São ainda intrigantes os sintomas apresentados pela paciente, o que enfatiza a heterogeneidade de genótipos e fenótipos observados na glicogenose tipo Ia. Não foi possível se obter maiores

informações acerca da sua dieta alimentar, que provavelmente deve ter sido fortuitamente rica em amido, minimizando os efeitos da deficiência da G6Pase, uma vez que sintomas como hipoglicemia passaram despercebidos e tendem a diminuir com a idade, devido ao aumento da produção endógena de glicose.

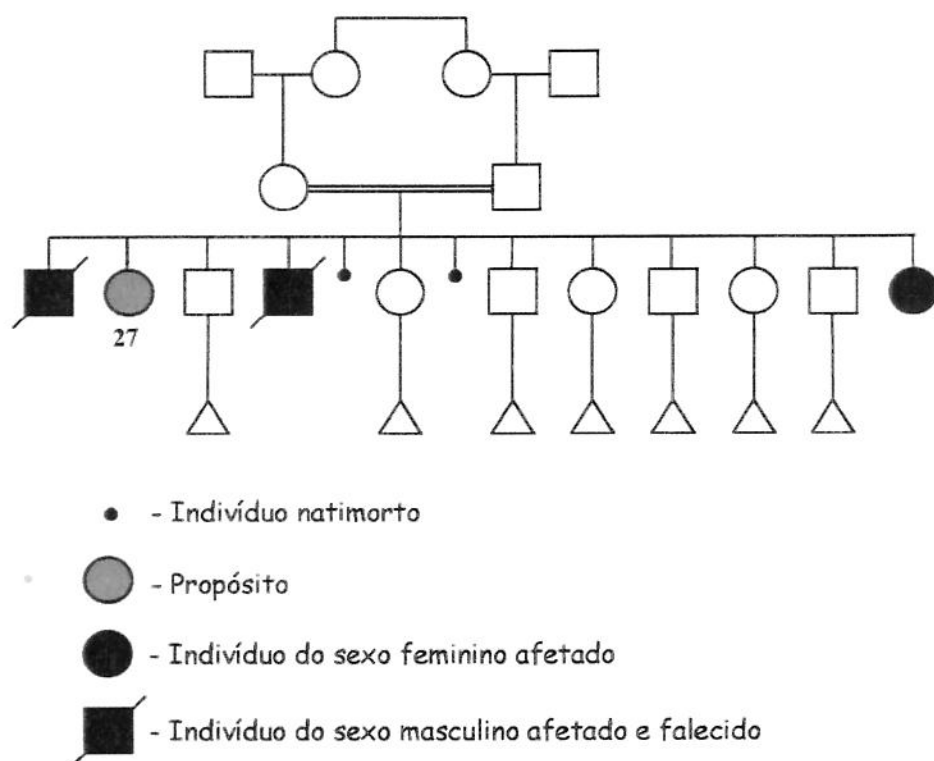


Figura 37 - Heredograma da família 15, mostrando a paciente 27 e os membros da família afetados por glicogenose tipo Ia.

2. O POLIMORFISMO T1176C

O polimorfismo T1176C está localizado na região 3' não traduzida do gene G6PC. De acordo com a amostra de 27 pacientes analisados quanto ao polimorfismo, 74,1% dos alelos codificam a base C e 25,9% dos alelos codificam a base T. Entre os indivíduos não portadores de GSDIa estas porcentagens não diferem muito, pois 75% dos alelos codificam a base C e 25% dos alelos codificam para a base T.

WONG e colaboradores em 1999, observaram que nas populações chinesa e japonesa o nucleotídeo 1176C está em desequilíbrio de ligação com as mutações R83C e R83H e com a mutação em sítio de *splicing* 727G→T, sendo as duas últimas as mais prevalentes na Ásia (LAM *et al.*, 1998a). Enquanto que o polimorfismo 1176T estaria em desequilíbrio de ligação com a inserção 459insTA, comum entre norte-americanos de origem hispânica. A descoberta deste polimorfismo nessas populações proporciona a detecção de portadores dessas mutações e o diagnóstico pré-natal de GSDIa em famílias que têm mutações não identificadas e que são informativas para este marcador (LAM *et al.*, 1998b). Todos os pacientes estudados neste trabalho que apresentaram a mutação R83C (pacientes 26,32 e 51), são homozigotos para a base C, como propõe WONG. Contudo, na amostra estudada, esse polimorfismo não pode ser considerado um marcador informativo para essa mutação comum em nossa população, uma vez que a porcentagem de indivíduos normais que são homozigotos para a base C (60%) é muito próxima da porcentagem de homozigotos para a base C em indivíduos portadores de GSDIa (70,4%).

3. ESTRATÉGIA DOS MINIGENES

Além da determinação de mutações, é muito importante analisar se a mutação é realmente a causa da doença, isto é, se a troca do DNA na sequência modifica o fenótipo. A análise de expressão, ou análise funcional do gene, nem sempre é possível, principalmente quando a proteína estudada não se expressa em todos os tecidos, como é o caso da G6Pase. Estudos do mecanismo de edição do RNA mensageiro *in vitro* são entretanto, a prova final de que uma mutação tem um efeito ou se trata de uma variação neutra. Foi demonstrado que uma mutação previamente descrita como silenciosa no gene FGFR2 (receptor 2 do fator de crescimento de fibroblastos), levava na verdade, ao surgimento de um sítio de *splicing* doador no RNA mensageiro desse gene (RICHARD & BECKMAN 1995). Assim como também foi descrita a natureza patogênica de uma variação neutra que provoca a perda de um sítio de *splicing* em um paciente com síndrome de Tay-Sachs infantil tardia (AKLI *et al.*, 1990), o que ressalta a importância da técnica de minigenes.

O significado de mutações em regiões intrônicas, ou mutações silenciosas também ressaltam a importância desses estudos. A natureza patológica dessas mutações pode ser determinada pela observação de produtos de transcrição anormais, resultantes de *splicing* aberrantes no gene. Estima-se que mais de 15% de todas as mutações de ponto que são responsáveis por doenças genéticas humanas, são alterações que provocam a produção de RNAs mensageiros aberrantes (ROGAN *et al.*, 1998). A estratégia de construção de minigenes mostrou-se efetiva no rastreamento de defeitos nesses mecanismos, que podem resultar tanto na deleção de seqüências codificantes como na retenção de introns.

Embora as mutações intrônicas investigadas através da estratégia de minigenes neste trabalho não fossem a causa da doença nos pacientes nº 6 e 11, essa pesquisa alcançou seus objetivos. Conseguiu-se implantar a metodologia dos minigenes em nosso laboratório, a qual pode caracterizar uma mutação com relação ao sítio de *splicing* através da análise do tamanho do cDNA. Demonstrou-se que através desta técnica é possível investigar o efeito de mutações sobre o mecanismo de *splicing* e além disso, evitar nova biópsia hepática para o estudo destes mecanismos.

4. DIAGNÓSTICO

O estudo molecular da glicogenose tipo I é fundamental para o diagnóstico pré-natal, pois permite determinar através de amniocentese ou vilosidade coriônica, se o filho de casais afetados ou portadores de GSDIa, apresentam ou não a doença. Da mesma forma, fazer o aconselhamento genético adequado do casal, pode proporcionar a estimativa do risco de repetição entre os próximos filhos. Aqueles que tiverem um risco real de gerarem crianças com GSDIa poderão tomar uma decisão consciente quanto à reprodução. O diagnóstico precoce da doença de Von Gierke é muito importante porque proporciona aos pacientes uma qualidade de vida melhor através da aplicação do tratamento correto, evitando o surgimento de complicações a longo prazo, como adenomas hepáticos.

Com o aumento da informação à respeito da base genética da glicogenose tipo I e a grande quantidade de mutações detectadas nos genes G6PC e G6PT1, o diagnóstico de GSDIa e GSDIb pode ser feito baseado nas anormalidades clínicas e bioquímicas associadas com a análise de mutações, ao invés de ensaios enzimáticos em tecido hepático obtido através de biópsia, o que é um procedimento invasivo.

VI. Conclusões

Apesar da raridade da doença de Von Gierke na população brasileira, foram identificadas oito alterações no gene G6PC (R83C, Q347X, G68R, D38V, V338F, P145, IVS3-58T→A, IVS4+10G→A), sendo uma delas (G68R) detectada apenas em nossa população. O polimorfismo T1176C do gene G6PC também foi analisado e concluiu-se que este não é um marcador informativo para a mutação R83C.

A mutação R83C, presente no exon 2 do gene da G6Pase, é a mais comum não só em indivíduos caucasianos portadores de GSDIa nos EUA e Noroeste e Sul europeus, como também em indivíduos de origem hispânica, judaica e turca. Esta mutação foi a mais freqüente em nossa amostra, estando presente em 37,5% dentre os alelos mutantes encontrados. A mutação Q347X, encontrada no exon 5 do gene G6PC, também é comum em pacientes caucasianos e europeus, e foi encontrada em dois pacientes de nossa amostra, tendo uma freqüência de 25% dentre os alelos mutantes. Portanto pode-se concluir que os exons 2 e 5 do gene G6PC devam ser prioritariamente investigados, uma vez que as probabilidades de se encontrar mutações neles é maior devido as origens étnicas da população do sul e sudeste do Brasil.

Em todos os quatro pacientes onde detectou-se a inatividade da enzima G6Pase através de biópsia hepática (pacientes nº 24, 26, 27 e 51), foram encontradas mutações no gene G6PC, comprovando que a análise enzimática apesar de poder ser substituída pelo diagnóstico molecular, tem sido concordante com este último.

Não foram detectadas alterações moleculares em 18 pacientes com sintomas clínicos sugestivos de GSDIa que não fizeram o ensaio enzimático da G6Pase. Considerando a ausência do ensaio bioquímico, esses pacientes apesar de terem sido classificados como tipo Ia, podem na verdade se tratar de GSDI *non-a* ou GSD III, pois a semelhança entre os aspectos clínicos desses tipos de glicogenose pode provocar divergências na classificação.

Comprovou-se por intermédio deste trabalho a eficácia da técnica dos minigenes para análise do efeito de mutações no processamento do RNA mensageiro. Além disso, esta estratégia evita a necessidade de uma nova biópsia hepática no paciente para análise desses mecanismos de *splicing*. Contudo, os resultados obtidos através desta técnica são demorados, devido a grande quantidade de etapas a serem cumpridas na metodologia. Portanto este tipo de análise seria inviável nos diagnósticos de rotina, sendo feita preferencialmente com o objetivo de pesquisar-se o efeito de determinada mutação no mecanismo de *splicing*.

A metodologia de diagnóstico molecular da GSDIa proposta nesse trabalho foi baseada na análise prévia de mutações pela técnica de SSCP. A eficácia desta técnica mostrou-se duvidosa, pois apenas duas das doze mutações foram detectadas por esta análise. Considerando que o gene G6PC não é muito grande, sugere-se a triagem de mutações por sequenciamento direto de todos os exons, eliminando-se a análise preliminar por SSCP. A rápida detecção das alterações no gene G6PC em nível molecular, proporciona um diagnóstico preciso e faz da metodologia utilizada um eficiente instrumento de investigação diagnóstica.

Portanto a análise molecular do gene G6PC pode substituir a análise da atividade da enzima G6Pase em biópsia de fígado. No caso de ausência de mutação no gene G6PC, sugere-se o rastreamento de mutações no gene G6PT1, responsável pela GSDIb, ou mesmo no gene AGL, responsável pela glicogenose tipo III.

VII. Summary

Glycogen storage disease type (GSD) is the most prevalent form among the glycogen storage disease type I (GSDI), with an overall frequency of 1:100.000 live births. It's an autosomal recessive disorder clinically characterized by hypoglycemia, hepatomegaly, growth retardation, hyperlipidemia, hyperuricemia, and lactic acidemia. These symptoms are caused by a deficiency in glucose 6-phosphatase (G6Pase), which catalyzes the terminal steps in gluconeogenesis and glycogenolysis by converting glucose 6-phosphate (G6P) into glucose and phosphate. In the past, many patients with type I glycogen storage disease used to die. At present, with early diagnosis and initiation of continuous proper treatment such as hepatic and renal adenomas can be prevented.

Isolation of human G6Pase cDNA showed that G6PC gene is composed of five exons, spanning approximately 12,5Kb on chromosome 17. From its cloning, more than 50 different mutations have been reported in this gene. In Caucasian patients from the USA and from North-West Europe, R83C and Q347X account for 25.2% and 22.4% of all mutant alleles respectively.

Diagnosis of GSDIa can be done by enzymological tests and confirmed by mutation analysis of the G6PC gene. The characterization of the G6Pase gene enabled the identification of the mutations causing GSDIa. This fact provides an option on applying DNA-analysis based diagnosis for carrier detection and prenatal diagnosis. The characterization of the gene also provides an insight into the structure-function relation of the G6Pase catalysis, by revealing the structural roles of specific amino acid residues.

In the present study, twenty seven GSDIa patients from twenty six unrelated families were investigated. The diagnosis by the G6Pase enzyme activity analysis in the liver biopsy was confirmed only in four patients.

The minigenes strategy was used in order to verify the effect of the intronic mutations in the splicing mechanism. No aberrant transcripts were identified. Exon skipping or exon intronic fragment incorporation is an usual mutational mechanism, often caused by changes in the consensus sequences at splicing site region. Likewise, sequences outside these regions can also affect the inclusion or exclusion of exons. Such splicing enhancers may be located in introns or exons, and alternative splicing patterns could be determined by visualization of a sized transcription product.

Eight alterations in the G6PC gene were identified, including a new point mutation found so far only in Brazilian population and published by our group, two intronic mutations, a silent mutation, and four point mutations previously described. It was also analyzed the T1176C polymorphism that is in association with the R83C mutation. This polymorphism can be used as a marker in carrier and prenatal diagnosis of GSDIa families which have unidentified mutations and are informative for this marker. This study emphasizes that molecular genetic analysis is a reliable and convenient alternative to the enzyme assay in a fresh liver biopsy specimen to diagnose GSDIa.

VIII. Referências Bibliográficas

- AKANUMA, J.; NISHIGAKI, T.; FUJII, K.; MATSUBARA, Y.; INUI, K.; TAKAHASHI, K.; KURE, S.; SUZUKI, Y.; OHURA, T.; MIYABAYASHI, S.; OGAWA, E.; IINUMA, K.; OKADA, S.; NARISAWA, K. - Glycogen storage disease type Ia: molecular diagnosis of 51 Japanese patients and characterization of splicing mutations by analysis of ectopically transcribed mRNA from lymphoblastoid cells. **Am. J. Med. Genet.**, **91**:107-12, 2000.
- AKLI, S.; CHELL, J.; MEZARD, C.; GANDY, S.; KAHN, A.; POENARU, L. - A "G" to "A" mutation at position -1 of a 5' splice site in a late infantile form of Tay-Sachs disease. **J. Biol. Chem.**, **265**: 7324-7330, 1990.
- AMBRUSO, D. R.; McCABE, E. R. B.; ANDERSON, D.; BEAUDET, A. L.; BALLAS L. M.; BRANDT I. K., et al. - Infectious and bleeding complications in patients with glycogenosis Ib. **Am. J. Dis. Child.**, **139**:691-697, 1985.
- ANNABI, B.; HIRAIWA, H.; MANSFIELD, B.C.; LEI, K.; UBAGAI, T.; POLYMERPOULOS, M. H.; MOSES, S.W.; PARVARI, R.; HERSHKOVITZ, E.; MANDEL, H.; FRYMAN, M; CHOU, J. Y. - The gene for glycogen storage disease type 1b maps to chromosome 11q23. **Am. J. Hum. Genet.**, **62**:400-05, 1998.
- ARION, W. J.; LANGE, A. J.; WALLS, H. E. AND BALLAS, L. M. - Evidence of the participation of independent translocases for phosphate and glucose-6-phosphate in the microsomal glucose-6-phosphatase system. **J. Biol. Chem.**, **255**:10396-406, 1980.
- BATES E. J; HEATON G. M; TAYLOR C; KERNOHAN J. C; COHEN P. Debranching enzyme from rabbit skeletal muscle; evidence for the location of two active centers on a single polypeptide chain. **FEBS Lett.**, **58**:181-185, 1975.

- BELL, J. E.; HUME, R.; BUSUTTIL, A.; BURCHELL, A. - Immunocytochemical detection of microsomal glucose-6-phosphatase in human brain astrocytes. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, **19**: 429-435, 1993.
- BIALEK, D. S.; SHARP, H. L.; KANE, W. J.; ELDERS, J.; NORDLIE R. C. - Latency of glucose-6-phosphatase in type Ib glycogen storage disease. **J. Pediatr.**, **91**:838, 1977.
- BROWN, B. I. Diagnosis of glycogen storage disease: In Wapnir PA(ed). **Congenital metabolic myopathy**. Marcel Dekker, New York, 227-250, 1982.
- BURCHELL, A. - Molecular pathology of glucose-6-phosphatase. **FASEB J.**, **4**: 2978-2988, 1990.
- BURCHELL, A.; WADELL, I. D.; COUNTAWAY, J. L.; ARION, W. J.; HUME, R. - Identification of the human hepatic microsomal glucose 6-phosphatase enzyme. **FEBS Lett.**, **242**:153, 1988.
- CHEN, Y. T. - The glicogenoses. In: Rudolph, A. M. (ed). - **Rudolph's Pediatrics**. Norwalk, CT, Appleton & lange, 1991, p331.
- CHEN, Y. T.; BURCHELL, A. - Glycogen storage disease. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D. eds. - **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. 7th ed. New York, McGraw-Hill, 1995, p.935-65.
- CHEVALIER-PORST, F.; BOZON, D.; BONARDOT, A.; BRUNI, N.; MITHIEUX, G.; MATHIEU, M.; MAIRE, I. - Mutation analysis in 24 French patients with glycogen storage disease type 1a. **J. Med. Genet.**, **33**: 358, 1996.
- CHOU, J. Y. & MANSFIELD, B. C. - Molecular genetics of type 1 glycogen storage diseases. **TEM.**, **10**: 104, 1999.

- COLLINS, J. E.; BARLLET, K.; LEONARD, J. V.; AYNLEY-GREEN, A - Glucose production rates in type I glycogen storage disease. **J. Inher. Metabol. Dis.**, **13**:195, 1990.
- CORI G. T. - Glycogen structure and enzyme deficiencies in glycogen storage disease. **Harvey Lect.**, **48**: 145, 1954.
- CORI, G. T.; CORI, C. F. - Glucose 6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease. **J. Biol. Chem.**, **199**: 661, 1952.
- COTTON, R. G. H.; SCRIVER, C. R. - Proof of "Disease Causing" Mutation. **Hum. Mut.**, **12**: 1-3, 1998.
- DING, J. H; BROW, B. I.; COLEMAN, R. A.; CHEN, Y. T. Immunoblot analyses of glycogen debranching enzyme in different subtypes of glycogen storage disease type III. **J. Pediatr** **116**: 95-100, 1990.
- FENSKE, C. D.; JEFFERY, S.; WEBER, J. L.; HOULSTON, R. S.; LEONARD, J. V.; LEE, P. J. - Localization of the gene for glycogen storage disease type Ic by homozygosity mapping to 11q. **J. Med. Genet.**, **35**: 269-272, 1998.
- FERNANDES, J.; BERGER, R.; SMIT, G. P. A. - Lactato as a cerebral metabolic fuel for glucose 6-phosphatase in deficient children. **Pediatr. Res.**, **18**:335, 1984.
- GERIN, I.; VEIGA-DA-CUNHA, M.; ACHOURI, Y.; COLLET, J.; SCHAFTINGEN, E.V. - Sequence of a putative glucose 6-phosphate translocase, mutated in glycogen storage disease type Ib. **FEBS Lett.**, **419**: 235 – 38, 1997.
- GLUZMAN, Y. – SV-40 transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. **Cell**, **23**:175-182, 1981.

- GORDON R. B; BROWN D. H; BROWN B. I. Preparation and properties of the glycogen-debranching enzyme from rabbit liver. **Biochim. Biophys. Act.**, **289**: 97 – 107, 1972.
- HANAHAN, D. – Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. **J. Mol. Biol.**, **166**:557-80, 1983.
- HERS, H. G.; VAN HOOFF, F.; DE BARSY, T. - Glycogen storage disease. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D. eds. - **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. 6th ed. New York, McGraw-Hill, 1989. p.425.
- HOWELL, R.R.; WILLIAMS, J.C. The glycogen storage diseases, In Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL, Brown MS (eds): **The Metabolic Basis of Inherited Disease**. 5th ed. New York, McGraw-Hill 1983, p.141.
- HUE, L. - The role of futile cycles in the regulation of carbohydrate metabolism in the liver. **Adv. Enzymol.**, **52**:247, 1981.
- HWU, W.; CHUANG, S.; TSAI, L.; CHANG, M.; CHUANG, S.; WANG, T. - Glucose 6-phosphatase gene G327A mutation is common in chinese patients with glycogen storage disease type 1a. **Hum. Molec. Genet.**, **4**: 1095, 1995.
- KAJIHARA, S.; MATSUHASHI, S.; YAMAMOTO, K.; KIDO, K.; TSUJI, K.; TANAE, A.; FUJIYAMA, ITOH, T.; TANIGAWA, K.; UCHIDA, M.; SETOGUCHI, Y.; MOTOMURA, M.; MIZUTA, T.; SAKAI, T. - Exon redefinition by a point mutation within exon 5 of the glucose-6-phosphatase gene is the major cause of glycogen storage disease type 1a in Japan. **Am. J. Hum. Genet.**, **57**: 549-55, 1995.

- KARASAWA, Y.; KOBAYASHI, M.; NAKANO, Y.; AOKI, Y.; KAWA, S.; KIIYOSAWA, K.; SEKI, H.; KAWASAKI, S.; FURIHATA, K.; ITOH, N. - A case of glycogen storage disease type Ia with multiple hepatic adenomas and G727T mutation in the glucose-6-phosphatase gene, and a comparison with other mutations previously reported. **Am. J. Gastroenterol.**, **93**:1550-1553, 1998.
- KELLER, K. M.; SCHUTZ, M.; PODSKARBI, T.; BINDL, L.; LENTZE, M. J.; SHIN, Y. S. - A new mutation of the glucose-6-phosphatase gene in a 4-year-old girl with oligosymptomatic glycogen storage disease type Ia. **J. Pediatr.**, **132**:360-61, 1998.
- KIKUCHI, M.; HASEGAWA, K.; HANDA, I.; WATABE, M.; NARISAWA, K.; TADA, K. - Chronic pancreatitis in a child with glycogen storage disease type I. **Eur. J. Pediatr.**, **150**:852, 1991.
- KISHNANI, P. S.; BAO, Y.; WU, J. Y.; BRIX, A. E.; LIN, J. L.; CHEN, Y. T. - Isolation and nucleotide sequence of canine glucose-6-phosphatase mRNA: identification of mutation in puppies with glycogen storage disease type Ia. **Biochem. Mol. Med.**, **61**: 168-177, 1997.
- KOZÁK, L.; FRANCOVÁ, H.; HRABINCOVÁ, E.; STAATNA, S.; PESKOVÁ, K.; ELLEDER, M. - Identification of mutations in the glucose-6-phosphatase gene in Czech and Slovak patients with glycogen storage disease type Ia, including novel mutations K76N, V166A and 540del5. **Hum. Mut.**, **338**, 2000 (online citation).
- KOZÁK, L.; FRANCOVÁ, H.; HRABINCOVÁ, E.; STAATNA, S.; SPICKOVA, K.; ELLEDER, M. - DNA analysis in Czech and Slovak patients with glycogen storage disease type Ia. **J. Inher. Metabol. Dis.**, **21(suppl2)**:91, 1998.
- KRAWCZAK, M.; REISS, J.; COOPER, D. N. - The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. **Hum. Genet.**, **90**: 41-54, 1992.

- KUIVENHOVEN, J. A.; WEIBUSH, H.; PRITCHARD, H. P.; FUNKE, H.; BENNE, R.; ASSMANN, G.; KASTELEIN, J. J. P. - An intronic mutation in a lariat branchpoint sequence is a direct cause of an inherited human disorder (Fish-Eye Disease). **J. Clin. Invest.**, **98**: 358-64, 1996.
- KURE, S.; HOU, D. C.; SUZUKI, Y.; YAMAGISHI, A.; HIRATSUKA, m.; SUGIE, H.; KONDO, N.; MATSUBARA, Y.; NARISAWA, K. - Glycogen storage disease type Ib without neutropenia. **J. Pediatr.**, **137**:253-256, 2000.
- LAM, C. W.; BUT, W. M.; CHOY, K. W.; SHEK, C. C.; PANG, C. P.; HJELM, N. M. - A novel frameshift mutation in glucose-6-phosphatase gene causing Von Gierke disease in Chinese. **Inborn Errors of Metabolism and Biochemical Genetics**, 2311, 1997. (Abstract 395A).
- LAM, C. W.; BUT, W. M.; SHEK, C. C.; TONG, S. F.; CHAN, Y. S.; CHOY, K. W., TSE, W. Y.; PANG, C. P.; HJELM, N. M. - Glucose-6-phosphatase gene (727G>T) splicing mutation is prevalent in Hong Kong Chinese patients with glycogen storage disease. **Clin. Genet.**, **53**:184-90, 1998a.
- LAM, C. W.; LIANG, M. H.; PANG, C. P.; TONG, S. F. AND WONG, L. J. C. - A novel *Dra I* polymorphism in the 3' untranslated region of human glucose-6-phosphatase gene: useful for carrier detection and prenatal diagnosis of glycogen storage disease type 1a. **Clin. Genet.**, **53**:502-03, 1998b.
- LANGE, A. J.; ARGAUD, D.; EL-MAGHRABI, M. R.; PAN, W.; MAITRA, S. R.; PILKINS, S. J. - Isolation of a cDNA for the catalytic subunit of a rat liver glucose-6-phosphatase: regulation of gene expression in FAO hepatoma cells by insulin, dexamethasone and cAMP. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **201**:302-309, 1994.

- LANGE, A. J.; ARION, W. J.; BEAUDET, A. L. TYPE Ib glycogen storage disease is caused by a defect in the glucose-6-phosphate translocase of the microsomal glucose-6-phosphatase system. **J. Biol. Chem.**, **255**:8381, 1980.
- LEE, W.-J.; LEE, H.-M.; CHI, C.-S.; SHU, S.-G.; LIN, W.-H. - Genetic analysis of the glucose-6-phosphatase mutation of type Ia glycogen storage disease in a Chinese family. **Clin. Genet.**, **50**: 206-11, 1996.
- LEESON, T. S. & LEESON, C. R. - A célula. In: _____ - **Atlas de Histologia**. São Paulo, Editora Interamericana, 1990. p. 14-15.
- LEI, K. J.; CHEN, Y. T.; CHEN, H.; WONG, L. J. C.; LIU, J. L.; MCONKIE-ROSELL, A.; VAN HOVE, J. L. K.; OU, H. C. Y.; YEH, N. J.; PAN, L. Y.; CHOU, J. Y. - Genetic basis of glycogen storage disease type Ia: prevalent mutations at the glucose-6-phosphatase locus. **Am. J. Hum. Genet.**, **57**: 766-771, 1995c.
- LEI, K.; SHELLY, L. L.; BAOCHUAN, L.; SIDBURY, J. B.; CHEN, Y.; NORDLIE, R. C. - Mutations in the glucose 6-phosphatase gene are associated with glycogen storage disease types Ia and IaSP but not Ib and Ic. **J. Clin. Invest.**, **95**: 234, 1995b.
- LEI, K.; PAN, C.; LIU, J.; SHELLY, L. L.; CHOU, J. Y. - Structure-Function analysis of human glucose-6-phosphatase, the enzyme deficient in glycogen storage disease type Ia. **J. Biol. Chem.**, **270**: 11882-886, 1995a.
- LEI, K.; PAN, C.; SHELLY, L. L.; LIU, J.; CHOU, J. Y. - Identification of mutations in the gene for glucose-6-phosphatase, the enzyme deficient in glycogen storage disease type Ia. **J. Clin. Invest.**, **93**:1994-99, 1994.
- LEI, K.; SHELLY, L. L.; PAN, C.; SIDBURY, J. B.; CHOU, J. Y. - Mutations in the glucose 6-phosphatase gene that cause glycogen storage disease type Ia. **Science**, **262**: 580, 1993.

- LEVY, E.; THIBAUT, L. A.; ROY C. C.; BENDAYAN, M.; LEPAGE, G.; LETARTE, J.
- Circulating lipids and lipoproteins in glycogen storage disease type I with nocturnal intragastric feeding. **J Lipid Res.**, **29**:215, 1988.
- LIN, B.; HIRAIWA, H.; PAN, C. J.; NORDLIE, R. C.; CHOU, J. Y. - Type-1c glycogen storage disease is not caused by mutations in the glucose-6-phosphate transporter gene. **Hum. Genet.**, **105**:515-17, 1999.
- LIU, W.; QIAN, C.; FRANCKE, U. - Silent mutation induces exon skipping of fibrillin-1 gene in Marfan syndrome. **Nature Genetics**, **16**:328-29, 1997.
- McADAMS, A. J.; HUG, G.; BOVE, K. E. - Glycogen storage disease types I to X, Criteria for morphologic diagnosis. **Hum. Pathol.**, **5**:463-487, 1974.
- MICHELS, V. V.; BEAUDET, A. L. - Hemorrhagic pancreatitis in a patient with glycogen storage disease type I. **Clin. Genet.**, **17**:220, 1980.
- NARISAWA, K.; IGARASHI, Y.; OTOMO, H.; TADA, K. - New variant of glycogen storage disease type I probably due to a defect in the glucose-6-phosphate transport system. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **83**:1360, 1978.
- NICHOLS, B. A.; SETZER, P. Y.; BAINTON, D. F. - Glucose-6-phosphatase as cytochemical marker of endoplasmatic reticulum in human leucocytes and platelets. **J. Histochem. Cytochem.**, **32**:165-171, 1984.
- NISHIMURA, A.; MORITA, M.; NISHIMURA, Y.; SUGINO, Y. - A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. **Nucleic Acids Res.**, **18**:6169, 1991.

- NORDLIE, R. C.; SUKALSKI, K. A.; MUNOZ, J. J.; BALDWIN, J. J. - Type Ic, a novel glycogenosis. Underlying mechanisms. **J. Biol. Chem.**, **258**: 9739, 1983.
- ORITA, M.; SUZUKI, Y.; SEKIYA, T.; HAYASHI, K. - Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using polymerase chain reaction. **Genomics** **5**:874 - 9, 1989.
- PAN, C-J.; LEI, K-J.; CHOU, J. Y. - Asparagine-linked oligosaccharides are localized to a luminal hydrophilic loop in human glucose-6-fosfatase. **J. Biol. Chem.** **273**: 21658-662, 1998.
- PARVARI, R.; LEI, K. J.; SZONYI, L.; NARKIS, G.; MOSES, S.; CHOU, J. Y. - Two new mutations in the glucose-6-phosphatase gene cause glycogen storage disease in hungarian patients. **Eur. J. Hum. Genet.**, **5**: 191-95, 1997.
- PARVARI, R.; MOSES, S.; HERSHKOVITZ, E.; CARMI, R.; BASHAN, N. - Characterization of the mutations in the glucose 6-phosphatase gene in Israeli patients with glycogen storage disease type 1a: R83C in six Jews and a novel V166G mutation in a Muslim Arab. **J. Inher. Metab. Dis.**, **18**: 21, 1995.
- RAKE, J. P.; BERGE, A. M.; VISSER, G.; VERLIND, E.; NIEZEN-KONING, K. E.; BUYS, C. H. C.; SMIT, G. P.A; SCHEFFER, H. - Glycogen storage disease type Ia: recent experience with mutation analysis, a summary of mutations reported in the literature and a newly developed diagnostic flowchart. **Eur. J. Pediatr.**, **159**:322-330, 2000a.
- RAKE, J. P.; TEM BERG, A. M.; VERLIND, E.; VISSER, G.; NIEZEN-KONING, K. E.; BUYS, C. H. C. M.; SMIT, G. P. A.; SCHEFFER, H. - Glycogen storage disease type 1a: four novel mutations (175delGG, R170X, G266V and V338F) identified. **Hum. Mut.**, **13**:173, 1999.

- RAKE, J. P.; TEM BERG, A. M.; VERLIND, E.; VISSER, G.; NIEZEN-KONING, K. E.; BUYS, C. H. C. M.; SMIT, G. P. A.; SCHEFFER, H. - Identification of a novel mutation (867delA) in the glucose-6-phosphatase gene in two siblings with glycogen storage disease type 1a with different phenotypes. **Hum. Mut.**, **304**, 2000b (online citation).
- RICHARD, I.; BECKMANN, J. S. - How neutral are synonymous codon mutations? **Nature genetics**, **10**: 259, 1995.
- ROCHA, H.; CABRAL, AGUINALDO, C.; VILARINO, L. Identification of a novel nonsense mutation (Q24X) in the glucose-6-phosphatase gene of a Portuguese patient with GSDIa (von Gierke disease). **Hum. Mut.**, **175**, 2000 (online citation).
- ROGAN, P. K.; FAUX, B. M.; SCHNEIDER, T. D. - Information analysis of human splice site mutations. **Hum. Mut.**, **12**:153-171, 1998.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. - DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, **74**:5463, 1977.
- SARTORATO, E. L.; REIS, F. C.; NORATO, D. Y. J.; HACKEL, C. - A novel mutation in a Brazilian patient with Glycogen storage disease type 1a . **J. Inher. Metab. Dis.**, **21**: 447, 1998.
- SENIOR, B.; LORIDAN, L. Studies of liver glycogeneses, with particular reference to the metabolism of intravenously administered glycerol. **N. Engl. J. Med.**, **279**: 958, 1968.
- SEYDEWITZ, H. H. AND MATERN, D. - Molecular genetics analysis of 40 patients with glycogen storage disease type 1a: 100% mutation detection rate and 5 novel mutations. **Hum. Mut.**, **282**, 1999, (online citation).

- SHELLY, L. L.; LEI, K. J.; PAN, C. J.; SAKATA, S. F.; RUPPERT, S.; SCHUTZ, G., AND CHOU, J. Y. - Isolation of the gene for murine glucose-6-fosfatase, the enzyme deficient in glycogen storage disease type 1a. **J. Biol. Chem.**, **268**: 21482-85, 1993.
- SNAPPES, I.; VAN CREVELD S. - Un cas d'hypoglycémie avec acétonémie chez un enfant. **Bull. Mem. Soc. Med. Hop.**, **52**: 1315, 1928.
- STROPPIANO, M.; MAZZOTTI, R.; REGIS, S.; GATTI, R. - New Mutation (S298P) in a patient with glycogen storage disease type 1a. **Hum. Mut.** S329, 1998.
- STROPPIANO, M.; REGIS, S.; DIROCCO, M.; CAROLI, F.; GANDULLIA, P.; GATTI, R. - Mutations in the glucose-6-phosphatase gene of 53 Italian patients with glycogen storage disease type 1a. **J. Inher. Metabol. Dis.**, **22**:43-49, 1999.
- TALENTE, G. M.; COLEMAN, R. A.; ALTER, C.; BAKER, L.; BROWN, B. I.; CANNON, R. A.; CHEN, Y. T.; CRIGLER, J. F.; FERREIRA, P.; HAWORTH, J. C.; HRMAN, G. E.; ISSENMAN, R. M.; KEATING, J. P.; LINDE, R.; ROE, T. F.; SENIOR, B.; WOLFSDORF, J. I. - Glycogen storage disease in adults. **Ann. Intern. Med.**, **120**: 218-226, 1994.
- TRIOCHE, P.; FRANCOUAL, J.; CHALAS, J.; CAPEL, L.; BERNARD, O. AND LABRUNE, P. - Identification of three novel mutations (Q54P, W70X and T1081) in the glucose-6-phosphatase gene of patients with glycogen storage disease type 1a. **Hum. Mut.**, **14**:91, 1999.
- TRIOCHE, P.; FRANCOUAL, J.; CHALAS, J.; CAPEL, L.; LINDENBAUM, ^a; ODIÉVRE, M.; LABRUNE, P. - Genetic heterogeneity of glycogen storage disease type Ia in France: a study of 48 patients. **Hum. Mut.**, **371**, 2000 (online citation).

- TRIOCHE, P.; LABRUNE, P.; ODIÉVRE, M.; HEDCHOUËL, M.; DELEUZE, J. F.
Novel mutation (G188R) in the G6Pase gene of a patient with glycogen storage
disease type Ia. **Hum. Mut.**, (suppl.1):S323-24, 1998.
- VAN DE WERVE, G.; LANGE A.; NEWGARD, C.; MÉCHIN, M.; LI, Y.;
BERTELOOT, A. - New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by
the glucose 6-phosphatase system. **Eur. J. Biochem.**, 267:1533-49, 2000.
- VEIGA-DA-CUNHA M.; GERIN I.; CHEN, Y. T.; BARSY, T.; LONLAY, P.; DIONISI-
VICI, C.; FENSKE, C. D.; LEE, P. J.; LEONARD, J. V.; MAIRE, I.; ROSELL, A.
M.; SCHWEITZER, M. V.; SCHAFTINGEN, E. V. - A gene on chromosome 11q23
coding for a putative glucose-6-phosphate translocase is mutated in glycogen storage
disease types 1b and 1c. **Am. J. Hum. Genet.**, 63:976-83, 1998.
- VEIGA-DA-CUNHA M.; GERIN I.; CHEN, Y. T.; LEE, P. J.; LEONARD, J. V.; MAIRE
I.; WENDEL, U.; VIKKULA M.; VAN SCHAFTINGEN, E. - The putative glucose-
6-phosphate translocase gene is mutated in essentially all cases of glycogen storage
disease type I non-a. **Eur. J. Hum. Genet.**, 7:717-23, 1999.
- VEIGA-DA-CUNHA, M.; GERIN, I.; VAN SCHAFTINGEN, E. How many forms of
glycogen storage disease type I? **Eur. J. Pediatr.**, 159, 2000.
- VON GIERKE, E. - Hepato-nephro-megalia glycogenica. **Beitr. Pathol. Anat.**, 82: 497,
1929.
- WEGMANN, R.; MELLO DE OLIVEIRA, J. A. Histoenzymological test in vitro of the role
of glucose in the regulation of the glucose-6-phosphatase activity in the beta cells of
Langerhans islets. **Ann. Histochem.**, 14: 405-413, 1969.

- WOLFSDORF, J. I.; CRIGLER J. F. JR. - Cornstarch regimens for nocturnal treatment of young adults with type I glycogen storage disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, **65**:1507-11, 1997.
- WONG, L. J.; LIANG, M. H.; HWU, W. L.; LAM, C. W. - Linkage disequilibrium and linkage analysis of the glucose-6-phosphatase gene. **Hum. Genet.**, **103**:199-03, 1999.
- WOODHEAD, J. L.; FALLON, R.; FIGUEREDO, H.; LANGDALE, J.; MALCOM, A. D. B. - Alternative methodology of gene diagnosis. In: Davies, K. E. - **Human genetic diseases – a practical approach**. Oxford. IRL Press Limited, 1986. p.51-64.
- WU, M.; TSAI, F.; LEE, C.; LIN, S.; WU, J. - Identification of a novel missense mutation (T16A) in the glucose-6-phosphatase gene in a Taiwan Chinese patient with glycogen storage disease Ia (von Gierke disease). **Hum. Mut.**, **105**, 2000a, (online citation).
- WU, M.; TSAI, F.-J.; LEE, C.-C.; TSAI, C.-I.; WU, J.-Y. - A novel missense mutation (H119L) identified in a Taiwan chinese family with glycogen storage disease Ia (von Gierke disease). **Hum. Mut.**, **167**, 2000b, (online citation).
- ZINGONE, A.; HIRAIWA, H.; PAN, C. J.; LIN, B; CHEN, H.; WARD, J. M. AND CHOU, J. Y. - Correction of glycogen storage disease type Ia in a mouse model by gene therapy. **J. Biol. Chem.**, **275**:828-32, 2000.

1. Sequências flanqueadoras dos introns 1, 2, 3 e 4.

1 5'→3'
 //exon1// cattcttgggt atatct ----- 16pb
 tgcattcatt cagtaacca gaacttggtc tgtttttcca tag //exon2// 3000pb

2 5'→3'
 //exon2// gtaagcgtcc cagcccctgc agacagaagc tgagtataa cagacagttc 49pb
 tgggtactga tgatc---- ----- 64pb
 acaccttta ctccattctc tttcctgccc ttttag //exon3// 3000pb

3 5'→3'
 //exon3//gtaag aactcaccac tgggggtgtag gtgggtggagg gcaggaggca gctctc 51pb
 tctg tagctgacac accac----- ----- 70pbp
 ttacaacct cggaccgct gcaggggctg ttttctttgc tgaaggatct gcacctgtgt 1372pb
 tctgttatgg ttgcctcttc tgttgtag //exon4// 1400pb

4 5'→3'
 //exon4//gtat gggctgatct gactcccttc cttctcccc aaacccatt 44pb
 ccgtttctct ccctaatacag gacaaaatcc cagcattcca gccacatcct gtgtgtaatc 104pb
 agtactgtta gcatttctgt gggttgagag tcaagaatga gcaacttgaa atgattaatt 164pb
 tctataagag tgcccagatc tatagaatga attgtgtaga agttaccata catc----- 198pb
 aattccacag tcgcagaacg gaaggcatgt caccactcc tccaaacca cctctagcaa 1250bp
 ggtcccaatc cttccgatct ctacagtc tgccttcttc cactcaggca ttgctgttgc 1310bp
 agaaactttc agccacatcca cagcatctat aatgccagcc tcaagaaata ttttctcatt 1370pb
 accttcttcc tgttcagctt cgccatcgga //exon5// 1400 pb

*As bases em negrito e itálico mostram aonde estão localizadas as mutações encontradas no intron 3 do paciente 11 e no intron 4 do paciente 6.

2. Artigo aceito para publicação no *Journal of Human Genetics*

ORIGINAL ARTICLE

Fernanda de C. Reis · Heloisa C. Caldas
Denise Y.J. Norato · Ida Vanessa D. Schwartz
Roberto Giugliani · Maira G. Burin · Edi Lúcia Sartorato

Glycogen storage disease type Ia: molecular study in Brazilian patients

Received: November 13, 2000 / Accepted: December 25, 2000

Abstract Mutations in the glucose-6-phosphatase (*G6Pase*) gene are responsible for glycogen storage disease type Ia (GSDIa). This disease is characterized by growth retardation, hepatomegaly, hypoglycemia, hyperlipidemia, and lactic acidosis. In this study, we report mutations in the *G6PC* gene in 8 of 25 Brazilian patients with clinical symptoms of GSDIa. Five previously described mutations (R83C, Q347X, V338F, D38V, and G68R) were detected. The two most common mutations identified were R83C and Q347X, accounting for 8 of 14 (57.14%) mutant alleles. A 1176 single-nucleotide polymorphism and two intronic mutations (IVS3-58T>A and IVS4+10G>A) were also analyzed. We used the minigene strategy in order to verify the effect of these intronic mutations on the splicing mechanism. This study emphasizes that molecular genetic analysis is a reliable and convenient alternative to the assay of enzyme activity in a fresh liver biopsy specimen for diagnosing GSDIa.

Key words Glycogen storage disease type Ia · Glucose-6-phosphatase · Mutation · DNA-based diagnosis · Brazilian

Introduction

Type Ia glycogen storage disease (GSDIa; von Gierke disease; MIM no. 232200), is caused by a deficiency of glucose-6-phosphatase (*G6Pase*) activity in the liver, kidney, and

intestinal mucosa, with the excessive accumulation of glycogen in these organs. The *G6Pase* enzyme catalyses the terminal steps in gluconeogenesis and glycogenolysis and the conversion of glucose-6-phosphate (G6P) to glucose and phosphate. It is considered to be the key enzyme in glucose homeostasis. GSDIa is clinically characterized by short stature, doll-like facies, growth retardation, hepatomegaly, lactic acidemia, hyperuricemia, and hyperlipidemia (Chen and Burchell 1995). Current treatments of GSDIa are directed toward controlling symptomatic hypoglycemia. Patients receive continuous nasogastric infusion of glucose or frequent oral administration of uncooked cornstarch. Both treatments significantly reduce the metabolic abnormalities of GSDIa and greatly improve the prognosis, but the underlying pathological process remains untreated.

Somatic gene therapy is one attractive alternative to dietary therapy for GSDIa, whereby a functional recombinant *G6Pase* gene is targeted to the affected organ in vivo (Zingone et al. 2000). GSDIa, the most prevalent form of glycogen storage disease, is transmitted as an autosomal recessive trait, with an estimated overall frequency of 1:100 000. While a tentative diagnosis of GSDIa can be made from the characteristic clinical picture and various loading tests, an assay of *G6Pase* activity in liver biopsy specimens is essential to distinguish the disease from glycogen storage disease type Ib. Glycogen storage disease type Ib is associated with neutropenia and neutrophil dysfunction, which indicates that the putative *G6P* translocase gene (*G6PT1*), recently cloned by Gerin et al. (1997), is likely to have an important function in leukocytes. Investigation of patients diagnosed with GSDI non-a, (GSD Ib, Ic, or Id) showed mutation in the *G6PT1* gene, therefore indicating that they were GSDIb patients. At present, available evidence indicates that there are only two types of GSDI: GSDIa and GSDI non-a. Diagnosis can be done by enzymological tests and confirmed by mutation analysis of the respective genes (Veiga-da-Cunha et al. 2000). Characterization of the *G6Pase* gene by Lei et al. (1993) enabled the identification of the mutations causing GSDIa. This provides an option to apply DNA-based diagnosis for carrier detection and prenatal diagnosis. Identification of the

F. de C. Reis · H.C. Caldas · E.L. Sartorato (✉)
CBMEG — UNICAMP, Caixa Postal 6109, CEP 13083-970,
Campinas, SP, Brazil
Tel. +55-19-3788-1147; Fax +55-19-3788-1089
e-mail: sartor@unicamp.br

D.Y.J. Norato
Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas — SP,
Brazil

I.V.D. Schwartz · R. Giugliani · M.G. Burin
Serviço de Genética Médica/Hospital das Clínicas de Porto Alegre,
Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, Porto Alegre — RS, Brazil

mutations causing GSDIa provides an insight into the structure-function relation of G6Pase catalysis by revealing the structural roles of specific amino acid residues (Parvari et al. 1999). The *G6Pase* human gene is located on chromosome 17q, contains five exons, spans 12.5kb, and encodes endoplasmic reticulum membrane-associated protein containing 357 amino acid residues (Lei et al. 1993; Chou and Mansfield 1999). So far, more than 50 different mutations in the *G6Pase* gene have been identified.

In the present study, we describe the results of mutation analysis of the *G6Pase* gene in 24 unrelated Brazilian GSDIa families, and the construction of minigenes in order to analyze whether two intronic mutations, one located in intron 3 and the other in intron 4, could be responsible for an aberrant mRNA splicing. Exon skipping is a common mutational mechanism, usually caused by changes in the consensus sequences at splice sites or lariat branch-point regions. Sequences outside these regions can also affect the inclusion or exclusion of exons. Such splicing enhancers may be located in introns or exons, and alternative splicing patterns could be determined by the visualization of a sized transcription product. In our study, we used the minigene strategy to determine the pathological nature of these intronic mutations.

Subjects and methods

Subjects

Twenty-five GSDIa patients from 24 unrelated families were investigated. Fourteen families came from the south-east and the other 10 came from the southern part of Brazil. The diagnosis of GSDIa was based on the typical clinical and laboratory findings, such as hepatomegaly, recurrent hypoglycemia, hyperuricemia, and doll-like facies. The diagnosis was confirmed in only 4 patients by the measurement of enzyme activity in fresh liver biopsy specimens. Twenty-one patients had not undergone a liver biopsy prior to our molecular genetic analyses, but displayed the characteristic clinical and laboratory findings of GSDIa. All patients gave their informed consent prior to their inclusion in this study.

Methods

Identification of mutations in GSDIa patients. Genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes, using standard procedures. The five exons of the *G6Pase* gene and their flanking intron-exon junctions were polymerase chain reaction (PCR) amplified, using previously described primers (Lei et al. 1993). Sequence analysis was performed by the cycle-sequencing method, using a Thermo Sequenase radiolabeled terminator cycle sequencing kit (Amersham, ■■■) and a Pharmacia (■■■) $\alpha^{32}\text{P}$ -labeled terminator pack. The sequencing reaction was performed according to the manufacturer's protocol.

Polymorphism analysis. A single-nucleotide polymorphism occurs at position 1176, where the presence of T instead of C generates a *DraI* restriction site. The PCR product of exon 5 is 647bp in size. In the presence of a T nucleotide at position 1176, *DraI* restriction enzyme cuts the PCR product into a 572-bp and a 75-bp fragment. Enzymatic digestion of PCR products was performed as described elsewhere (Lam et al. 1998).

Construction of minigenes. The effects of the IVS3-58T>A and IVS4+10G>A mutations, located in introns 3 and 4, respectively, were investigated using a minigene strategy. The constructions exon 3-intron 3-exon 4 (minigene 1) and exon 4-intron 4-exon 5 (minigene 2), were PCR amplified from the patients, and from control genomic DNA using the following set of primers (minigene 1): 5'-CCATGGGCAC AGCAGGTCTAGACTAC-3' (sense); 5'-CTGACGGAT CCAGCAACAACCTTGATG-3' (antisense); (minigene 2): 5'-GGGATTCTAGACTGTGCAGCTGAATGTCTG-3' (sense) (Kajihara et al. 1995); 5'-CTGGGTTTCTCCAGG ATCCACAGGAGGTC-3' (antisense) (Kajihara et al. 1995). The fragments were digested with *XbaI* (within sense primer) and *BamHI* (within antisense primer), purified with a Concert Rapid Gel Extraction System (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA), and then ligated to the expression vector pSVL (Pharmacia LKB, ■■■) to create minigene constructs that included the *G6Pase* sequence containing the intronic mutation.

In-vitro transient expression. COS-7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Cultilab, ■■■) supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum (Cultilab). The wild-type and the mutant pSVL vector were transfected into COS-7 cells by the calcium-phosphate method, using a calcium phosphate transfection system (GIBCO BRL), to transient expression. After incubation at 37°C for 72h, the transfected cells were suspended in a small volume of isotonic buffer. Total mRNA was extracted with a QuickPrep Micro mRNA Purification Kit (Amersham); it was reverse-transcribed, and then PCR amplified, using a ThermoScript reverse transcription (RT)-PCR System (GIBCO BRL). The specific primers for the cDNA amplification were (minigene 1): 5'-ACTACG TGATGGTCACATCT-3' (sense); 5'-CAGCAACA ACTTGATGAGGA-3' (antisense); (minigene 2): 5'-GTCGTGCAGCTGAATGTCTG-3' (sense) (Kajihara et al. 1995); 5'-TCCAGAGTCCACAGGAGGTC-3' (antisense) (Kajihara et al. 1995). Ten microliters of the PCR products were electrophoresed in 2% agarose gel.

Results

Mutation analysis of the *G6Pase* gene was performed by direct sequencing. We identified mutations on both alleles in eight patients studied. The mutations identified are listed in Table 1. A total of five different mutations was detected; four missense mutations (G68R, V338F, D38V, and R83C),

Table 1. Distribution and frequency of mutations in 14 *G6Pase* alleles of GSDIa patients

Mutation name	Nucleotide change	Exon	No. of alleles	Frequency (%)
R83C	326C → T	2	4	28.57
Q347X	1118C → T	5	4	28.57
G68R	281C → T	1	2	14.28
V338F	1012G → T	5	2	14.28
D38V	192A → T	1	2	14.28
Total			14	100

GSDIa, Type Ia glycogen storage disease

and one nonsense mutation (Q347X). R83C and Q347X were the most common mutations in the patients, accounting for 8 of 14 (57.14%) mutant alleles. Two patients were homozygous for the R83C mutation and two were homozygous for the Q347X mutation. One patient was homozygous for the G68R mutation, which was first described in this country (Sartorato et al. 1998), two brothers were homozygous for V338F (2/14), and one patient was homozygous for D38V.

We also studied a known polymorphism, 1176T/C, described by Lam et al. (1998). The polymorphism (nucleotide C) was present in 70% of the GSDIa alleles and in 60% of the alleles from 50 healthy controls. According to Wong et al. (1998), the nucleotide 1176C is in linkage disequilibrium with the R83C mutation, and this was confirmed in our patients. The 1176 nucleotide polymorphic marker can be used in the carrier and prenatal diagnosis of GSDIa families that have unidentified mutations and are informative for this marker.

The patient with the G68R mutation in exon 1 also presented one intronic mutation (IVS3-58T>A) in a homozygous condition. This mutation was investigated by the minigene technique, and the construction, exon 3-intron 3-exon 4, cloned into the pSVL vector, had a size of 1.6kb. After the transfection, cDNA was amplified by PCR and the amplification product had an expected size of 171 pb for the mutant and the control construction. No differences between the normal and mutant sequence were detected, showing that the IVS3-58T>A mutation did not cause an alternative splicing mechanism.

The IV4S+10G mutation was found in a heterozygous condition in a patient who did not have any other mutations in the gene coding region. The intron-exon junctions from the *G6PC* gene of this patient were amplified and direct sequenced, and no other mutations were found. The minigenes containing exon 4-intron 4-exon 5 cloned into the pSVL vector had a size of 1.64kb. After the transfection, cDNA was amplified by PCR and the amplification product had an expected size of 236pb for the mutant and the control construction. This demonstrates that there were no differences between the normal and mutant transcripts, and therefore the IV4S+10G mutation is not responsible for an aberrant splicing in the gene.

Discussion

In terms of phenotype-genotype correlation, patients with the R83C mutation showed clinical and biochemical manifestations that were similar to the known pattern of the disease. This mutation has already been examined for *G6Pase* activity in transient expression assays (Lei et al. 1993) and the mutant had no detectable phosphohydrolase activity. This mutation alters Arg⁸³, an amino acid residue that contributes to the active center of the enzyme. The stringent structural requirement of codon 83 suggests that this amino acid residue in *G6Pase* may also be involved in positioning the phosphate (Lei et al. 1995). The mutation Q347X, which converts a glutamine at position 347 to a stop codon, inactivates *G6Pase* activity, because it causes truncation of the carboxy terminal 11 amino acid residues in human *G6Pase* (Lei et al. 1994). A similar mutation frequency in the *G6Pase* gene was observed in Caucasian patients from the United States (Lei et al. 1995) and northwest Europe (Chevalier-Porst et al. 1996; Rake et al. 1999), where R83C and Q347X account for approximately 50% of all mutant alleles. The ethnic origins of the Brazilian population are highly heterogeneous, with the population being composed of immigrants from Europe, Africa, and Asia, as well as Amerindian groups, resulting in a complex race admixture. The Portuguese contribution is one of the most ancient and predominant ones, beginning in the sixteenth century with the colonization of Brazil. These observations indicate that the R83C and Q347X mutations may be relatively common in Caucasians and could have spread through European migration in recent centuries.

The G68R mutation is situated in the transmembrane helices of the *G6Pase* enzyme, and, although no enzymatic assay has been done, an alteration in this region may influence the stability of the enzyme structure and, consequently, its activity.

The V338F mutation was recently described in a compound heterozygous Dutch GSDIa patient (Rake et al. 1999). Although it remains to be demonstrated by expression analysis whether this mutation leads to *G6Pase* deficiency, V338F is a true mutation, considering that this mutation is recurrent in homozygous form in GSDIa patients. According to Rake et al. (1999), the substitution of valine by phenylalanine at codon 338 could affect the activity or stability of *G6Pase*, because phenylalanine contains an aromatic ring instead of the aliphatic nonpolar side chain contained in valine.

In the *G6Pase* gene, we identified another missense mutation (D38V) in exon 1 in a patient whose GSDIa diagnosis was confirmed by the lack of *G6Pase* activity shown in the biochemical analysis of a liver biopsy sample. This mutation, which was previously described only in the heterozygous condition (Chevalier-Porst et al. 1996), changes an acidic amino acid residue (aspartic acid) to a nonpolar hydrophobic one (valine) in the middle of the first predicted transmembrane spanning domain. Analysis of this mutation by site-directed mutagenesis, followed by transient expres-

sion, demonstrated that the D38V mutation abolishes G6Pase activity.

In 17 patients with clinical GSDIa symptoms, we did not find mutations in the coding region that could be responsible for the disease. Although they had the clinical characteristics of GSDIa, these patients had not undergone a liver biopsy for the biochemical analysis of G6Pase activity, and we can presume that the alteration in the *G6PC* gene, responsible for the patients' phenotype, could be located in the noncoding region, or that they are GSDI non-a patients.

In GSDIa, the apparent absence of phenotypical heterogeneity could be related to our inability or failure to recognize phenotypes, which was demonstrated by the study of one of our patients who had the D38V mutation. She was 39 years old at the time of biochemical investigation, and the typical symptoms of GSDIa had been absent during infancy. The biochemical investigation was performed mainly because of the existence of GSDIa family history. So we could speculate that GSDIa could, in fact, be a disease with a large phenotypic variability. It is possible that mild cases may remain misdiagnosed, as the enzyme assay is performed only in severe cases when a liver biopsy is required, and occasionally, liver biopsies may be performed without enzymatic analysis.

In conclusion, the molecular genetic analysis presented in this study is a noninvasive, highly efficient, and reliable method for the diagnosis of GSDIa. It is a convenient alternative to enzyme studies in liver tissue obtained by biopsy.

Acknowledgments We thank Dr. Kajihara for sending us the pSVL vector with the normal sequence of the minigene exon 4-intron 4-exon 5 of the *G6PC* gene, and we thank Maria Madalena V. Rosa for technical support. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo — FAPESP.

References

- Chen YT, Burchell A (1995) Glycogen storage disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, pp 935-965
- Chevalier-Porst F, Bozon D, Bonardot A, Bruni N, Mithieux G, Mathieu M, Maire I (1996) Mutation analysis in 24 French patients with glycogen storage disease type 1a. *J Med Genet* 33:358-360
- Chou JY, Mansfield BC (1999) Molecular genetics of type 1 glycogen storage diseases. *■* 10:104-113
- Gerin I, Veiga-da-Cunha M, Achouri Y, Collet J, Schaftingen EV (1997) Sequence of a putative glucose 6-phosphate translocase, mutated in glycogen storage disease type 1b. *FEBS Lett* 419:235-238
- Kajihara S, Matsubashi S, Yamamoto K, Kido KM, Tsuji K, Tanaka A, Fujiyama S, Itoh T, Tanigawa K, Uchida M, Setoguchi Y, Motomura M, Mizuta T, Sakai T (1995) Exon redefinition by a point mutation within exon 5 of the glucose-6-phosphatase gene is the major cause of glycogen storage disease type 1a in Japan. *Am J Hum Genet* 57:549-555
- Lam CW, Liang MH, Pang CP, Tong SF, Wong LJ (1998) A novel *Drai* polymorphism in the 3' untranslated region of human glucose-6-phosphatase gene: useful for carrier detection and prenatal diagnosis of glycogen storage disease type 1a. *Clin Genet* 53:502-503
- Lei KJ, Shelly LL, Pan CJ, Sidbury JB, Chou JY (1993) Mutations in the glucose 6-phosphatase gene that cause glycogen storage disease type 1a. *Science* 262:580-583
- Lei KJ, Pan CJ, Shelly LL, Liu JL, Chou JY (1994) Identification of mutations in the gene for glucose-6-phosphatase, the enzyme deficient in glycogen storage disease type 1A. *J Clin Invest* 93:1994-1999
- Lei KJ, Shelly LL, Baochuan L, Sidbury JB, Chen Y, Nordlie RC (1995) Mutations in the glucose 6-phosphatase gene are associated with glycogen storage disease types 1a and 1aSP but not 1b and 1c. *J Clin Invest* 95:234-240
- Parvari R, Isam J, Moses SW (1999) Glycogen storage disease type 1A in three siblings with the G270V mutation. *J Inher Metab Dis* 22:149-154
- Rake JP, ten Berg AM, Verling E, Visser G, Niezen-Koning KE, Buys CHCM, Smit GPA, Scheffer H (1999) Glycogen storage disease type 1a: four novel mutations (175delGG, R170X, G266V and V338F) identified. *Hum Mut* 13:173-176
- Sartorato EL, Reis FC, Norato DYJ, Hackel C (1998) A novel mutation in a Brazilian patient with glycogen storage disease type 1a. *J Inher Metab Dis* 21:447-■
- Veiga-da-Cunha M, Gerin I, Van Schaftingen E (2000) How many forms of glycogen storage disease type 1? *Eur J Pediatr* 159:314-318
- Wong LJ, Liang MH, Hwu WL, Lam CW (1998) Linkage disequilibrium and linkage analysis of the glucose-6-phosphatase gene. *Hum Genet* 103:199-203
- Zingone A, Hiraiwa H, Pan CJ, Lin B, Chen H, Ward JM, Chou JY (2000) Correction of glycogen storage disease type 1a in a mouse model by gene therapy. *J Biol Chem* 275:828-832