

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/ 42471

IB/ 80163

INSTITUTO DE BIOLOGIA



OK

Universidade Estadual de Campinas



Rodrigo Franco de Carvalho

**CARACTERIZAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE DA
FOSFATIDILINOSITOL GLICAN-CLASSE A (PIG-A) NA
HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA**

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Agência Financiadora: CAPES

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Rodrigo Franco de Carvalho
e aprovada pela Comissão Julgadora.

04/08/2000

Rodrigo Franco de Carvalho

**CARACTERIZAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE DA
FOSFATIDILINOSITOL GLICAN-CLASSE A (PIG-A) NA
HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Mestre em Genética
e Biologia Molecular; área de concentração em
Genética Humana e Médica

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa
Agência Financiadora: CAPES

Campinas, 04 de agosto de 2000



UNIDADE IB 180163

N.º CHAMADA: 1/UNICAMP

C253c

V. Ex.

TOMBO BC/42471

PROC. 96-278100

C ☐ D ☒

PREÇO R\$ 90,00

DATA 05/10/00

N.º CPD

CM-00145917-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C253c **Carvalho, Rodrigo Franco de**
Caracterização de mutações no gene da fosfatidilinositol glican-
Classe a (Pig-A) na hemoglobinúria paroxística noturna/ Rodrigo
Franco de Carvalho. - Campinas, SP. [s.n.], 2000
69f. illus.

Orientador: Fernando Ferreira Costa
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Mutação (Biologia). 2. Anemia. 3. Trombose.
I. Costa, Fernando Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

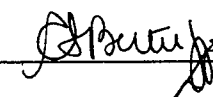
Campinas, 04 de agosto de 2000

BANCA EXAMINADORA

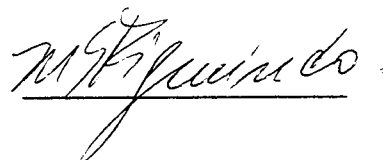
Prof. Dr. FERNANDO FERREIRA COSTA (Orientador)



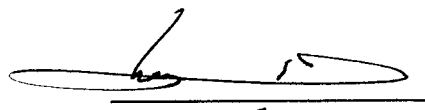
Profa. Dra. CARMEN SILVIA BERTUZZO



Profa. Dra. MARIA STELLA FIGUEIREDO



Profa. Dra. CHRISTINE HACKEL



Dedico este Trabalho à minha mãe, Maria José, pela constante dedicação e estímulo.

***Ao meu pai, Flavius, e a meu avô, José Maria, pelo
gosto da ciência.***

Agradecimentos

Ao prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, pela oportunidade, orientação e atenção.

Ao prof. Dr. Valder R. Arruda, co-orientador deste trabalho, pelo idealismo e participação.

À profa. Sara T. O. Saad, pelo interesse e sugestões.

Aos amigos do Laboratório de Terapia Gênica, que contribuíram de maneira fundamental para a elaboração desta dissertação, pela inestimável participação e agradável convivência.

A todas as pessoas que estiveram direta ou indiretamente envolvidas no andamento e execução deste projeto.

Agradecimentos Especiais

Às minhas avós, Balba e Giô, pelo carinho e torcida.

À família Pignatari Drucker (Sonia, José, Bi, Ni e Cláudio), pela amizade e companheirismo de todos esses anos.

À querida amiga Flavia N. Medeiros, pela atenta revisão na estruturação final do texto.

Ao meu irmão Alexandre.

À “família” 92 (Dani&Ricardo, Renato, Joel, Cris, Angel, Bá, Jú, Hermes&Sônia, Dri, Maras, Mineiro, Frank “O Excelso”, Alysson, Alexandre, Marcus Smolka e Veri) por toda bagunça proporcionada.

Aos amigos e amigas da Vila São João.

I.	RESUMO.....	i
II.	SUMMARY	ii
III.	INTRODUÇÃO	01
	A hemólise e o Sistema Complemento	04
	Tromboses.....	05
	Distúrbios da Medula Óssea	05
	As Proteínas	06
	A Via Biossintética do GPI	09
	O Gene PIG-A	10
IV.	OBJETIVO	13
V.	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	15
	CASUÍSTICA	16
	Histórico dos Pacientes Seleccionados (1997-1998)	17
	MÉTODOS.....	22
	Extração do DNA Genômico	22
	Estudo do Gene PIG-A	23
	Identificação das Mutações.....	25
	a) CSGE	25
	b) Seqüenciamento.....	26
	c) Clonagem	27
VI.	RESULTADOS	31
VII.	DISCUSSÃO	36
VIII.	CONCLUSÕES	41
X.	BIBLIOGRAFIA.....	43

A	adenina
AA	anemia aplástica
AP	sítio apúrinico ou apirimidínico
arg	arginina
C	citossina
CHCM	conteúdo de hemoglobina corpuscular média
cm	centímetro
CRE	<i>cAMP response element</i>
CSGE	<i>Conformation Sensitive Gel Electrophoresis</i>
dATP	desoxiadenina-trifosfato
dCTP	desoxicitosina-trifosfato
ddATP	didesoxiadenina-trifosfato
ddCTP	didesoxicitosina-trifosfato
ddGTP	didesoxiguanina-trifosfato
ddITP	didesoxiinosina-trifosfato
ddTTP	didesoxitimina-trifosfato
dGTP	desoxiguanina-trifosfato
DMP	<i>dolichol-phosphate mannose</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotreitól
dTTP	desoxitimina-trifosfato
EDTA	sal dissódico do ácido etilenodinitrotretacético
FI	fosfatidilinositol
fl	femtolitro
G	guanina
g/dl	gramas por decilitro
GB	glóbulos brancos
GlcNAc	N-acilglicosamino
GPI	glicosilfosfatidilinositol
GV	glóbulos vermelhos
GVHD	<i>graft versus host disease</i>
G6PD	glicose-6-fosfato desidrogenase
HA	<i>Heteroduplex Analysis</i>
HC	Hospital das Clínicas
HCL	ácido clorídrico
HCM	hemoglobina corpuscular média
Hb	hemoglobina

HPN	hemoglobinúria paroxística noturna
Htc	hematócrito
IL	interleucina
IPTG	isopropil- β ,D-tiogalactosídio
kb	kilobase
KCL	cloreto de potássio
kDa	kiloDalton
kv	kilovolt
LB	Luria-Bertani
leu	leucina
LMC	leucemia mielóide crônica
M	Mol; Molar
MgCl₂	cloreto de magnésio
ml	mililitro
mM	milimolar
NH₄Ac	acetato de amônio
NH₄Cl	cloreto de amônio
NH₄HCO₃	bicarbonato de amônio
NH₄SO₄	sulfato de amônio
pb	par de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pg	picograma
PIG-A	<i>phosphatidylinositolglycan-class A</i>
pmol	picomol
RE	retículo endoplasmático
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	<i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
SMD	síndrome mielodisplásica
SSCP	<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>
T	timina
TMO	transplante de medula óssea
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
UDP	uridina difosfato
UPAR	<i>urokinase plasminogen activator receptor</i>
VCM	volume corpuscular médio
X-GAL	5-bromo-4 cloro-3 indolil- β -galactosídio
Xp.	braço curto do cromossomo X
[γ-P³³]	sótopo gama do fósforo 33
μg	micrograma
μl	microlitro

Figura I: estrutura da molécula de GPI	10
Figura II: localização cromossômica do gene PIG-A	11
Figura III: série granulocítica; marcação da CD 59 (HPN1)	17
Figura IV: série granulocítica; marcação da CD 55 (HPN1)	17
Figura V: série granulocítica; marcação da CD 59 (HPN2)	18
Figura VI: série granulocítica; marcação da CD 55 (HPN2)	18
Figura VII: série granulocítica; marcação da CD 59 (HPN3)	19
Figura VIII: série granulocítica; marcação da CD 55 (HPN3)	19
Figura IX: série granulocítica; marcação da CD 59 (HPN7)	21
Figura X: série granulocítica; marcação da CD 55 (HPN1)	21
Figura XI: representação esquemática do gene da PIG-A	24
Figura XII: CSGE – promotor/exon 1 (HPN3)	33
Figura XIII: CSGE – exon 2A (HPN1)	33
Figura XIV: CSGE – exon 2A (HPN4)	33
Figura XV: CSGE – exon 2A (HPN6)	33
Figura XVI: CSGE – exon 6 (HPN7)	33
Figura XVII: CSGE – exon 2B (HPN3)	33
Figura XVIII: HPN 3 exon 2 (fragmento B)	34
Figura XIX: HPN 7 exon 6	34
Figura XX: HPN 6 exon 2 (fragmento A)	35
Figura XXI: representação esquemática do peptídeo PIG-A	40

Lista de Tabelas

Tabela I: proteínas ligadas pelo GPI nas células sangüíneas	07
Tabela I: proteínas ligadas pelo GPI nas células sangüíneas (cont.)	07
Tabela II: índices hematimétricos	21
Tabela III: fragmentos de amplificação do gene PIG-A	23
Tabela IV: lista dos primers utilizados	23
Tabela V: presença de heteroduplexes detectados por CSGE	32

A hemoglobínúria paroxística noturna é uma síndrome hematológica adquirida caracterizada pelo surgimento de hemólise intravascular crônica mediada pelo complemento, trombozes e alterações na hematopoese. As alterações moleculares subjacentes a complexidade clínica dessa síndrome são relativamente simples, consistindo na ausência de um grupamento glicofosfolipídico (GPI) responsável pela ligação de diversas proteínas na membrana citoplasmática, em função da ocorrência de mutações somáticas no gene PIG-A, localizado no cromossomo X.

O GPI é responsável pela ligação de aproximadamente vinte proteínas na membrana das células sanguíneas. Pelo menos duas dessas proteínas, a CD55 e a CD59, atuam na inibição da ação do complemento na membrana celular. Portanto, a ausência da síntese do GPI pode levar ao surgimento da HPN.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo a caracterização de mutações somáticas no gene PIG-A em pacientes com HPN, assistidos pelo Hemocentro-UNICAMP.

O gene PIG-A foi analisado a partir de amostras de DNA provenientes da medula óssea e do sangue periférico. O rastreamento das mutações foi realizado por CSGE, direcionando o seqüenciamento para a identificação das mutações.

A análise molecular do gene PIG-A possibilitou a identificação de três mutações de ponto em três pacientes: uma transição G→A na extremidade 5' do segundo intron, uma transversão T→A na segunda base do codon 430 (Leu430→stop) e uma perda ΔA na terceira base do codon 63 (Arg63).

Os dados obtidos confirmam a tendência para o surgimento de pequenas alterações no gene PIG-A na HPN. Este trabalho representa a primeira descrição de mutações no gene PIG-A em pacientes brasileiros com HPN.

Palavras-chave: hemoglobínúria paroxística noturna, hemólise intravascular, complemento, GPI, PIG-A, mutação

Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) is an acquired hematological syndrome characterized by chronic intravascular hemolysis mediated by complement, thrombotic events and alterations in the hematopoiesis. The molecular alterations subjacent to the syndrome's complexity are relatively simple and consists in the absence of the glycosyl phosphatidylinositol (GPI) group, responsible for the attachment of several proteins in the cytoplasmatic membrane, as a consequence of somatic mutations in the PIG-A gene, located on the X chromosome.

The GPI group is responsible for the attachment of about twenty proteins in the blood cell's membrane. At least two of them, CD55 and CD59, are responsible for the inhibition of complement's action on the cellular membrane. Thus, the absence of GPI's biosynthesis can lead to HPN.

Since mutations in the PIG-A gene are always present in patients with PNH, the objective of this study was the characterization of somatic mutations in the PIG-A gene in Brazilian patients. These patients were diagnosed in the Hemocentro-UNICAMP.

The PIG-A gene's analysis was made using DNA samples derived from the bone marrow and peripheral blood. It was used the CSGE for the mutation's screening and sequencing methods to identify the detected mutations.

The molecular analysis enabled the identification of three point mutations in three patients: one G→A transition in the second intron's 5' portion, one T→A transversion in the 430 codon's second base (Leu430→stop) and one deletion ΔA in the 63 codon's third base.

The present data shows the tendency for the constitution of small mutations in the PIG-A gene in Brazilian patients with PNH. This study represents the first description of mutations in the PIG-A gene in Brazilian population.

Key-words: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, intravascular hemolysis, complement, GPI, PIG-A, mutation

INTRODUÇÃO

A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma desordem hematológica adquirida (Rosse, 1995; Luzzato e Bessler 1996). Sua fisiopatogenia é complexa, acarretando múltiplos distúrbios e complicações clínicas. A HPN pode manifestar-se em qualquer idade, ocorrendo em ambos sexos de uma forma equitativa (Luzzato e Bessler 1996). Estima-se que a sua incidência média na população mundial seja de aproximadamente um caso para cada cem mil indivíduos (Rosse, 1997). Raramente surge na infância, sendo mais freqüentemente observada em adolescentes e adultos (Rosse, 1995).

Um extenso acompanhamento estatístico (Hillmen et al, 1995), realizado com oitenta pacientes HPN em uma instituição de saúde inglesa, revelou que a idade média para o diagnóstico da doença era de 42 anos, havendo registros de diagnósticos aos 16 e 75 anos. Já foi também reportado o surgimento da síndrome aos 2 e aos 83 anos (Rosse, 1995). A estimativa média de sobrevida após o diagnóstico foi calculada em 10 anos, com 28% dos pacientes apresentando uma sobrevida igual ou superior a 25 anos (aspecto crônico). Destes últimos, doze (15% do total) entraram em processo de remissão espontânea da doença, com o desaparecimento total dos sintomas clínicos.

Historicamente, a primeira caracterização detalhada da HPN é atribuída a Strübing em 1882 (Luzzato e Bessler, 1996; Rosse, 1997). Ele descreveu um indivíduo que apresentava "hematuria" após o sono, fato que ajudou a batizar a doença. Observou que o plasma do paciente era vermelho, sugerindo a destruição de eritrócitos na corrente sangüínea (hemólise intravascular). Detectou também a presença de material sólido no plasma, de fina granulação, classificando-o como hemossiderina. Posteriormente, foi averiguado que o processo de hemólise era uma consequência direta da ativação do sistema do complemento sobre uma porcentagem das células sangüíneas. A descoberta de uma ligação entre o processo de hemólise e a ativação do complemento data do início do século (1913) e é

atribuída a Hijmans van den Bergh. Entretanto, a percepção de que havia hemácias afetadas, comparativamente mais sensíveis à destruição pelo complemento, é devida a Ham (1938). Essas descobertas fundamentais refletem-se no diagnóstico laboratorial da doença, feito pela detecção das hemácias alteradas, mais sensíveis à hemólise em pH ácido (teste de Ham) e em condições de diminuição da força iônica (teste da sacarose).

Geralmente, os episódios hemolíticos são espontâneos e podem resultar em hemoglobinúria e hemossiderinúria. Entretanto, a primeira condição não está sempre presente nos pacientes. A hemossiderinúria, por outro lado, é uma manifestação muito comum, sendo um forte indicativo clínico para o diagnóstico (Rosse, 1997). O agravamento dos níveis de hemólise pode deflagrar um quadro de insuficiência renal pela deposição tubular da hemoglobina, fator que corresponde a aproximadamente 5% dos casos de óbito na HPN (Rosse, 1995).

Um indivíduo com HPN pode vir a ter anemia grave (níveis de hemoglobina inferiores 5 g/dl), sangramentos, fenômenos tromboembólicos, bem como uma série de sintomas menos característicos (Rosse, 1997). Na maioria dos casos há algum tipo de alteração no tecido medular, notadamente a anemia aplástica (AA). A HPN está também associada a abortos e complicações no parto. Hoje em dia, o tratamento dado a pacientes com HPN está baseado na terapia de transfusão de eritrócitos, administração de ferro e no uso profilático de anticoagulantes orais na prevenção de trombozes. É também comum o uso de glucocorticóides, eritropoietina e ciclosporina (Rosse, 1995; Stoppa *et al*, 1996). Nos casos mais graves, com hemólise aguda ou trombozes de difícil controle, o transplante de medula óssea, apesar de seu alto risco, apresenta-se como uma alternativa viável.

A HPN é uma doença clonal e pode ser definida em função da origem e quantidade de células afetadas (Josten *et al*, 1991; van Kamp *et al*, 1991; Raghavachar *et al*, 1995). O surgimento de uma mutação em uma célula pluripotente determinaria o aparecimento de

células anormais derivadas, tanto nas linhagens brancas como nas vermelhas. Existem registros de casos nos quais a síndrome é causada pela presença de duas ou mais linhagens HPN, originadas a partir de eventos mutacionais distintos (Ostendorf *et al*, 1995; Endo *et al*, 1996a). Os clones podem ser qualificados em 3 categorias fenotípicas distintas (Rosse, 1995): HPN I com baixa sensibilidade ao complemento (praticamente normal); HPN II com sensibilidade mediana e HPN III com alta sensibilidade (1/15-1/20 do complemento necessário para a lise de uma célula normal). Atualmente, a quantidade de células afetadas pode ser inferida pelo uso de técnicas de citometria de fluxo (Schubert *et al*, 1991).

A Hemólise e o Sistema Complemento

Os clones HPN apresentam uma sensibilidade anormal a atuação do complemento. O grau de sensibilidade de um clone HPN é um importante parâmetro fenotípico, indicando o nível de comprometimento das células. Salienta-se que a potencialidade de evolução do quadro clínico é determinada principalmente pelo grau de hemólise intravascular, característica fundamental da doença. A ação atípica do sistema complemento nas hemáceas, plaquetas e monócitos HPN ocorre em função da ausência de duas proteínas de membrana: a CD59 (*membrane inhibitor of reactive lysis*) e a CD55 (*Decay accelerating factor*). A primeira tem um papel regulatório na fixação do complexo C9, um dos principais mecanismos de desagregação da membrana celular; a ausência da CD59 tem um papel preponderante na hemólise (Rosse e Ware, 1995; Luzzatto e Bessler, 1996). Por sua vez, a deficiência na expressão da CD55 induz a uma ação recorrente do complexo C3-C5 convertase, o que amplifica a atuação do complemento na membrana. Uma terceira proteína, a proteína de ligação ao C8, também parece atuar nessa inibição.

Tromboses

Tanto as manifestações tromboembólicas arteriais como as venosas são freqüentes na hemoglobinúria, ocorrendo em aproximadamente 40% dos casos (Hillmen *et al*, 1995). Formas raras de trombose podem surgir em veias pouco usuais como a cerebral, a abdominal e a supra-hepática, que é reconhecida como uma variante da síndrome de Budd-Chiari. As tromboses venosas são comumente descritas como tendo uma importante repercussão nos níveis de morbidade e mortalidade entre os pacientes.

Os fenômenos tromboembólicos estão ligados a mecanismos ainda não completamente esclarecidos. Na membrana plaquetária a fixação do C9 polimerizado resultaria na exovesiculação das plaquetas, expondo fosfolipídeos na superfície externa. Essa exposição levaria à ativação do complexo protrombinase, o que induziria a formação de trombina nos vasos (Wiedmer *et al*, 1993). Nos monócitos, a ausência de uma proteína da família da CD59, a UPAR, estaria relacionada a uma deficiência no sistema fibrinolítico, diminuindo a taxa de remoção da fibrina depositada nos vasos (Rosse, 1997).

Distúrbios da Medula Óssea

Há o surgimento de distúrbios medulares em aproximadamente 20% dos casos de HPN (Rosse, 1997). O processo de degeneração medular está envolvido no surgimento de diversas doenças do sangue, existindo uma forte correlação entre o aparecimento de anemia aplástica, síndromes pré-leucêmicas e síndromes mieloproliferativas. Ressalta-se que já foi constatada uma mesma origem clonal para as células HPN e células leucêmicas (Longo *et al*, 1994).

Existem indícios de que um ambiente medular hipoplásico favoreceria a expansão de uma linhagem de células HPN (Griscelli-Bennaceur *et al*, 1995; Luzzatto *et al*, 1997). Nessas condições, as células HPN apresentariam uma vantagem seletiva sobre as células

remanescentes normais (Josten *et al*, 1991; Bessler *et al*, 1994a; Nafa *et al*, 1998a). Por outro lado, um ambiente medular normal dificultaria o estabelecimento dos clones HPN (Bessler *et al*, 1994a). Essa suposição está relacionada a observação de que os raros casos de reversão espontânea da doença ocorreram concomitantemente à diminuição da hipoplasia. A expansão das células HPN em um ambiente medular alterado poderia refletir uma alternativa encontrada pelo organismo para suplantiar um quadro de disfuncionalidade do sistema hematopoiético. O aumento relativo dos clones HPN não seria, portanto, apenas o reflexo de uma característica intrínseca da célula (Ware *et al*, 1998; Rosti, 2000), como a não-expressão de alguma proteína, estando também associado a um contexto ambiental específico (ambiente medular alterado). Assim, a HPN representaria uma espécie de “mal necessário”, em que as células hematopoiéticas mutantes contrabalanceariam a drástica redução das células medulares normais (Bessler *et al*, 1994a; Luzzatto, 1997).

As Proteínas

As células HPN são clones diferenciados de uma célula hematopoiética mutante, ligada ao surgimento de toda uma linhagem de células incapazes de sintetizar total ou parcialmente o GPI (glicosilfosfatidilinositol), grupo molecular responsável pela “ancoragem” de diversas proteínas na membrana citoplasmática. Portanto, essas proteínas podem deixar de serem expressas em um clone HPN. Uma grande variedade de proteínas ligadas ao GPI foi descrita em diversos grupos de seres, sendo encontradas em eucariotos, mas não em procariotos (Ferguson e Williams, 1988; Cross, 1990). A sua identificação pode ser feita através da clivagem enzimática da ligação GPI/proteína, utilizando-se a enzima fosfolipase C. Menos comumente, a caracterização é feita por purificação direta da proteína.

Já foram relatadas aproximadamente vinte proteínas ligadas ao GPI em células hematopoiéticas humanas (Rosse, 1997). Elas desempenham papéis importantes em

diversos sistemas de interação celular, como a adesão, ativação de células do sistema imune, recepção e transdução de sinais. A tabela I sumariza algumas dessas proteínas.

Tabela I: proteínas ligadas pelo GPI nas células sanguíneas

Fosfatase Alcalina	1ª anormalidade bioquímica descrita na HPN; também ausente em outras disfunções de hematopoese (ex: LMC), mas por motivos diferentes: ausência do GPI na HPN <i>versus</i> transcrição insuficiente para a produção da proteína na LMC.
Acetilcolinesterase	Encontra-se deficitária juntamente com outra enzima, a AchE (<i>erythrocyte acetylcholinesterase</i>), nos clones HPN; correlação entre nível de deficiência da expressão protéica na membrana e o grau de sensibilidade ao complemento (não havendo, entretanto, uma relação direta de causa/consequência).
Fator de Aceleração do Decaimento (DAF)	CD55; DAF (<i>Decay accelerating factor</i>) primeira glicoproteína descrita como tendo um papel funcional direto no aumento da sensibilidade dos clones HPN ao complemento; 70 kD; retroalimentação negativa do complexo C4b2a (este ativa a clivagem enzimática de C3); sua ausência leva a uma deposição de C3b nas células HPN, tanto quando o complemento é ativado pela via clássica como pela alternativa (independente de anticorpos); gene localizado no cromossomo 1, estando relacionado ao fenótipo Inab (células homozigotas recessivas, menos sensíveis ao complemento, do que clones HPN),
Protectina (MIRL)	CD59; MIRL (<i>membrane inhibitor of reactive lysis</i>); glicoproteína com 19 kD; superfamília das <i>protein-binding protein</i> ; inibe a polimerização do C9 na membrana, não permitindo interações C9/C9, C9/C8 ou C9/C5b-C8; células de homozigotos recessivos apresentam o mesmo fenótipo que as células HPN.
Proteína de Ligação ao C8	Purificada a partir da sua capacidade de ligação ao C8; 70 kD; função semelhante a da CD59; não caracterizada; gene desconhecido.
LFA-III	CD58; encontrada abundantemente em linfócitos; 25 kD; ligante para a adesina CD2; interage com 2 proteínas de ativação das células-T; ocorre tanto na forma GPI como transmembrana (contrabalanceamento na HPN).

(continuação)

Tabela I: proteínas ligadas pelo GPI nas células sangüíneas

Receptor para o ativador de plasminogênio (UPAR)	UPAR (urokinase plasminogen activator receptor); presente na membrana dos monócitos; pertence à mesma superfamília da CD59; liga-se a enzima protelítica urokinase; atuação no processo de fibrinólise.
Receptor para a proteína de ligação de Endoxinas	CD14; 55 kD; presente em monócitos, macrófagos, e em alguns tipos de célula-B; mediação da resposta imunológica a lipopolissacarídeos bacterianos (LPSs); relacionada com a liberação de citocinas (ex: TNF- α , IL-4, IL-6) e ativação das células endoteliais.
Campath-1	Cdw52; proteína com apenas 18 aminoácidos; achada em linfócitos, monócitos e neutrófilos; interage positivamente para a ativação do sistema complemento na membrana celular; o efeito causado pela sua deficiência na células HPN não está claro.
CD24	CD24; pequeno peptídeo expresso em grandes grandes quantidades nas células-B imaturas; função desconhecida.
CD48	CD48; 47 kD; proteína com papel de adesão e ativação de linfócitos; deficiência nas células HPN sem efeito definido.
CD66	CD66; relacionada com o antígeno CEA (carcinoembryogenic) e a CD57; pode estar ligada a ativação de neutrófilos; função celular desconhecida.
Antígenos de grupos Sangüíneos	Um certo número de antígenos de grupos sangüíneos encontra-se ausente, total ou parcialmente, na membrana das células HPN (Cromer, Cartwright, Dombrock, Holey-Gregory e JHM).

A Via Biossintética do GPI

As alterações moleculares responsáveis pela complexidade clínica da HPN são relativamente simples. Consistem fundamentalmente na ausência de um grupamento glicofosfolipídico (GPI) em consequência do surgimento de mutações somáticas em um gene localizado no cromossomo X (Rosse e Ware, 1995). O GPI é formado por três grupamentos: um fosfatidilinositol, um complexo de glicosaminoglicano (constituído por glicosamino e manoses) e fosfoetanolamina. A sua síntese é iniciada na membrana externa do retículo endoplasmático (RE) pela adição de uma molécula de N-acetilglicosamino (GlcNAc) a um radical fosfatidil (FI). Ao complexo GlcNAc-FI são incorporadas três manoses, doadas por um grupamento DPM, em passos distintos de manosilação. Posteriormente, há a ligação da etalonamida, o último passo de síntese. Na cisterna do RE, o GPI recém-formado é covalentemente ligado a porção C-terminal de uma proteína. O conjunto glicoprotéico é então transferido ao complexo de Golgi, de onde é lançado na superfície celular externa pela ação de uma transamidase (Rosse e Ware, 1995; Luzzato e Bessler, 1996; Rosse, 1997).

Experimentos de fusão e complementação celular feitos *in vitro* com células linfoblastóides transformadas (Hillmen *et al*, 1993), bem como o uso de modelos animais (Ware *et al*, 1994a), possibilitaram o estudo e a identificação da via de biossíntese do GPI. Alguns desses experimentos consistiram na formação de híbridos celulares a partir de células sangüíneas de pacientes com HPN (Takeda *et al*, 1993; Norris *et al*, 1994). Demonstrou-se que o passo inicial de síntese, a adição da GlcNAc ao FI, encontrava-se bloqueado nas células com fenótipo HPN. Foi também definido que a molécula doadora de GlcNAc era uma UDP-N-acetilglicosamino. Nesse sentido, a inativação funcional de uma enzima com atividade de α -1,6-N-acetilglicosaminil-transferase seria o fator responsável pelo bloqueio biossintético. Três linhagens murinas experimentais apresentavam esse bloqueio (classes A, C e H), mas apenas uma (classe A) não era complementada pelos clones HPN.

A Figura I indica a estrutura do GPI e o local do bloqueio da biossintético nos pacientes com HPN.

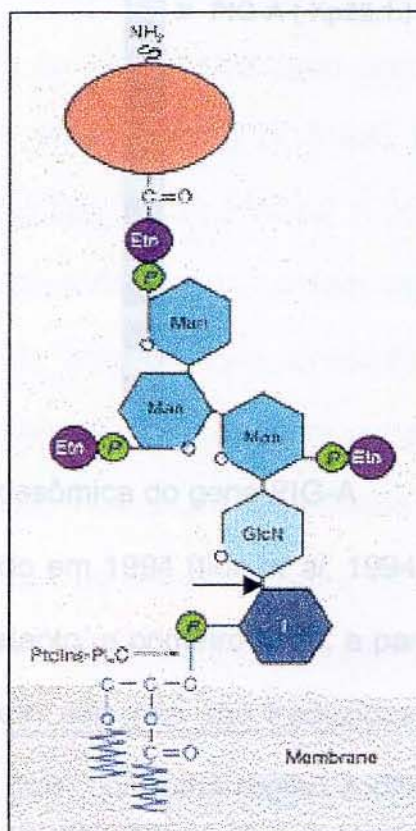


Figura I: estrutura da molécula de GPI, com a indicação (seta) do bloqueio biossintético (baseado em Takeda e Kinoshita, 1995)

O Gene PIG-A

O gene responsável pela produção da enzima inibida na linhagem A e nos clones HPN foi identificado na região cromossômica Xp22.1. (Takeda *et al*, 1993), identificada na figura II. Dessa forma, pela ausência nos homens por hemizigose, ou pela inativação aleatória nas mulheres de um dos cromossomos X, há apenas um alelo funcional por célula. A proteína por ele originada tem 54 kDa e é constituída por 484 aminoácidos. Cabe ressaltar que em todos os casos de HPN descritos em que houve a análise desse gene, denominado PIG-A

(*phosphatidylinositolglycan-class A*), foi demonstrada a presença de pelo menos um tipo de alteração molecular, a base para o fenótipo defectivo dos clones HPN (Ware *et al*, 1994b).

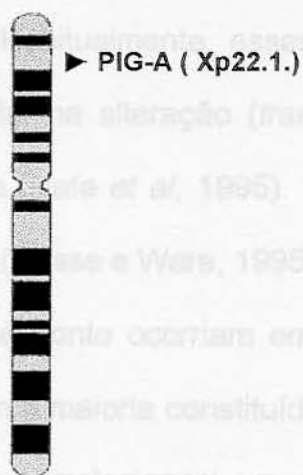


Figura II: localização cromossômica do gene PIG-A

O gene da PIG-A foi clonado em 1994 (Iida *et al*, 1994). Ele tem aproximadamente 17 kb e apresenta seis exons. Entretanto, o primeiro exon, a parte proximal à extremidade 5' do segundo e a maior parte do exon seis não são traduzidos. Aproximadamente metade da proteína é codificada pelo exon dois, com uma região codificante total de 1452 pb. O RNA mensageiro de 3.8 kb pode sofrer um processamento diferencial, ligado às diferentes excisões (*splicing*) do exon dois. Como resultado, observa-se a presença de dois fragmentos distintos de 3.3 e 2.8 kb, plenamente funcionais. Está também descrito um pseudogene sem introns no cromossomo doze, homólogo ao gene PIG-A (Bessler *et al*, 1994b).

A clonagem e o seqüenciamento da região promotora do gene PIG-A revelou a ausência de sítios TATA (*TATA less promoter*). Observou-se que a constituição do promotor estava baseada na presença de 4 sítios CAAT, 2 sítios AP e um CRE. A manipulação *in vitro* dessa região indicou que todos os elementos mencionados têm um papel funcional altamente relevante na transcrição do gene (Iida *et al*, 1994).

As alterações moleculares do gene da PIG-A na HPN são heterogêneas, havendo a descrição de mais de 148 mutações (Nafa *et al*, 1998b). Uma análise envolvendo 84

mutações descritas em 72 pacientes constatou que as pequenas adições e perdas de base eram os defeitos moleculares mais freqüentemente observados, correspondendo a 63% do total de eventos (Rosse e Ware, 1995). Habitualmente, essas mutações envolvem apenas um ou dois nucleotídeos e podem resultar na alteração (*frameshifts*) e parada prematura (mutações *nonsense*) da matriz de leitura (Nafa *et al*, 1995). Em um universo de 51 casos analisados, 45 mutações eram desse tipo (Rosse e Ware, 1995).

Foi averiguado que as mutações de ponto ocorriam em aproximadamente 37% dos casos de HPN (Rosse e Ware, 1995), com a maioria constituída por mutações *missense*. Os casos clínicos ligados a essas mutações correlacionam um produto protéico parcialmente funcional (HPN II). Nesses casos, observa-se uma associação entre esse tipo de mutação e duas regiões no exon dois, indicando que ambos os domínios, evolutivamente conservados, desempenham um papel funcional importante na proteína (Norris *et al*, 1997).

A distribuição das alterações moleculares no gene da PIG-A parece ser aleatória, sem o aparecimento de regiões de alta mutabilidade conhecidas como *hot spots*. O aparecimento de eventos como grandes translocações e deleções gênicas é comparativamente raro (Nishimura *et al*, 1996; Nafa *et al*, 1998b). Com relação a região promotora, ainda não foram descritas mutações que efetivamente afetassem o nível de transcrição do gene.

Uma avaliação comparativa dos defeitos moleculares na HPN em diferentes populações indicou pequena variação na freqüência dos diversos tipos de mutações. Na Tailândia foram associados às pequenas perdas ou adições no gene da PIG-A 85% dos casos de HPN (Pramoonjago *et al*, 1995). Já no Japão, as trocas de base constituíram-se em 50% dos tipos de mutações analisadas (Yamata *et al*, 1995). Não existem registros na literatura de estudos realizados em populações da América do Sul.

OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização e análise das alterações moleculares no gene da PIG-A em pacientes com HPN, atendidos no Hemocentro-Unicamp.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram analisados sete pacientes com diagnóstico de HPN sob acompanhamento do ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp.

O diagnóstico de HPN foi baseado em dados clínicos, anatomopatológicos e laboratoriais. Foram também realizadas citometrias de fluxo¹ para a confirmação da presença dos clones HPN em alguns dos pacientes. A detecção de células deficientes na expressão das proteínas CD59 e CD55 foi feita pelo uso de anticorpos imunofluorescentes no laboratório de Citometria de Fluxo e Marcadores Celulares do Hemocentro-Unicamp.

Um resumo clínico informativo dos pacientes selecionados é dado nas páginas seguintes.

¹ Os gráficos indicam a intensidade de fluorescência, plotada logaritmicamente no eixo da abscissa, e o número de eventos, plotado na ordenada.

Histórico dos Pacientes Seleccionados (1997/1998)

1) HPN-1 (M.A.C): 26 anos, sexo feminino

Foi encaminhada ao ambulatório em 1990 com um sangramento cutaneomucoso grave, constatando-se um quadro de plaquetopenia acentuada. O estudo histológico da medula óssea indicou hipoplasia global, o que levou a paciente a receber uma terapêutica imunossupressiva. Nesse período, ela apresentou sensível melhora do quadro clínico.

Em 1994, a paciente começou a apresentar colúria e anemia hemolítica. Os testes de Ham e de sacarose, indicativos para o diagnóstico de HPN, foram positivos. A paciente apresentava um quadro clínico ativo de HPN na época da coleta do material para a análise molecular (1997).

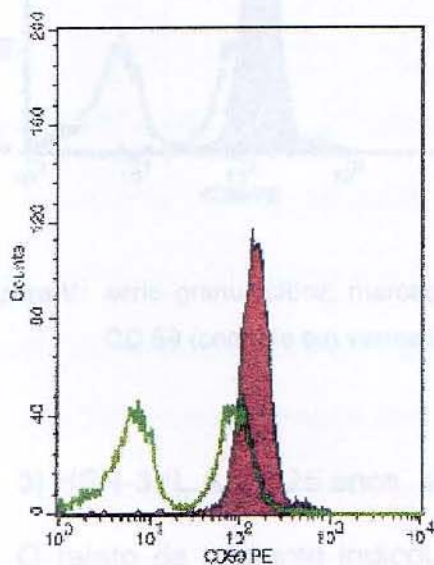


Figura III: série granulocítica; marcação da CD 59 (controle em vermelho).

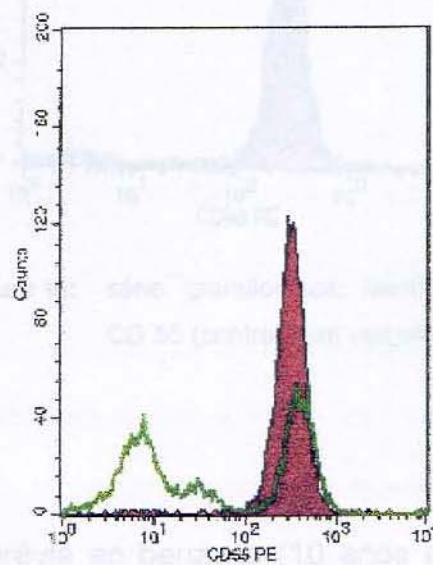


Figura IV: série granulocítica; marcação da CD 55 (controle em vermelho).

2) HPN-2 (E.V.A): 37 anos, sexo feminino

A paciente está sob acompanhamento do Hemocentro-UNICAMP desde 1990. Na época, queixava-se de dor abdominal epigástrica. Pararelamente, foi observada hemólise intravascular. A análise medular indicou hiperplasia da série vermelha. Os testes de Ham e sacarose foram positivos. A paciente apresentava quadro clínico de HPN na época da coleta do material para a análise molecular (1997).

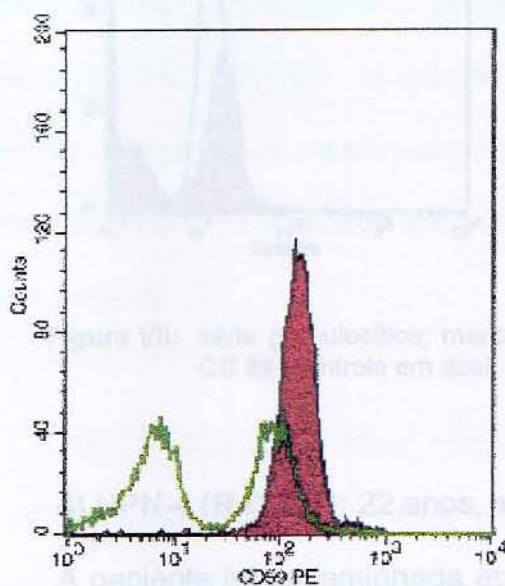


Figura V: série granulocítica; marcação da CD 59 (controle em vermelho).

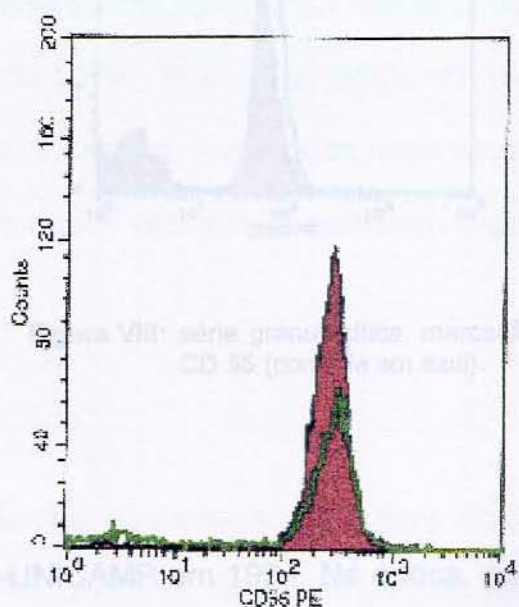


Figura VI: série granulocítica; marcação da CD 55 (controle em vermelho).

3) HPN-3 (L.A.S): 25 anos, sexo feminino

O relato da paciente indicou uma exposição prévia ao benzeno (10 anos antes) e o diagnóstico de anemia aplástica (AA) no Hemocentro do HC de Riberão Preto em 1991. A paciente foi tratada com ciclosporina e transfusões de sangue.

A paciente foi encaminhada ao Hemocentro-UNICAMP em 1997. Apresentava palidez, queixava-se de dores ósseas, escurecimento da urina e irregularidades no ciclo menstrual.

Foi constatada HPN em junho do mesmo ano (testes de Ham e sacarose positivos), época em que foram colhidas as amostras para o estudo molecular.

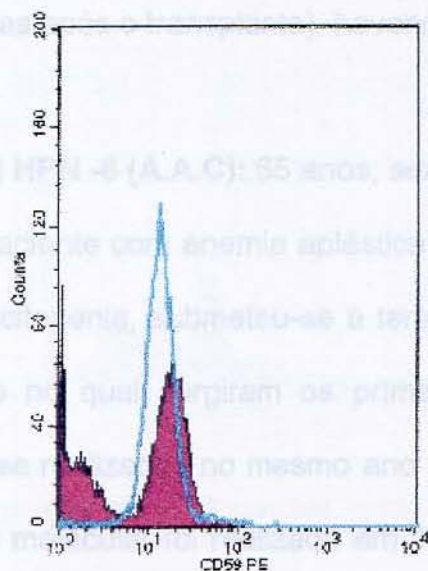


Figura VII: série granulocítica; marcação da CD 59 (controle em azul).

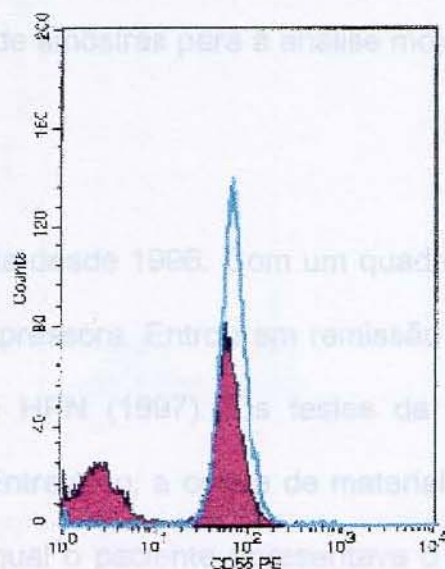


Figura VIII: série granulocítica; marcação da CD 55 (controle em azul).

4) HPN-4 (R.C.D.T): 22 anos, sexo feminino

A paciente foi encaminhada ao Hemocentro-UNICAMP em 1994. Na época, queixava-se de fraqueza. Apresentava icterícia e urina escura, o que levou a hipótese diagnóstica de anemia hemolítica adquirida.

Em 1995, os resultados dos exames laboratoriais para a detecção de hemoglobinúria e hemossiderinúria foram positivos. Tanto os testes de Ham como sacarose foram positivos, diagnosticando-se, então, HPN.

5) HPN-5 (M.F.V): 27 anos, sexo masculino

O paciente M.F.V apresentou quadro clínico e laboratorial interpretado como mielodisplasia (SMD), sendo submetido a transplante de medula óssea (TMO) em janeiro de 1998. Após o transplante, recebeu tratamento imunossupressivo baseado na administração

de ciclosporina. Posteriormente, apresentou diversos episódios infecciosos, alterações hepáticas (GVHD crônica), icterícia e colúria. Foi diagnosticada HPN em outubro de 1998 (267 dias após o transplante), havendo então a coleta de amostras para a análise molecular.

6) HPN -6 (A.A.C): 65 anos, sexo masculino

Paciente com anemia aplástica (AA) caracterizada desde 1996. Com um quadro grave de pancitopenia, submeteu-se a terapêutica imunossupressora. Entrou em remissão da AA, período no qual surgiram os primeiros sintomas de HPN (1997). Os testes de Ham e sacarose realizados no mesmo ano foram positivos. Entretanto, a coleta de material para a análise molecular foi realizada em 1998, período no qual o paciente apresentava o quadro clínico de HPN.

7) HPN-7 (A.S.L): 17 anos, sexo masculino

O paciente procurou em 1988 o serviço ambulatorial de hemocentro, queixando-se de episódios quase diários de epistaxe. Foi averiguada pancitopenia, diagnosticando-se anemia aplástica. Em 1990 surgiram os primeiros episódios de colúria. Os exames laboratoriais para a detecção de hemossiderinúria e hemoglobinúria foram positivos, enquanto que os subseqüentes indicaram apenas a presença de hemossiderinúria. Em 1991, os testes de Ham e sacarose foram positivos (três anos após a AA). A coleta de material foi realizada em 1998, época em que o paciente apresentava o quadro clínico de HPN.

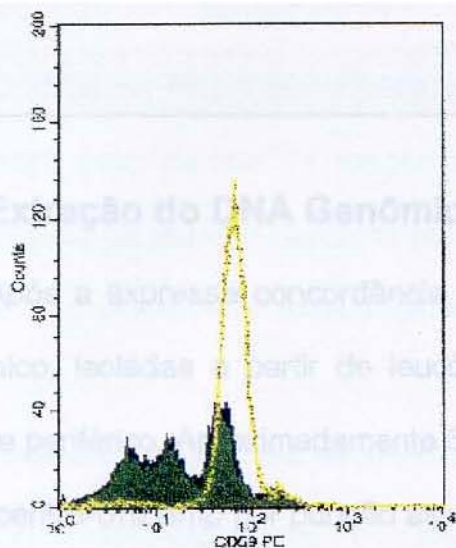


Figura IX: série granulocítica; marcação da CD 59 (controle em amarelo).

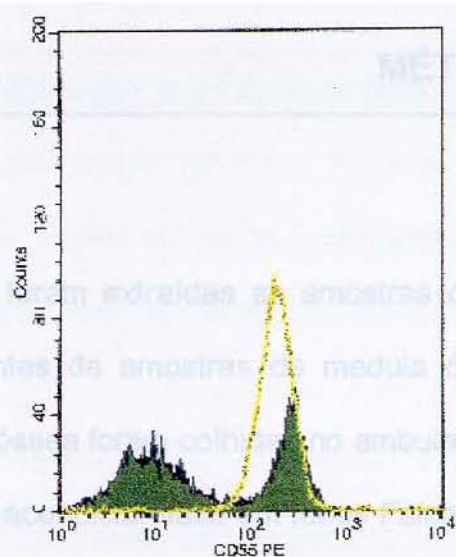


Figura X: série granulocítica; marcação da CD 55 (controle em amarelo).

A tabela II lista os índices hematimétricos obtidos dos pacientes na época em que foram colhidas as amostras sangüíneas para a análise molecular.

Tabela II: índices hematimétricos na época da coleta das amostras

Paciente	GV (10 ⁶ /ul)	GB (10 ³ /ul)	Plaquetas (10 ⁶ /ul)	Hb (g/dl)	Htc (%)	VCM (fl/CV)	HCM (pg/CV)	CHCM (g/dl)
HPN 1	3,43	5,2	44	11,9	33,3	97	34,7	35,7
HPN 2	4,71	2,7	228	15,5	41,4	88	32,9	37,4
HPN 3	2,76	6,6	127	12,1	36,0	121	43,8	36,2
HPN 4	3,22	6,2	271	9,6	29,0	90	29,8	33,1
HPN 5	1,65	2,0	11	6,1	16,8	102	37,0	36,3
HPN 6	3,34	2,1	16	9,8	27,7	83	29,3	35,4
HPN 7	3,82	4,2	78	13,4	40,5	106	35,1	33,1

Extração do DNA Genômico

Após a expressa concordância dos pacientes, foram extraídas as amostras de DNA genômico, isoladas a partir de leucócitos provenientes de amostras de medula óssea e sangue periférico. Aproximadamente 5 ml de medula óssea foram colhidas no ambulatório do Hemocentro-Unicamp por punção aspirativa esternal, acondicionadas em tubos Falcon de 50 ml contendo solução anticoagulante de EDTA 10% e então colocadas em gelo. O sangue periférico (5 ml) foi acondicionado sob as mesmas condições. O material colhido foi encaminhado para a análise molecular no laboratório de biologia molecular do Hemocentro-Unicamp.

Tanto o DNA genômico originário das amostras medulares como o do sangue periférico foram extraídos pelo método do DNAzol (*GibcoBRL*), um reagente monofásico composto de fenol e isotiocianato de guanidina. Para isso, foi necessário primeiramente fazer uma centrifugação do sangue a 2500 rpm por 10 minutos no intuito de se separar o plasma. Após essa etapa, foi realizada a lise das hemácias com uma solução contendo NH_4Cl 0,144M (na proporção de 5X o volume de células) e NH_4HCO_3 0,01M (na proporção de 0,5X o volume de células), utilizando-se duas ou três rodadas de centrifugação a 2500 por 10 minutos a 4°C. Ao final dessas centrifugações, o precipitado de leucócitos, livre de hemácias, foi dissolvido em 1 mL de DNAzol. O DNA foi então recuperado pela precipitação em etanol absoluto gelado (2,5X o volume) e acetato de sódio 3M (10% do volume). O precipitado de DNA foi lavado em etanol 70% e posteriormente diluído em água estéril desionizada.

Estudo do Gene PIG-A

O gene da PIG-A foi analisado a partir da amplificação das regiões codificadoras e promotora pela técnica de reação em cadeia da polimerase (Mullis e Faloona, 1987), utilizando-se os *primers* descritos por Iida *et al* (1994). Foram utilizados 6 pares de *primers* (tabela IV) que em conjunto possibilitaram a amplificação dos fragmentos descritos na tabela III.

Tabela III: fragmentos de amplificação do gene PIG-A

FRAGMENTO Nº	FRAGMENTO DE PCR	TAMANHO DO FRAGMENTO (PARES DE BASE)
1	Promotor+exon 1	662
2	Exon 2(A)	487
3	Exon2(B)	497
4	Exon 3	244
5	Exons 4+5	580
6	Exon 6(A)	361

Tabela IV: lista dos *primers* utilizados na amplificação do gene PIG-A

PRIMERS	SEQUÊNCIA	FRAGMENTOS
A-PR1 *	5'-CAGACCTCGTATGTTTCCCTCAG-3'	PROMOTOR/EXON 1
B-PR1 **	5'-AGAACAGCCCCATCCGAAAGCG-3'	
A-IT1 *	5'-GAGCTGAGATCCTGTTTTACTCT-3'	EXON 2 (A)
B1 **	5'-GAAAAAGAACTATGTGAATGGAT-3'	
A-1 *	5'-ACAGCCACGACCCTCTTTCAGAG-3'	EXON 2 (B)
B-IT1 **	5'-GCCAAACAATCATTATATACAAG-3'	
A-IT2 *	5'-TGGATTCTCAGTCGTTCTGGTGA-3'	EXON 3
B-IT2 **	5'-CTTCTCCCTCAAGACAACATGAA-3'	
A-IT3 *	5'-TCACTCCTTTCTTCCCCCTCTC-3'	EXONS 4/5
B-IT3 **	5'-GTACGTGAAACATCAAGTAAGAG-3'	
A-IT4 *	5'-GGTCATTGTTATCATGGGACAG-3'	EXON 6 (A)
B-12 **	5'-TCTTACAATCTAGGCTTCCTTC-3'	

* PRIMER SENSE (5')

** PRIMER ANTISENSE (3')

Identificação das Mutações

a) CSGE

A técnica do CSGE (Ganguly *et al*, 1993) baseia-se no fato de que erros de pareamento (*mismatches*) em heteroduplexes formados pela fusão de uma fita-selvagem de DNA com uma mutante podem causar alterações conformacionais, detectáveis por um padrão diferencial na corrida de eletroforese (quando comparadas ao homoduplex selvagem, o controle).

A detecção das alterações conformacionais foi feita em temperatura ambiente, utilizando-se um gel semi-desnaturante, composto por poliacrilamida em uma concentração de 6%, bis-acrilóipiperazina em uma concentração de 0,6%, formamida desionizada, etilenoglicol e taurina, usada também na formulação dos tampões. A formação dos heteroduplexes foi feita pela incubação dos fragmentos de PCR em um termociclador, utilizando-se o seguinte ciclo de incubação:

- 98°C por 5 minutos
- 68°C por 1 hora e 30 minutos

Cada reação continha aproximadamente 10 µl de PCR e 5 µl de corante (*stop solution*) com formamida, etilenoglicol, azul de bromofenol e xilenocianol. A corrida de eletroforese, com uma adaptação do método originalmente descrito, foi efetuada durante 16 horas sob uma corrente de 300 volts, em um aparato padrão para géis de seqüenciamento (para placas de 37.5 X 45 cm). O pente de corrida comportava até 32 amostras. Ao término da eletroforese, o aparato era desmontado e o gel corado com uma solução de brometo de etídio, sendo os fragmentos visualizados pela exposição à luz ultra-violeta.

Dessa forma, a identificação do fragmento do DNA com padrão eletroforético anormal orientou a região do gene a ser seqüenciada, procurando-se, assim, determinar o tipo exato de mutação.

b) Seqüenciamento

A identificação do fragmento do DNA com padrão eletroforético anormal determinou a região do gene a ser seqüenciada (Sanger *et al.*, 1977). Os seqüenciamentos foram feitos com o kit *Thermo Sequenase* (Amersham Pharmacia Biotech), utilizando-se didesoxinucleotídeos marcados com o isótopo γ -33 do fósforo. O produto de PCR usado foi previamente purificado por separação em gel de agarose 1,5% (*Wide Range-Sigma Chemical Co*) ou tratado com as enzimas exonuclease I e fosfatase alcalina. A reação de tratamento foi incubada a 37°C por 15 minutos e a 80°C por também 15 minutos (inativação enzimática).

A reação de seqüenciamento com [γ -P³³] passou por duas etapas antes da incubação no termociclador. Foi feita uma reação em separado para cada uma das bases dideoxi marcadas, utilizando-se 2,0 μ l de dITP e 0,5 μ l de cada base marcada radioativamente (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Paralelamente, a 2 μ l do produto de PCR purificado foram adicionados 2 μ l do tampão de reação (10X), 1 μ l do *primer* (10 pmol), 2 μ l da enzima sequenase e 13 μ l água desionizada, o que correspondeu a uma reação com um volume final de 20 μ l.

As reações foram distribuídas em tubos *ependorf* previamente identificados. Os tubos (G,A,T,C) continham uma mistura de 2,5 μ l com a base didesóxi especificada e 4,5 μ l da reação enzimática, perfazendo quatro tubos por amostra. Cada ciclo para a produção dos fragmentos de seqüenciamento seguia os seguintes parâmetros:

- 95°C/ 30 segundos
- 57°C/ 30 segundos (anelamento para o *PIG-A*) } **35x**
- 60 °C/ 5-10 minutos (específico para o dITP)

A inosina é uma base nitrogenada quimicamente modificada que inibe o surgimento de estruturas secundárias na fita de DNA, eliminando, dessa forma, "compressões" no gel. Após o término dos 35 ciclos foram adicionados 4 µl de corante para a corrida de eletroforese (*stop solution*), constituído por uma solução de formamida 95%, azul de bromofenol 0,05% e xilenocianol 0,05%.

As corridas de eletroforese foram feitas sob corrente de 90 watts, em um aparato padrão para géis de seqüenciamento, com o pente de corrida comportando até 12 amostras. Ao término da eletroforese, o aparato era desmontado e o gel seco com o auxílio de uma bomba de vácuo. O gel seco era colocado em cassete e exposto com um filme de autorradiografia. Após a exposição, que variava entre um e sete dias, o filme era revelado e analisado. Quando necessário, pela pouca definição na autorradiografia, foi efetuada a clonagem dos produtos de PCR através do kit *Sureclone* (Amersham Pharmacia Biotech).

c) Clonagem

Para a clonagem dos produtos de PCR foi utilizada uma estratégia de ligação (PCR/vetor) que eliminava a "cauda" poli-A das extremidades 3' do fragmento de amplificação, levando à formação de uma extremidade não-coesiva (*blunt-end ligation*).

Os produtos de PCR a serem clonados eram purificados e analisados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, para a definição da qualidade e concentração do DNA. O PCR era então preparado para a ligação através de um tratamento com o fragmento *Klenow* da DNA-polimerase I, que suprime as bases não-pareadas nas extremidades 3'. Concomitantemente, era feito um tratamento suplementar com a enzima T4 polinucleotídeo quinase, levando à fosforilação dos fragmentos. Após o tratamento

enzimático, os fragmentos de PCR foram repurificados por uma extração em fenol/clorórmio e centrifugados em microcolunas (*MicroSpin Columns*) a 12000 rpms por 1 minuto.

A reação de ligação PCR/vetor foi feita utilizando-se 2 µl do efluente das microcolunas, 50 ng do vetor pUC18 desfosforilado, 10 µl do tampão de ligação (2X), 1 µl de solução DTT, 1 µl da enzima T4 DNA ligase e 5 µl de água desionizada estéril, perfazendo um volume final de 20 µl. A reação era então incubada por duas horas a 16°C e posteriormente purificada por uma reprecipitação com acetato de amônio 7,5 M (NH₄Ac) em etanol absoluto, sob uma centrifugação a 14000 rpms por 20 minutos. Após uma lavagem em etanol 70%, o precipitado foi ressuspensionado em 5 µl de água desionizada estéril.

A transformação das células competentes (linhagem DH5B) foi efetuada por eletroporação. A reação de ligação foi dialisada com o auxílio de uma membrana *millipore* e aproximadamente 9 µl recuperados. Para a transformação foram utilizados 4 µl da ligação dialisada para um volume de 50 µl das células competentes. Após homogenização, as células foram eletroporadas a 1,8 kv. O volume total das células eletroporadas foi inoculado em 1 ml de meio líquido SOC. Após uma hora de crescimento em um agitador a 37°C, foi feito o plaqueamento em meio LB sólido contendo IPTG, X-GAL e o antibiótico ampicilina (este para seleção das células transformadas). Os marcadores permitiram a detecção histoquímica das colônias com o inserto de PCR da seguinte maneira: as colônias brancas que continham o plasmídeo com o fragmento de interesse dentro do *operon* lac (localizado na região de recombinação do vetor) eram incapazes de metabolizar a galactose e ter o padrão azulado, típico desse processo na presença do indutor IPTG. Foram escolhidas por volta de 10 colônias brancas em cada placa de petri para um novo ciclo de replicação em 5 ml de meio LB líquido (37°C no agitador, *overnight*), visando à extração dos plasmídios pela técnica *miniprep*.

A extração e recuperação dos plasmídios foi feita utilizando-se o kit *Concert* (Gibco BRL) que permite a lise celular, o isolamento e a eluição dos plasmídios através de passos de precipitação, lavagem e centrifugação em microcolunas de separação. Após a purificação, eram obtidos aproximadamente 30 μ l de DNA plasmidial, possibilitando o seqüenciamento das duas formas alélicas (mutante e normal) em separado.

RESULTADOS

As amostras de material medular serviram como uma fonte de comparação na determinação da presença do mesmo tipo clone na medula óssea e no sangue periférico. Entretanto, não foi possível obter amostras de medula dos pacientes HPN 4, HPN 5.

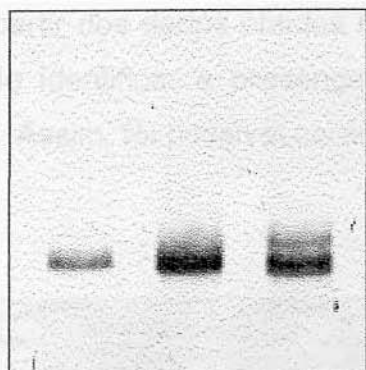
Após a amplificação dos fragmentos de PCR e rastreamento de mutações pela técnica do CSGE, foi observado o perfil dado pela tabela V na detecção dos heteroduplexes.

Tabela V: presença de heteroduplexes em fragmentos do gene PIG-A detectados por CSGE

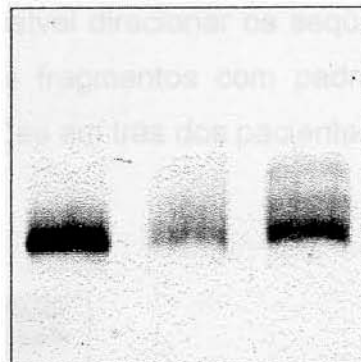
PACIENTE	Promotor + Exon 1	Exon 2(A)	Exon 2(B)	Exon 3	Exons 4+5	Exon 6(A)
HPN 1	-	sim	-	-	-	-
HPN 2	-	-	-	-	-	-
HPN 3	sim	-	sim	-	-	-
HPN 4	-	sim	-	-	-	-
HPN 5	-	-	-	-	-	-
HPN 6	-	sim	-	-	-	-
HPN 7	-	-	-	-	-	sim

A tabela V indica a presença de seis fragmentos de PCR com um padrão eletroforético alterado pela formação de heteroduplexes. Dessa forma, a técnica do CSGE possibilitou a identificação de heteroduplexes no gene da PIG-A em cinco dos sete pacientes analisados, observando-se a presença de alterações eletroforéticas em dois fragmentos de PCR do mesmo paciente (HPN 3). As figuras¹ abaixo evidenciam os resultados obtidos:

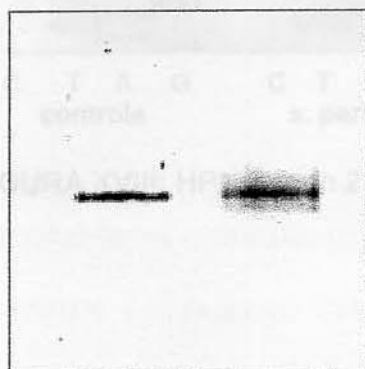
¹ As setas indicam as bandas com padrão eletroforético anormal (*shifts*); M=medula, P=s. periférico



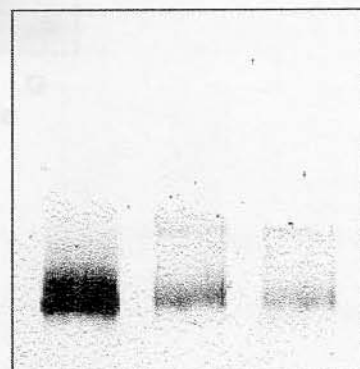
Controle HPN3M HPN3P
(promotor/exon 1)
FIGURA XII



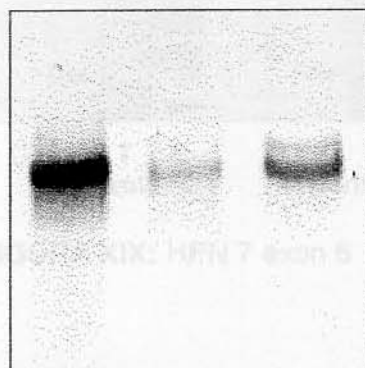
Controle HPN1M HPN1P
(exon 2, fragmento A)
FIGURA XIII



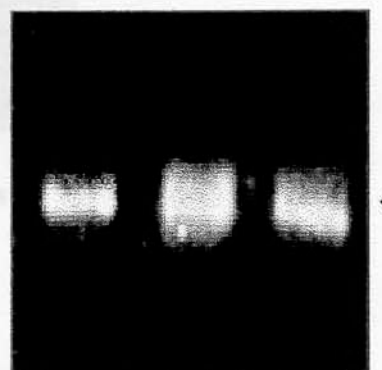
Controle HPN4P
(exon 2, fragmento A)
FIGURA XIV



Controle HPN6M HPN6P
(exon 2, fragmento A)
FIGURA XV

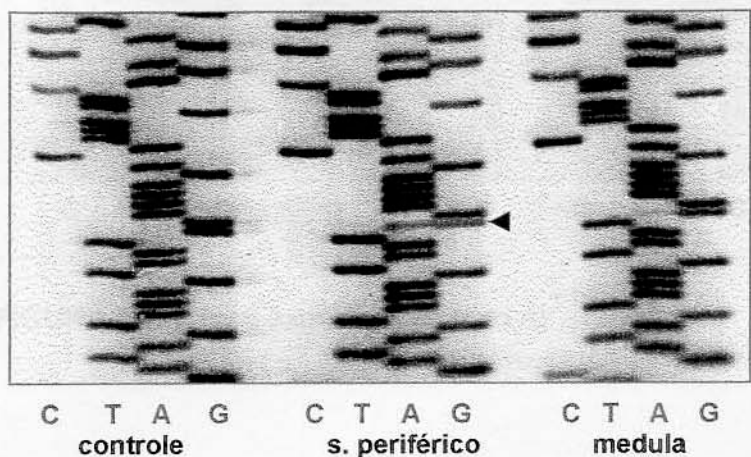


Controle HPN7M HPN7P
(exon 6)
FIGURA XVI



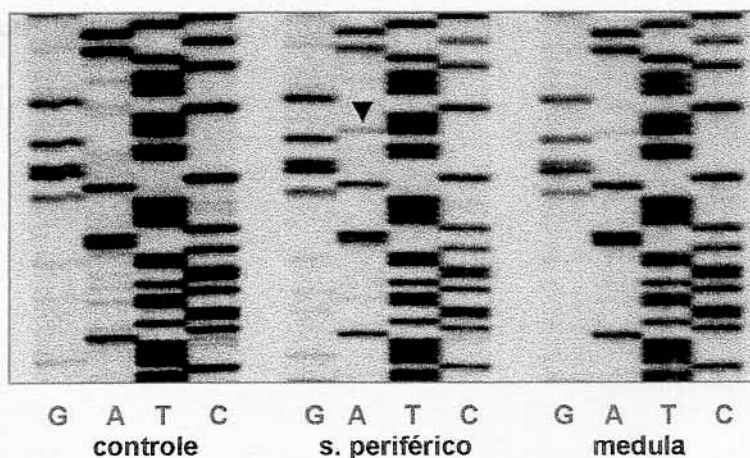
Controle HPN3M HPN3P
(exon 2, fragmento B)
FIGURA XVII

A partir dos dados obtidos na tabela V foi possível direcionar os seqüenciamentos, no intuito de identificar a presença de mutações nos fragmentos com padrão eletroforético alterado. Assim, foi possível caracterizar três mutações em três dos pacientes:



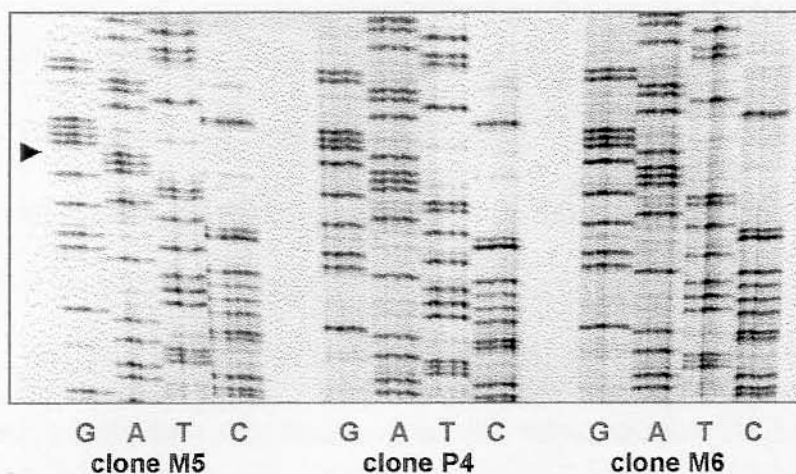
G→A (gt/at): alteração na sequência consenso de *splicing*.

FIGURA XVIII: HPN 3 exon 2 (fragmento B)



T→A (ttg/tag): produção de um codon de terminação (leu→stop).

FIGURA XIX: HPN 7 exon 6



ΔA (gag/ggg): alteração na matriz de leitura (formação de um peptídeo com 67 aminoácidos).

FIGURA XX: HPN 6 exon 2 (fragmento A)

Nos três casos restantes (HPN 1/2A; HPN 4/2A; HPN 3/Promotor+1) o seqüenciamento dos fragmentos correspondentes aos padrões anormais no CSGE não revelou alterações. Em outros dois casos (HPNs 2 e 5) não foram observadas alterações eletroforéticas no CSGE.

DISCUSSÃO

Diversos métodos são usados na detecção de mutações, possibilitando a identificação de novos alelos em *loci* já conhecidos, estudos populacionais e experimentos ligados ao estudo da função e da estrutura gênica (Grompe, 1993). Basicamente, os procedimentos podem ser separados em duas categorias distintas. A primeira engloba técnicas que identificam de uma forma padronizada alelos já descritos, causadores de determinadas anomalias genéticas. A segunda permite o rastreamento de mutações ainda não descritas. A escolha de uma determinada técnica é influenciada pela natureza esperada da mutação, tamanho e estrutura do *locus*, grau de sensibilidade requerida e fontes disponíveis de material (Grompe, 1993).

No presente trabalho foi utilizado como método para o rastreamento das mutações no gene da PIG-A, a detecção de heteroduplexes por diferença de conformação (*Conformation Sensitive Gel Electrophoresis*, ou CSGE). Essa técnica apresenta a vantagem de poder ser utilizada em fragmentos de PCR relativamente grandes (acima de 300 pb), dispensando o uso de enzimas de restrição (para clivagem em fragmentos menores, como ocorre com o *Single Strand Conformation Polymorphism*, ou SSCP). O gel do CSGE produz gradiente desnaturante que pode assinalar as mudanças na conformação secundária da dupla-fita híbrida causadas por uma mutação pontual, mediante o aparecimento de alterações (*shifts*) nas bandas de PCR. Resultados da literatura demonstraram que o CSGE mostrou-se eficiente para a detecção de mutações (Williams *et al*, 1995), confirmando a presença de 60 alterações entre 68 (Ganguly *et al*, 1993). As oito mutações não-confirmadas estavam em regiões da fita que apresentavam uma temperatura de dissolução (*melting*) mais elevada ou que se encontravam nas extremidades do fragmento.

Com relação as técnicas de rastreamento mais comumente usadas, destaca-se ainda o SSCP (Sarkar *et al*, 1992), que conjugada com o uso de enzimas de restrição apropriadas, permite a análise em fragmentos com tamanhos variando entre 100 a 400 pb.

Neste trabalho, o CSGE possibilitou a identificação de seis alterações eletroforéticas (*shifts*) em sete pacientes analisados. No entanto, os seqüenciamentos feitos confirmaram a presença de apenas três mutações (HPNs 3, 6 e 7). Em outros três casos (HPNs 1, 3(P/1) e 4) não foram encontradas mutações. Os produtos de amplificação (fragmentos P/1 e 2A) foram clonados, mas uma primeira análise dos seqüenciamentos não detectou alterações mutacionais visíveis, pressupondo uma falha na técnica de rastreamento (falsos-positivos) ou um baixo número de clones com o inserto mutante. Salienta-se que em alguns dos trabalhos publicados houve a purificação prévia das populações de leucócitos deficientes na expressão de proteínas ligadas ao GPI, pela utilização de anticorpos monoclonais e separação magnética das células marcadas (Norris *et al*, 1994; Ware *et al*, 1994b; Endo *et al* 1996a). É também reportada a utilização de cDNAs produzidos por RT-PCR para a observação de transcritos anormais.

Confrontando-se o espectro mutacional do gene PIG-A com o de outros localizados no cromossomo X, responsáveis por desordens hereditárias, percebe-se uma diferença significativa na especificidade das mutações (Luzzato e Bessler, 1996). Diferentemente de genes como o G6PD (constitutivo como o PIG-A) e o FVIII (tecido-específico) na hemofilia A com apresentação clínica leve, na qual mais de 90% das mutações são *missense*, as mutações no PIG-A são na sua maioria *frameshifts* (Nafa *et al*, 1998b). Essa estatística, porém, pode representar um viés amostral, na medida em que as trocas de base em regiões que não afetem em demasiado a função protéica (clones tipo I) sejam "mascaradas" pela ausência de quadro clínico detectável. É significativo que a única mutação hereditária encontrada nos exons do gene PIG-A seja uma troca de aminoácidos "silenciosa" (Endo *et al*, 1996b), indicando que a perda total de função nesse gene (via mutação hereditária) seja incompatível com a vida. É plausível que mutações completamente disfuncionais (*frameshifts*, por exemplo) estejam restritas ao sistema hematopoético.

As mutações somáticas no gene PIG-A surgem de forma espontânea, sem um caráter etiológico definido, ocorrendo ao acaso por todo *locus* (Rosse e Ware, 1995). *A priori*, quatro tipos de lesões espontâneas inerentes ao metabolismo são relevantes para o surgimento de mutações (oxidação, metilação, desaminação e depurinação). A presença de mutações pode estar relacionada a exposição à agentes genotóxicos. Tipicamente, a exposição a compostos aromáticos presentes em tintas e agrotóxicos está associada a mutações. A metabolização desses compostos gera radicais livres capazes de causar danos oxidativos na molécula de DNA (Glickman *et al*, 1995). O surgimento de mutações também já foi associado à quimioterapia (Hattori *et al*, 1997).

Recentemente, foi reportado que alguns pacientes com HPN poderiam ter instabilidade genética acentuada, uma característica inata do indivíduo que definiria uma maior predisposição ao aparecimento de mutações (Purow *et al*, 1999). Esse perfil pode estar associado à deficiências nos mecanismos enzimáticos responsáveis pelos processos de replicação e reparo (Glickman *et al*, 1995; Purow *et al*, 1999).

Neste trabalho foram caracterizadas três mutações nos sete pacientes analisados. Todas são mutações de ponto, resultantes da troca ou perda de apenas uma base. Duas das três mutações descritas (nos pacientes HPN 3 e HPN 6) pressupõem a perda total da função enzimática do peptídeo PIG-A. Também é sugestivo notar que duas das mutações descritas foram encontradas em pacientes com possível exposição prévia a compostos químicos aromáticos (pacientes HPN 3 e HPN 6).

A mutação detectada no paciente HPN 3 representa a primeira descrição na literatura. É uma transição G→A na extremidade 5' do segundo intron do gene PIG-A que altera a sequência consenso de *splicing*. Foram descritas pelo menos quatro outras mutações que alteravam esse tipo de sequência nos introns três, quatro e cinco, resultando na formação de um transcrito anormal e deleção dos exons correspondentes (Rosse, 1997). Portanto, é

provável que a mutação aqui descrita envolva a perda do exon dois e a formação de um peptídeo truncado.

A segunda mutação (paciente HPN 7) também não havia sido descrita. Trata-se de uma transversão T→A na segunda base do codon Leu430 no exon seis, induzindo à formação de um codon precoce de terminação (mutação *nonsense*). Como consequência, pelo menos 54 aminoácidos deixam de ser expressos na sequência protéica. Teoricamente, essa região corresponde a dois domínios protéicos distintos, indicados na figura¹ abaixo:



Figura XXI: representação gráfica do peptídeo PIG-A, indicando a mutação Leu430→stop

Por homologia a outras proteínas, a região entre os aminoácidos 422 e 442 é descrita como sendo um domínio transmembrana e a região considerada entre os aminoácidos 443 e 484 indica provavelmente a porção localizada no lúmen do RE. Não se pode afirmar que a proteína resultante seja completamente disfuncional, na medida em que os sítios de atividade enzimática parecem localizar-se no exon dois (Norris *et al*, 1997).

A terceira mutação (paciente HPN 6) já havia sido previamente descrita em um estudo realizado por grupos ingleses e americanos (Nafa *et al*, 1995). É uma perda ΔA na terceira base do codon Arg63, responsável pela produção de um peptídeo truncado com apenas 67 aminoácidos.

CONCLUSÃO

¹ fonte: <http://www.expasy.ch/cgi-bin/niceprot.pl?p37287>

CONCLUSÃO

O trabalho aqui realizado representa a primeira descrição de mutações em pacientes com HPN no Brasil. Os dados obtidos indicam uma forte tendência para o surgimento de pequenas alterações deletérias no gene da PIG-A, fato concordante com os dados obtidos na literatura. O pequeno número de pacientes estudados, no entanto, indica a necessidade de estudos multicêntricos para a avaliação de um maior número de casos, com o objetivo de caracterizar os tipos de mutações somáticas mais comuns nos pacientes brasileiros com HPN.

BIBLIOGRAFIA

1. Bessler M, Mason P, Hillmen P, Luzzato L: Somatic Mutations and Cellular Selection in Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria. **The Lancet** **343**: 951-953, 1994a.
2. Bessler M, Mason P, Hillmen P, Luzzato L, Mason PJ: Genomic Organization of X-Linked Gene (PIG-A) That is Mutated in Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria and of a Related Autosomal Pseudogene Mapped to 12q21. **Human Molecular Genetics** **3**: 751-757, 1994b.
3. Cross GAM: Glycolipid Anchoring of Plasma Membrane Proteins. **Annual Review of Cell Biology**: 1-39, 1990.
4. Endo M, Ware RE, Vreeke TM, Singh SP, Howard TA, Tomita A, Holguin MH, Parker CJ: Molecular Basis of the Heterogeneity of the Expression of Glycosyl-Phosphatidylinositol Anchored Proteins in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **Blood** **87**: 2546-2557, 1996a.
5. Endo M, Ware RE, Vreeke TM, Howard TA, Parker CJ: Identification and Characterization of an Inherited Mutation of PIG-A in a Patient With Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria. **British Journal of Haematology** **93**: 590-593, 1996b.
6. Ferguson MA, Williams AF: Cell-Surface Anchoring of Proteins Via Glycosyl-Phosphatidylinositol Structures. **Annual Review of Biochemistry** **57**: 285-320, 1988.
7. Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ: Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis for Rapid Detection of Single-Base Differences in Double-Stranded PCR Products and DNA Fragments: Evidence for Solvent-Induced Bends in DNA Heteroduplexes: **Proceedings of the National Academy of Sciences** **20**: 10325-10329, 1993.
8. Glickman BW, Kotturi G, de Boer J, Kusser W: Molecular Mechanisms of Mutagenesis and the Mutational Spectra. *In* Venitt S, Phillips DH: **Environmental Mutagenesis**. BIOS Scientific Publishers Limited ©, 1995.

9. Griscelli-Bennaceur A, Gluckman E, Scrobohaci ML, Jonveaux T, Bazarbachi A, Carossella ED, Sigaux F, Socié G: Aplastic Anemia and Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Search for a Pathogenetic Link. **Blood** **85**: 1354-1363, 1995.
10. Grompe M: The Rapid Detection of Unknown Mutations in Nucleic Acids. **Nature Genetics** **5**: 111-117, 1993.
11. Hattori H, Machii T, Ueda E, Masaru S, Kageyama T: Increased Frequency of Somatic Mutations in Patients With Aplastic Anaemia, Myelodysplastic Syndrome and Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **British Journal of Haematology** **98**: 384-391, 1997.
12. Hillmen P, Bessler M, Crawford DH, Luzzato L: Production and Characterization of Lymphoblastoid Cell Lines With the Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Phenotype. **Blood** **81**: 193-199, 1993.
13. Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzato L, Dacie JV: Natural History of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **The New England Journal of Medicine** **333**: 1253-1258, 1995.
14. Iida Y, Takeda J, Miyata T, Inoue N, Nishimura J, Kitani T, Maeda K, Kinoshita T: Characterization of Genomic PIG-A Gene: A Gene for Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Biosynthesis and Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **Blood** **83**: 3126-3131, 1994.
15. Josten KM, Toose JA, Borthwick-Clarck C, Gordon-Smith EC, Rutherford TR: Acquired Aplastic Anemia and Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Studies on Clonality. **Blood** **78**: 3162-3167, 1991.
16. Longo L, Bessler M, Beris B, Swirsky D, Luzzato L: Myelodysplasia in a Patient With Pre-Existing Paroxysmal nocturnal Hemoglobinuria: a clonal Disease Originating From Within a Clonal Disease. **British Journal of Haematology** **84**: 401-403, 1994.
17. Luzzato L, Bessler M: The Dual Pathogenesis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **Current Opinion in Hematology** **3**: 101-110, 1996.

18. Luzzato L, Bessler M, Rotoli B: Somatic Mutations in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: A Blessing in Disguise. **Cell** **88**: 1-4, 1997.
19. Mullis KB, Faloona FA: Specific Synthesis of DNA in Vitro Via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. **Meth. Enzymology** **155**: 335-350, 1987.
20. Nafa K, Mason PJ, Hillmen P, Luzzato L, Bessler M: Mutations in PIG-A Gene Causing Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria are Mainly of the Frameshift Type. **Blood** **86**: 4650-4655, 1995.
21. Nafa K, Bessler M, Deeg J, Luzzatto L: New Somatic Mutation in the PIG-A Gene Emerges at Relapse of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **Blood** **92**: 3422-3427, 1998a.
22. Nafa K, Bessler M, Castro-Malaspina H, Jhanwar S, Luzzatto L: The Spectrum of Somatic Mutations in PIG-A Gene in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Includes Large Deletions and Small Duplications. **Blood Cells, Molecules, and Diseases** **30**: 370-384, 1998b.
23. Nagarajan S, Brodsky RA, Young NS, Medof ME: Genetic Defects Underlying Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria that Arises out of Aplastic Anemia. **Blood** **86**: 4656-4661, 1995.
24. Nishimura J, Inoue N, Azenishi Y, Hirota T, Akaogi T, Shibano M, Kawagoe K, Ueda E, Machii T, Takeda J, Kinouchi, Kitani T: Analysis of *PIG-A* Gene in a Patient Who Developed Reciprocal Translocation of Chromosome 12 and Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria During Follow-Up of Aplastic Anemia. **American Journal of Hematology** **51**: 229-233, 1996.
25. Norris J, Hall S, Ware RE, Kamitani T, Chang H-M, Yeh ETH, Rosse WF: Glycosyl-Phosphatidylinositol Anchor Synthesis in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Partial or Complete Defect in an Early Step. **Blood** **83**: 816-821, 1994.

26. Norris ER, Howard TA, Marcus ST, Ware RE: Structural and Functional Analysis of the Pig-a Protein That is Mutated in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **Blood Cells, Molecules and Diseases** **30**: 350-360, 1997.
27. Ostendorf T, Nischan C, Schubert J, Grussn Meyer T, Scholz C, Zielinska-Skowronek M, Schmidt RE: Heterogeneous PIG-A Mutations Cell Lineages in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **Blood** **86**: 1640-1646, 1995.
28. Pramoonjago P, Wanachiwanawin W, Chinprasertzak S, Pattanapanayasat K, Takeda J, Kinoshita T: Somatic Mutations of *PIG-A* in Thai Patients With Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **Blood** **86**: 1736-1739, 1995.
29. Purow DA, Howard TA, Marcus SJ, Rosse WF, Ware RE: Genetic Instability and the Etiology of Somatic Mutations in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **Blood Cells, Molecules and Diseases** **25**: 79-89, 1999.
30. Raghavachar A, Janssen JWG, Schrezenmeier H, Wagner B, Bartram CR, Schulz AS, Hein C, Cowling G, Mubarik A, Testa NG, Dexter TM, Hows JM, Marsh JCW: Clonal Hematopoiesis as Defined by Polymorphic X-Linked Loci Occurs Infrequently in Aplastic Anemia. **Blood** **86**: 2938-2947.
31. Rosse WF: Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *In* Handin RI, Stossel TP and Lux SE (eds.): **Blood: Principles and Practice of Hematology**. J.B. Lippincott, Philadelphia © 1995.
32. Rosse WF: Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria as a Molecular Disease. **Medicine** **76**: 63-93, 1997.
33. Rosse WF, Ware RE: The Molecular Basis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **Blood** **86**: 3277-3286, 1995.
34. Rosti V: The Molecular Basis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **Haematologica** **85**: 82-87, 2000.

35. Sarkar G, Yoon H-S, Sommer S: Screening for Mutations by RNA Single-Strand Conformation Polimorphism (rSSCP): Comparison With DNA-SSCP. **Nucleic Acids Research** **20**: 871-878.
36. Sanger F, Niklen S, Coulson AR: DNA Sequencing With Chain-Terminating Inhibitors. **Proceedings of The National Academy of Sciences** **74**: 5463-5467, 1977.
37. Schubert J, Alvarado M, Uciechowski P, Zielinka-Skowronek M, Freund M, Vogt H, Schimidt RE: Diagnosis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Using Immunophenotyping of Peripheral Blood Cells. **British Journal of Haematology** **79**: 489-492, 1991.
38. Stoppa AM, Vey N, Sainty D, Arnoulet C, Camerlo J, Cappiello MA, Gastaut JA, Maraninchi D: Correction of Aplastic Anaemia Complicating Paroxysmal nocturnal Haemoglobinuria: Absence of Erradication of PNH Clone and Dependence of Response on Cyclosporin A administration. **British Journal of Haematology** **93**: 42-44, 1996.
39. Takeda J, Kinoshita T: GPI-Anchor Biosynthesis. **Trends in Biochemical Sciences** **20**: 367-371, 1995.
40. , Miyata T, Kawagoe K, Iida Y, Endo Y, Fujita T, Takahashi M, Kitani T,: Deficiency of GPI Anchor Caused by a Somatic Mutation of the PIG-A Gene in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **Cell** **73**: 703, 1993.
41. Van Kamp H, Landegent JE, Jansen RPM, Willemze R, Fibbe WE: Clonal Hematopoiesis in Patients With Acquired Aplastic Anemia: **Blood** **78**: 3209-3214, 1991.
42. Ware RE, Howard TA, Kamitani T, Hui-Ming C, Yeh ETH, Seldin MF: Chromossomal Assigment of Genes Involved in Glycosylphosphatidylinositol Anchor Biosynthesis: Implications for the Pathogenesis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **Blood** **83**: 3753-3757, 1994a.
43. Ware RE, Rosse WF, Howard TA: Mutations Within the PIG-A Gene in Patients With Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **Blood** **83**: 2418-2422, 1994b.

44. Ware RE, Nishimura JI, Moody A, Smith C, Rosse WF, Howard TA: The PIG-A Mutation and the Absence of Glycosylphosphatidylinositol-Linked Proteins Do Not Confer Resistance to Apoptosis in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **Blood** **92**: 2541-2550, 1998.
45. Wiedmer T, Hall SE, Ortel TL, Kane WH, Rosse WF, Sims PJ: Complement-Induced Vesiculation and Exposure of Membrane Prothombinase Sites in Platelets of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **Blood** **82**:1192-1196, 1993.
46. Williams CJ, Rock M, Considine E, McCarron S, Gow P, Ladda R, McLain D, Michels VM, Murphy W, Prockop DJ, Ganguly A: Three New Point Mutation in Type II Procollagen (COL2A1) and the Identification of Fourth Family With the COL2A1 Arg519→Cys Base Substitution Using Conformation Sensitive Gel Electrophoresis. **Human Molecular Genetics** **4**: 309-312, 1995.
47. Yamata N, Miyata T, Maeda K, Kitani T, Takeda J, Kinoshita T: Somatic Mutations of PIG-A Gene Found in Japanese Patients With Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **Blood** **85**: 885-892, 1995.