

## Agradecimentos

No final deste trabalho, não podia deixar de agradecer a todos o que me ajudaram a desenvolver este trabalho, nomeadamente o meu orientador Prof. Doutor José Cabeda e a minha co-orientadora Dr.<sup>a</sup> Maria Luís Queirós, que fizeram com que fosse possível desenvolver este trabalho e cuja ajuda ultrapassou muitas vezes o foro da orientação pedagógica. De resto quero agradecer a ajuda de todos os meus amigos e família que desde sempre me apoiaram e não deixaram que desanimasse mesmo nos momentos mais problemáticos e de maior confusão, com a especial referência para uma pessoa muito especial cuja presença foi muito importante ao longo destes anos...

# Estudo molecular das mutações no gene *PIGA* em doentes com Hemoglobinúria Paroxística Nocturna

## Resumo

A Hemoglobinúria Paroxística Nocturna é uma doença rara, que afecta ambos os sexos em qualquer idade. Muito cedo foi descoberto que esta doença é uma doença de origem adquirida, que leva ao aparecimento de clones de células hematopoiéticas com deficiência nas proteínas com ligação a âncoras GPI. A deficiência destas proteínas é devida à produção alterada, ou mesmo deficiência total das âncoras GPI, que por sua vez, se deve ao aparecimento de mutações numa proteínas da via de síntese das âncoras GPI – PIGA.

Assim, neste trabalho amplificou-se o promotor e a sequência codificante do gene *PIGA* para a identificação e caracterização das mutações presentes em doentes com Hemoglobinúria Paroxística Nocturna, ou de doentes com sintomas que levam à suspeita de Hemoglobinúria Paroxística Nocturna.

Dos doentes estudados só foi possível identificar a mutação num dos doentes. Esta mutação leva o aparecimento de um frameshit levando à formação de uma proteína truncada logo no segundo exão da proteína PIG-A (Thr192fX7). Para o resto dos doentes não foi possível identificar mutações que fossem possivelmente causadoras da doença, não sendo de excluir completamente a possibilidade de haver alterações não detectáveis por sequenciação.

É importante descrever também, que foi encontrado com muita frequência um possível polimorfismo (-342C→G) na zona do promotor do gene *PIGA*, cuja frequência deverá ser estudada com mais rigor numa população maior, tanto de doentes como de indivíduos normais.

# Molecular study of *PIGA* mutations in patients with Paroxistic Nocturnal Haemoglobinuria

## Summary

Paroxistic Nocturnal Haemoglobinuria is a rare disease, which can affect both sexes in any age. It was soon discovered that this is a clonal disease that involves the haematopoietic lineage and leads to the deficiency of proteins that connect to the cells by GPI anchors. This deficiency is caused by the lack or deficient production of the anchors themselves, and is due to mutations in a protein that participates in the biosynthesis of the GPI anchors - PIG-A.

In this work, it was studied the promoter and the coding region of the *PIGA* gene, to the identification and characterization of the mutations present in patients with Paroxistic Nocturnal Haemoglobinuria, or with clinical suspicion of having Paroxistic Nocturnal Haemoglobinuria.

From the patients studied, it was identified a frameshift mutation in exon two, that leads to a truncated protein (Thr192fX7). In the rest of the patients, we couldn't find any other disease causing mutation, even though we can't exclude completely the possibility of a mutation that can't be detected by sequencing.

We found however, a possible polymorphism (-342C→G), in the *PIGA* promoter in many patients, both affected or non- affected by Paroxistic Nocturnal Haemoglobinuria. The frequency of this polymorphism should be determined in a larger population.

## Índice

Introdução .....	1
I Hemoglobinúria paroxística nocturna.....	2
I.I Perspectiva histórica .....	2
I.II As âncoras GPI (“Glycosylphosphatidylinositol”).....	4
I.II.I A importância das âncoras GPI .....	4
I.II.II Estrutura e síntese das âncoras GPI .....	5
I.II.III O diagnóstico da HPN .....	7
I.II.IV Os modelos para a HPN .....	10
I.III A base molecular da doença – o gene <i>PIGA</i> .....	11
I.III.I Estrutura do gene <i>PIG-A</i> .....	11
I.III.II Frequência das mutações no gene <i>PIGA</i> .....	12
Objectivo .....	14
Material e Métodos.....	16
II Material e Métodos .....	17
II.I Amostras .....	17
II.II Extracção de DNA.....	17
II.III Amplificação do gene <i>PIGA</i> .....	17
II.IV Análise e quantificação dos produtos de PCR .....	19
II.V Purificação e quantificação dos produtos de PCR .....	19
II.VI PCR assimétrico e preparação dos produtos para sequenciação.....	19
II.VII Sequenciação em electroforese capilar .....	20
II.VIII Análise das sequências .....	20
Resultados .....	21
III Resultados experimentais.....	22
III.I Amostras e amplificação .....	22
III.II Análise das alterações encontradas .....	22
Discussão .....	27
Bibliografia .....	30
Anexos .....	33

## Abreviaturas e siglas

*Annealing* – Ligação de sequências de DNA a uma sequência complementar

DNA – Ácido desoxiribonucleico

GPI – *Glycosylphosphatidylinositol*

HPN – Hemoglobinúria paroxística nocturna

*In silico* – expressão usada para simulação em computador

mRNA -- RNA mensageiro

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

*PIGA* – gene que codifica para a proteína PIGA

*PIGAP* – Pseudogene do gene *PIGA*

*Primer* – Sequência nucleotídica iniciadora do PCR

*primer-dimer* – Dímeros de primers

RNA – Ácido ribonucleico

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*

*Stem cell* – célula pluripotente hematopoiética

---

## INTRODUÇÃO

## I Hemoglobinúria paroxística nocturna

Só foi no fim do século passado que foi identificada uma doença denominada por Hemoglobinúria Paroxística Nocturna, ou Síndrome de Marchiafava-Micheli. Trata-se de uma doença clonal adquirida rara, que resulta da produção de células sanguíneas com maior sensibilidade para o complemento. O nome desta doença deriva do facto de alguns doentes apresentarem uma urina matinal vermelha, estando ainda associada a esta doença, uma maior frequência de trombozes devido à activação dos sistemas da coagulação complemento.

### I.I Perspectiva histórica

A Hemoglobinúria Paroxística Nocturna (HPN) foi pela primeira vez descrita, em 1882 por Strubing (Strubing P, 1882). Esta doença foi inicialmente caracterizada como uma doença hemolítica que dava origem a uma hemoglobinúria que se caracterizava por aparecer no final da noite (Figura 1).



Figura 1 – Urina de um doente com HPN. À esquerda encontra-se a primeira urina do dia e para a direita, amostras de urina durante o dia. Notar a aparência escura da urina do início do dia e a sua evolução ao longo do tempo (Adaptado de <http://www.thecrookstoncollection.com/>).

No entanto, a natureza molecular e patofisiológica desta doença continuam ainda muito longe de ser completamente desvendadas. Foi muito precocemente, no entanto, que se definiu esta doença como estando dependente de “factores séricos” que determinavam a sensibilidade dos eritrócitos (van den Bergh, 1911; CLAPP MP, 1952). Mais tarde, Ham verificou que os eritrócitos dos doentes com a HPN eram mais sensíveis a soro acidificado, e desenvolveu assim o primeiro teste de diagnóstico para a HPN.

No entanto, só mais tarde é que discerniu qual a razão para a lise aumentada dos eritrócitos nestes doentes, a qual estava associada à acção do sistema do complemento (Rosse *et al.*, 1966; Rosse *et al.*, 2004).

No entanto, mais tarde foi identificado que não só os eritrócitos mas também todas as outras linhas celulares hematopoiéticas partilhavam desta característica, o que levanta a hipótese de que se tratava de uma alteração que ocorria nas células hematológicas pluripotentes e que, depois se manifestaria em todas as linhas celulares que resultassem dessa célula inicial (Nicholson-Weller *et al.*, 1985; Richards *et al.*, 2000b). Tal hipótese previa o aparecimento de uma doença clonal, o que foi prontamente provado em 1970 (Oni *et al.*, 1970; Richards *et al.*, 2000c).

Só foi em 1983, que se identificou qual a grande diferença entre eritrócitos normais e os eritrócitos dos doentes com HPN: a existência de “Decay Accelerating Factor” (DAF) (Nicholson-Weller *et al.*, 1983; Pangburn *et al.*, 1983). Os doentes com HPN apresentam eritrócitos sem DAF e sem MIRL, o que lhes confere uma maior sensibilidade ao sistema do complemento (Figura 2).

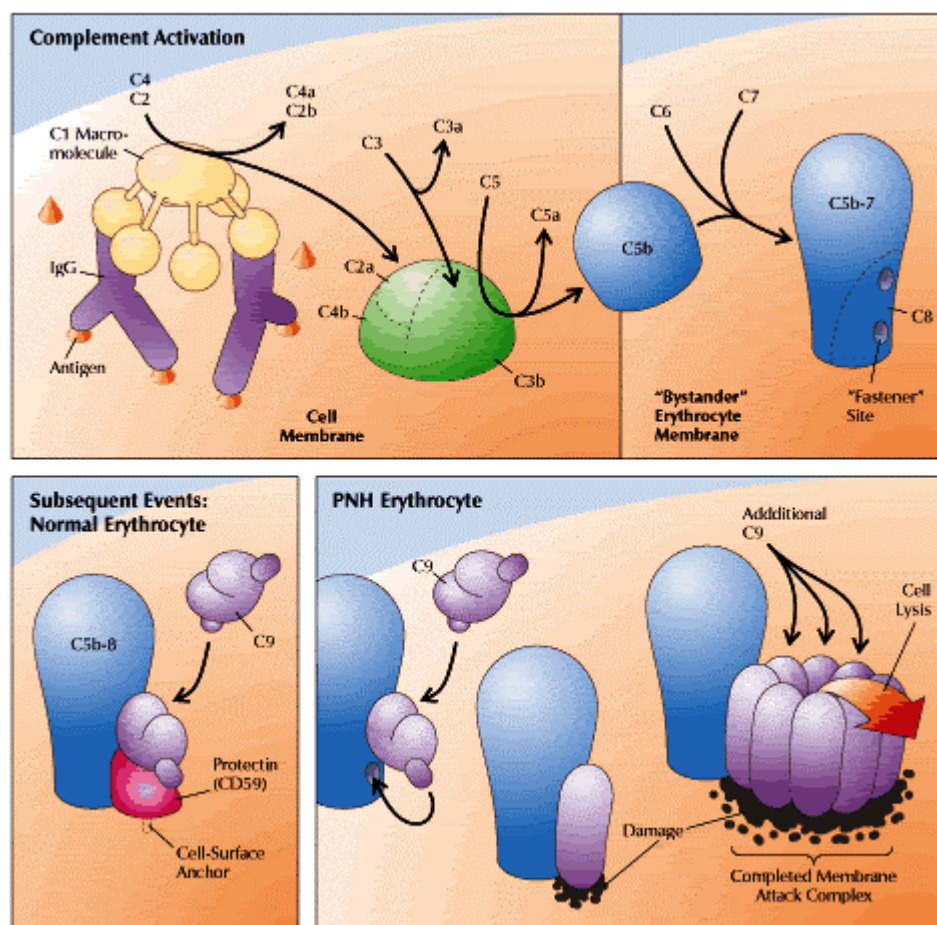


Figura 2 – Resistência dos eritrócitos à lise pelo sistema do complemento. Na via clássica do complemento a proteína C1 leva à activação do C2 e C4 que, por sua vez, activa a proteína C3. as subunidades destas proteína levam à formação do complexo C2aC3bC4b que activa a proteína C5. Finalmente o C5b vai iniciar a cascata de eventos que leva à formação do complexo MAC (“Membrane Attack Complex”). Nos eritrócitos normais, este complexo é impedido de se formar devido à presença das proteínas DAF e MIRL (CR55 e CD59) que protegem os eritrócitos do ataque pelo sistema do complemento. (Adaptado de <http://www.hosppract.com/genetics/9709gen.htm>).



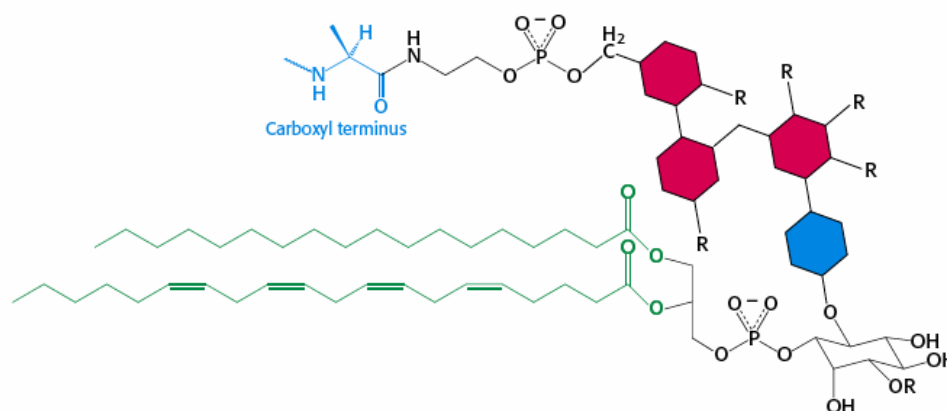
Verificou-se ainda que as células da linha HPN apresentavam não só deficiência em DAF mas em todas as proteínas ligadas a GPI (*Glycosylphosphatidylinositol*), o que sugeria uma forte evidência de deficiência das próprias âncoras GPI (Holguin *et al.*, 1989).

## I.II As âncoras GPI (“Glycosylphosphatidylinositol”)

### I.II.I A importância das âncoras GPI

As âncoras GPI (

Figura 3) permitem fazer a ligação de múltiplas proteínas às membranas de várias células e microrganismos. Podemos enumerar várias enzimas (fosfatase alcalina ou a acetilcolinesterase, por exemplo), vários transportadores e receptores (transferrina, CD14, CD16), proteínas de adesão e receptores (NCAM, CD55, CD59, Thy-1). As âncoras GPI permitem a formação do péptido A $\beta$ , a proteína amilóide que está envolvida na doença de *Alzheimer*, e estão também envolvidas em doenças neurodegenerativas em humanos e animais provocadas por príões tal como *Scrapie*, Doença de *Creutzfeld-Jakob* ou a BSE sustendo a



forma patogénica da proteína priónica (Eisenhaber *et al.*, 2003).

Figura 3 – Estrutura de uma âncora GPI. (Imagem de (Jeremy M.Berg *et al.*, 2005).

As âncoras GPI são ainda usadas por alguns microrganismos como camuflagem para escaparem ao sistema imunológico, recorrendo a um mecanismo denominado de *painting*, em que, basicamente, trocam as suas proteínas ligadas a GPI com proteínas de células do hospedeiro (Lillico *et al.*, 2003; Eisenhaber *et al.*, 2003).

### I.II.II Estrutura e síntese das âncoras GPI

A síntese da âncora GPI ocorre por um processo complexo, envolvendo múltiplas proteínas de vários complexos enzimáticos cujos componentes já são conhecidos na sua maioria (Tabela 1). A síntese das âncoras começa pela formação de  $\alpha$ -1,6-N-acetilglucosaminilfosfatidilinositol a partir de fosfatidilinositol e UDP-GlcNAc. O complexo enzimático que cataliza esta reacção localiza-se na face citoplasmática do Retículo Endoplasmático (RE) (Passo 1 da Tabela 1) e é formado por um conjunto de seis proteínas e por outros possíveis componentes ainda não identificados, que interagem e contribuem para a reacção. O PIG-A cataliza a reacção química em questão e está localizada na membrana do RE contendo uma grande porção citoplasmática (Eisenhaber *et al.*, 2003). O componente ligado mais fortemente ao PIG-A, é o PIG-H (Watanabe *et al.*, 1996). Apesar de haver produção mensurável de âncora GPI, na ausência do PIGH, a produção de âncoras GPI está muito diminuída (<1% dos níveis normais) indicando uma função essencial desse componente na síntese das âncoras GPI.

Tabela 1 – Componentes da via de síntese das âncoras GPI<sup>1</sup> em mamíferos.

Passo	Complexo enzimático	Ligando	Componente
1	GPI-GlcNAc-transferase	UDP – GlcNAc	PIG-A PIG-C PIG-H PIG-P PIG-Q DPM2
2	de-N-acetylase	-	PIG-L
3	Acyltransferase	Palmitoil-CoA	?
4	Flipase	-	?
5	Manosil-transferases	Dol-P-Man	PIG-M PIG-B FLJ12768
6	Fosfoetanolaminotranferases	PEtN	PIG-N ? PIG-O PIG-F
7	Transamidase	Lípido âncora GPI	PIG-K GPAA1 PIG-S PIG-T
8	Inositol desacetilase	-	?

<sup>1</sup> O traço “-” e o ponto de interrogação “?” indicam que o ligando ou o componente não são conhecidos [Adaptado de Eisenhaber *et al.*, 2003].

A reacção 2 – a desacetilação, é catalisada pelo PIG-L. Esta proteína está localizada principalmente na face citoplasmática e na membrana do RE. A sua actividade é dependente de iões bivalentes *in vitro* ( $Mn^{2+}$  e  $Ni^{2+}$ ). Esta proteína parece interagir com os outros complexos enzimáticos, embora fracamente, talvez para facilitar a transferência dos intermediários entre eles (Eisenhaber, *et al*, 2003).

Para os passos 3 e 4 ainda não foram identificadas as proteínas que estão envolvidas nestas reacções (Tabela 1).

A reacção 5 envolve a transferência de resíduos de manose para a âncora em formação. As âncoras GPI dos mamíferos contêm três unidades de manose e são adicionadas por 3 manosiltransferases (embora haja indicação da existência de uma outra). A sequência destas três proteínas é relativamente conservada, sendo possível encontrar ortólogos em muitos dos eucariotas (Eisenhaber, *et al*, 2003; <http://mendel.imp.univie.ac.at/SEQUENCES/gpi-biosynthesis/>).

A reacção 6, a adição de fosfoetanolamina aos 3 resíduos de manose, é executada por 3 enzimas (Tabela 1). O PIG-N que promove a reacção com a primeira manose e cuja actividade não é essencial em mamíferos. A enzima seguinte PIG-O é responsável pela modificação do segundo e terceiro resíduo de manose, mas aparentemente uma deficiência nesta proteína não elimina totalmente a ligação às âncoras GPI em mamíferos ao contrário da última proteína do complexo – PIG-F que é essencial para a modificação do terceiro resíduo de manose, em mamíferos (Eisenhaber, *et al*, 2003).

A penúltima reacção (7) é catalisada por um que inclui uma enzima com actividade proteolítica que foi identificada como PIG-K. Este último complexo faz o reconhecimento da sequência C-terminal, para a ligação às âncoras GPI e cataliza a sua ligação. As proteínas do complexo interagem entre elas, mas é o componente PIG-T que é mais importante para a estabilidade do complexo e que interage mais activamente com o PIG-K (Eisenhaber, *et al*, 2003).

Finalmente em relação à última reacção ainda não foi identificado, em mamíferos, o componente envolvido na reacção embora tenha sido recentemente identificado em *T. brucei* (Guther *et al.*, 2001).

As proteínas ligadas a âncoras GPI aparecem na membrana não de um modo aleatório, mas em zonas bem definidas da membrana celular – *Lipid rafts*. Alguns dos intermediários da síntese das âncoras GPI já foram identificados em extractos que se supõe estar associados a essas *lipid rafts*. No entanto ainda não foi definido se os vários complexos envolvidos na formação das âncoras se co-localizam na membrana para otimizar as interacções entre as várias proteínas. Um artigo recente, indica a possibilidade da existência de *rafts* no próprio RE,

compartmentalizando assim, a própria síntese das âncoras GPI e definindo assim uma estrutura altamente organizada para a biossíntese das âncoras GPI (Pielsticker et al., 2005) (Figura 4).

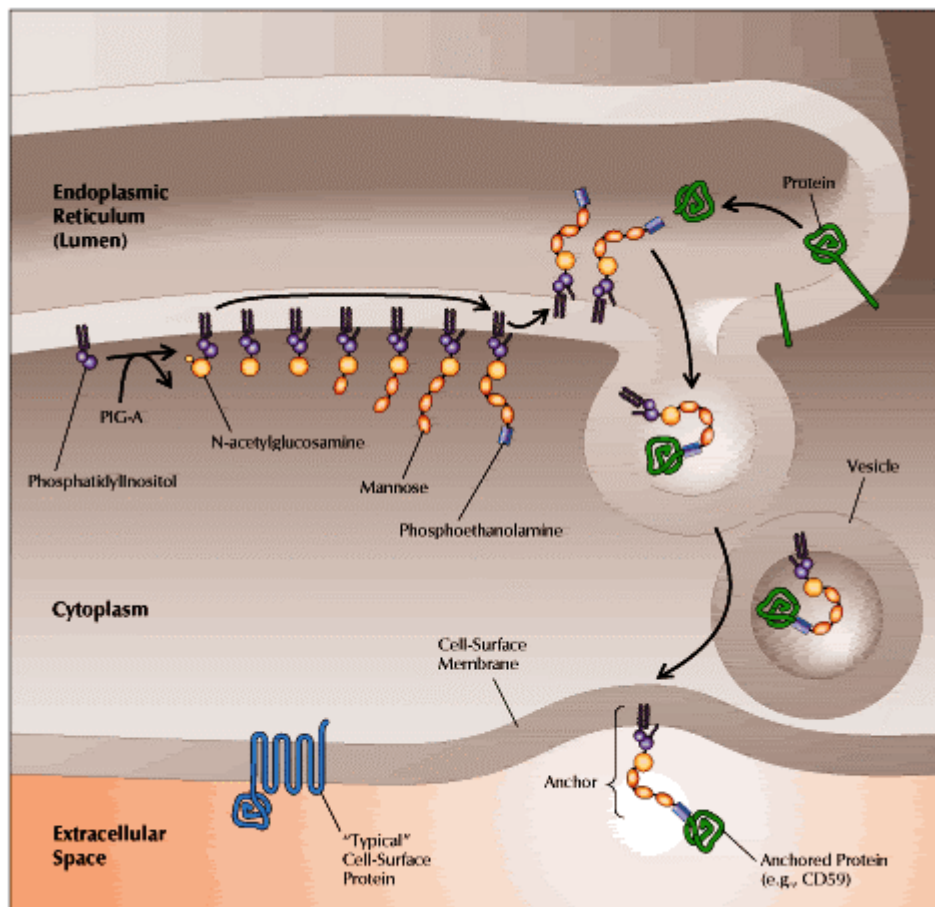


Figura 4 – Via de biossíntese da âncora GPI. A N-Acetilglucosamina (GluNAc) é adicionada ao fosfatidilinositol na superfície externa do Retículo Endoplasmático (RE). A GluNAc é posteriormente desacetilada e posteriormente é adicionado outro ácido gordo ao inositol. A molécula inteira é então transferida ("flipped") para a cisterna do RE. Acrescenta-se uma molécula de manose ao dolicol fosfato, dando origem ao DPM (Dolicol-fosfato manose) na membrana externa do RE que depois é também transferida para a cisterna. O DPM actua como dador de manose em três processos de manosição e é acrescentada simultaneamente etanolamina a cada manose. A proteína é sintetizada e introduzida na cisterna do RE e uma transamidase cliva-a a liga-a à etanolamina terminal. Depois do processamento no complexo de Golgi, a proteína vai aparecer na superfície da célula. Nota: Não se conhece exactamente o passo em que a biossíntese passa a ser intracisterna, podendo mesmo ser sintetizada a âncora inteira na face citoplasmática. (Rosse e tal, 1995; imagem de <http://www.hospract.com/genetics/9709gen.htm>)

### I.II.III O diagnóstico da HPN

Como já foi referido, o diagnóstico da HPN era efectuado baseando-se nas propriedades hemolíticas das células, tentando-se identificar a lise dos eritrócitos através do teste de Ham. No entanto, quando se verificou que não só os eritrócitos, mas também todas as outras linhas celulares hematopoiéticas eram deficientes em âncoras GPI, tornou-se evidente que seria necessário um novo teste de diagnóstico que permitisse visualizar todas as linhas celulares. Foi assim que se desenvolveu o novo método de referência para o diagnóstico da HPN, que se

---

baseia em citometria de fluxo. Faz-se a marcação de células de sangue periférico com anticorpos para as proteínas ligadas a âncoras GPI (Tabela 2) e identificam-se os grupos de células que não apresentam marcação. Por regra usam-se os marcadores CD55 e CD59, embora para algumas linhas celulares seja necessário o uso de outros marcadores para melhor diferenciação das linhas celulares e para uma melhor diferenciação entre as células que expressam ou não âncoras GPI (Richards *et al.*, 2000a).

A identificação de outras células que não expressam GPI levou à classificação dos doentes com HPN em dois grupos, cuja grande diferença é o tamanho do clone HPN dos eritrócitos:

- 1) HPN hemolítico – caracteriza-se pelo aparecimento de episódios de anemia hemolítica acompanhados de hemoglobinúria. Ocorrem trombooses venosas em cerca de 50% destes doentes e as trombooses são a causa de morte de cerca de um terço destes doentes.
- 2) HPN hipoplásico – caracteriza-se pela existência de clones deficientes em GPI sem o aparecimento de hemólise mas com identificação de outros sintomas tais como anemia, leucopenia, trombocitopenia ou pancitopenia. Cerca de 10% destes doentes morrem de anemia aplásica.

Existem ainda alguns doentes que não se enquadram em nenhum destes grupos e inclusive alguns dos doentes que pertencem ao grupo do HPN hipoplásico evoluem para o grupo do HPN hemolítico. Também foram identificados doentes com síndrome de Budd-Chiari, cuja apresentação é basicamente uma forma grave de trombose hepática nos quais se identificou mais tarde a presença de um clone HPN (Graham *et al.*, 1996; Richards *et al.*, 2000a; Bahr *et al.*, 2003).

Assim, e segundo Richards *et al.* (2000) para o diagnóstico da HPN é necessário identificar deficiência das âncoras GPI em pelo menos duas linhas celulares e usando pelo menos dois marcadores diferentes. A necessidade do uso de dois marcadores deve-se ao facto de estarem identificadas doenças congénitas que levam à deficiência não, nas âncoras GPI nas em proteínas que se ligam a essas âncoras (Tabela 2). É o caso das deficiências em CD55 e CD59, que são os marcadores mais usados e para os quais já foram identificados doentes com deficiências congénitas nessas proteínas (Walport, 2001). Alguns destes doentes foram identificados por apresentarem trombooses espontâneas mas sem hemólise dos quais se identificou mais tarde terem uma forma congénita de deficiência de âncoras GPI.

Tabela 2 – Antígenos das células hematopoiéticas, ligados a GPI (Adaptado de(Hall *et al.*, 2002a)).

Antígeno	Cluster de diferenciação	Expressão/Função
<b>Moléculas reguladoras do complemento</b>		
DAF	CD55	Todas as células hematopoiéticas; inibidor das C3 e C5 convertases
MIRL	CD59	Todas as células hematopoiéticas; liga-se ao componente C8 do complemento evitando a ligação e polimerização das moléculas do complemento
<b>Proteína de ligação ao C8</b>		
<b>Enzimas</b>		
Fosfatase alcalina de neutrófilos		Enzima de Neutrófilos
Acetilcolinesterase das células vermelhas		Enzima dos glóbulos vermelhos
Ecto-5'-nucleotidase	CD73	Enzima dos Linfócitos B e T
ADP-Ribosil transferase	CD157	Enzima de Linfócitos T ou Neutrófilos
<b>Receptores</b>		
Receptor Fc IIIa	CD16	Neutrófilos; Envolvido na Fagocitose; Receptor de complexos imunes
uPAR	CD87	Células T; Células NK; Monócitos; Iniciação da Fibrinólise
Receptor de endotoxinas	CD14	Expressão forte em Monócitos, fracamente expresso em Granulócitos
<b>Antígenos dos grupos sanguíneos</b>		
Antígenos de Cromer (DAF)	CD55	Antígeno de eritrócitos
Antígenos de Cartwright (Ache)		Antígeno de eritrócitos
Antígeno de Holley Gregory		Antígeno de eritrócitos
Antígeno de John Milten Hagen (JMH)	CD108	Antígeno de eritrócitos/Antígeno de plaquetas; possível papel na adesão
Resíduo de Dombrock		Antígeno de eritrócitos
<b>Moléculas de adesão</b>		
Blast-1	CD48	Linfócitos e monócitos; receptor/ligando de ligação a ao CD224
LFA-3	CD58	Todas as células hematopoéticas; ligando envolvido na ativação de células T.
	CD66a	Molécula de adesão de Neutrófilos/ eosinófilos
	CD66b	
	CD66c	
Antígeno carcinoembrionário	CD66e	
<b>Antígenos de Neutrófilos</b>		
NA1/NA2		Antígeno de Neutrófilos
NB1/NB2		Antígeno de Neutrófilos
<b>Outros</b>		
Campath-1	CD52	Linfócitos / Monócitos; Função desconhecida
	CD24	Células B e granulócitos/ Função desconhecida
GP500		Plaquetas
GP175		Plaquetas
Thy-1	CD90	Subpopulação de stem cell; Pequena subpopulação de células T
GPI-80		? Regulação de endereçamento de leucócitos
Vanin-1		Expresso em células do estroma tímico

A análise dos eritrócitos é, por regra, o primeiro método para a identificação dos clones HPN. É também o mais simples de efectuar uma vez que, devido à morfologia dos eritrócitos, é possível identificar estas células sem uma marcação específica para os eritrócitos, o mesmo não acontecendo para as outras linhas celulares. Também é usando os eritrócitos que se consegue identificar os tipos de clones HPN. Estes podem ser divididos em três grupos (Richards *et al*, 2000):

Tipo III – Deficiência total de proteínas ligadas a âncoras GPI.

Tipo II – Deficiência parcial de proteínas ligadas a âncoras GPI.

Tipo I – Expressão normal de proteínas ligadas a âncoras GPI.

Estes três grupos também são indicativos da evolução da doença e da evolução do clone HPN.

#### I.II.IV Os modelos para a HPN

Continua ainda sem explicação, porque é que um clone de células que é deficiente em todas as proteínas ligadas às âncoras GPI, consegue subsistir e mesmo suplantar as células normais.

Existem várias hipóteses para tentar explicar este facto, embora nenhuma tenha hoje em dia factos suficientes que a comprovem de modo satisfatório.

Uma das explicações possíveis consiste na maior resistência destas células à apoptose (Kulkarni and Bessler, 2002; Chen *et al.*, 2005). Foi mesmo comprovada a expressão de antiapoptóticos em células deficientes em âncoras GPI (Chen *et al.*, 2005). Este facto daria origem ao desenvolvimento de um clone de um modo muito semelhante ao desenvolvimento de cancro. No entanto, ao contrário do cancro, estas células, não têm capacidade proliferativa (Erickson, 2003).

Uma outra possibilidade deve-se ao facto da HPN aparecer muitas vezes associada a aplasia medular (Hall *et al.*, 2002b). Neste caso supõe-se que as células deficientes em GPI têm algo que as protege do ataque celular, sendo as células normais eliminadas e o clone HPN expandindo-se para compensar a eliminação das células (Johnson and Hillmen, 2002). Foi recentemente comprovado que estas células realmente são mais resistentes ao ataque pelas células NK (Nagakura *et al.*, 2002) não expressando marcadores necessários para a actuação das células NK.

### I.III A base molecular da doença – o gene *PIGA*

A maior parte dos doentes com HPN apresentam clones deficientes nas âncoras GPI. No entanto, tendo em conta os vários complexos enzimáticos envolvidos na síntese das âncoras GPI (Tabela 1), só estão descritas mutações na proteína PIG-A em praticamente todos os doentes estudados. Em 1993, Miyata *et al.*, identificaram o gene que codifica para esta proteína por uma série de experiências de complementação com linhas celulares que não expressavam proteínas ligadas a GPI e passavam a fazê-lo quando transfectadas com o gene *PIGA* (Miyata *et al.*, 1993).

#### I.III.I Estrutura do gene *PIGA-A*

O gene *PIGA* localiza-se no braço do curto do cromossoma X (Xp 22.1), compreende uma zona de 16.07Kb e é formado por 6 exões (Figura 5) (Hu *et al.*, 2005). Também está descrito um pseudogene (*PIGAP*) para o gene *PIGA* que tem a forma do gene processado e que se localiza no *locus* 12q21 (Bessler *et al.*, 1994).

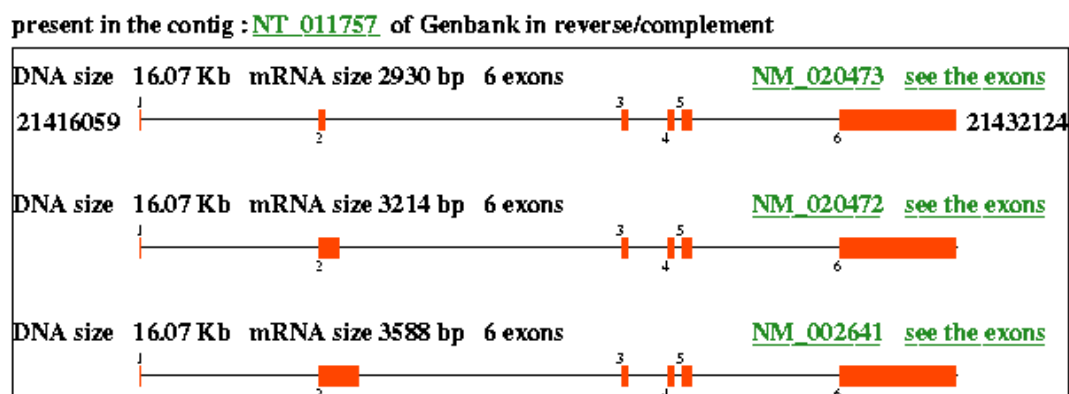


Figura 5 – Estrutura do gene *PIGA*. O gene é constituído por 6 exões e apresenta 3 formas que resultam de *splicing* alternativo. A diferença principal entre as três formas encontra-se no tamanho do exão 2. É de notar a diferença entre os vários tamanhos do mRNA que resulta das diferentes formas. De <http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/>

A zona 5' não traduzida engloba todo o exão 1 e uma parte do exão 2. Por sua vez a zona 3' não traduzida é constituída pela maior parte do exão 6 tendo o tamanho de 2.1Kb (lida *et al.*, 1994a)).

O promotor é constituído por cerca de 580bp e não tem elementos TATA box. Possui, no entanto, 4 elementos CAAT box (-53 a -57bp, -97 a -101bp, -292 a -296bp, -473 a -477bp), duas sequências AP-2 (-72 a -79bp e -147 a -154bp) e uma sequência CRE (-169 a -176bp) (Figura 6). A deleção dos elementos CAAT box mais *upstream* provocam uma diminuição da actividade da proteína para cerca de 50%, o mesmo acontecendo em relação ao primeiro elemento AP-2 e o terceiro elemento CAAT. A deleção do elemento AP-2 mais



---

*downstream* ou do elemento CAAT mais próximo do exão1 provocam uma ausência quase total de actividade da proteína (Iida et al, 1994) (Figura 6).

Já foram descritas mais de 100 mutações esporádicas ao longo do gene (Rosti, 2000). A grande maioria destas mutações são pequenas deleções e inserções que levam a alterações no código de leitura e à produção de proteínas truncadas. As mutações pontuais são frequentes e normalmente estão associadas a formas menos severas de HPN. Embora se encontrem mutações por todo o gene, existem evidências recentes de um possível *hotspot* para mutações em determinados exões (Mortazavi *et al.*, 2003). Ao contrário das outras mutações, as mutações “missense” parecem associadas ao exão 2 indicando que este exão provavelmente contém uma zona importante de domínios envolvidos na formação do complexo da transferase (Rosti et al., 2000).

Não se conhecem muitas mutações que envolvam o promotor mas está descrita uma grande deleção que envolve o promotor, o exão 1 e parte do intrão 1. Do mesmo modo também não se conhecem mutações de *splicing*.

### I.III.II Frequência das mutações no gene *PIGA*

Como já foi referido anteriormente (I.III.I) já estão descritas mais de 100 mutações no gene *PIGA* de natureza somática. Não se conhece a verdadeira incidência da HPN mas pensa-se que possa atingir entre 1 por 100.000, a 1 por 1.000.000 de pessoas. O seu aparecimento pode acontecer em qualquer idade uma vez que é provocada por mutações adquiridas, embora a média ronde os 35 anos (Hall et al, 2002). Não foram descritas mutações no gene *PIGA* de natureza congénita até à data, embora já se tenha identificado pelo menos 35 SNP's, sendo a grande maioria localizados em intrões ou em zonas não traduzidas.

A frequência de mutações é relativamente semelhante em mulheres e homens, e ao contrário de outras mutações ligadas ao cromossoma X, tanto as mulheres como os homens são afectados. Isto deve-se ao facto de a inactivação inicial do cromossoma X ocorrer aleatoriamente, e se o cromossoma X activo da *stem cell* houver uma mutação no gene *PIGA*, todas as células dessa linhagem vão ter o mesmo gene *PIGA* mutado sendo a mulher afectada pela doença e não apenas uma simples portadora da mutação.

```

-560                                     -583                                     -561
CAGAGTGTAG AATTGCCATA TAAATAACAG GATGTCTAGT TAAATTTACA TGTCGGATAA AAAACGAATG TGTAGTGAAG -481
-480 CAAT box                                     -401
TCCCCAATAT TTGGTACATG CTTGTATTAA ACATCATTGG TGCTTTATCT GAAATTAAAA CTTCATAGTT TCATCTGTGT
-400                                     -321
TGACTTTTTG TGTATTTTTA TTTATTTATC TGGCAAACGT CCCAGAGCGG TAAGAACCCG CACGGTTTTG CCGTGGCACA
-320                                     CAAT box                                     -241
GCTGATTACA AACAAAAAGT CTCTCAATC AGAAGCAAGC GCGCAGAGAA CTGGCGTCCG GAATAGAGAC GCTGTAACCA
-240                                     CRE                                     -161
GGAAACCAGG GTGAGCACCC ACCCTACCGT CGGCCGCTTC TAGGAGACGG GCGCAGGCGC GCGCTGACGT TACATCTCGC
-160 AP-2                                     CAAT box                                     -81
GCTTAAGGGT GGGGACGACA GAGCGTCTCT CTCGGACGTG ACCTCAGCGC CTCCTTTGTGA TTGGCTGCCT CGGGGGCGCG
-80 AP-2                                     CAAT box                                     -1
GCCCTTGGGC GCGGACGCC TAGATTGGTG CTGCGGACA GCAGGGAGGG ACTCCGGCTG CAGCCCGGG AGGTCCGGAC
Exon 1 (23 bp)                                     Intron 1 (3.6 kbp)
ACTGGCGGCC ATGGAACTCA CCGgtgagtg cgcgtcggcg cccctctcca gcgctctggg ccgctttcgg atggggctgt
1                                     23
tct.....
..... ctggatttgt aatatggaat gtgttttgtt tctgagctga gatcctgttt
.....
Exon 2 (777 bp)
tactcttttt cagGTAAATAG AGGACACATC TCCTAACTGG GTTGCTCTAA GAAGTGAATG CTAACCCGTC TCAGCATGGC
24
CTGTAGAGGA GGAGCTGGGA ATGGCCACCG TGCCCTCAGCT AACTCTCTC GGGTTAGCCC TGGAACTCTT TACACATGTA
GAACCCGTAC ..... TGTACTAAGA GCAGCACTGA ATCCTGAAAT AGTGTCCTGC ATTCCTAATG CTGTAGATCC
TACTGACTTC ACTCCAGACC CATTAGAAG GCATGATAGT ATAACATTG TTGTTGTCAG CAGACTTGTG TACAGAAAAG
800
Intron 2 (5.1 kbp)
gtaatgaaat gatagctata attgcattgt agactttttt cccctataga agctgttgaa tacttgtata taatgattgt
ttggc.....
.....aa gagagttttc tcccttatgg agtgcatagc
atagctaata cttttcaaaa taagtggatt ctcagtcggt ctgggtgaatt ttttaagtt taatatataa tatctccaac
Exon 3 (133 bp)
attcaacttt atattttcag GGATCGATTT GCTTAGTGGT ATAATACCTG AACTCTGTCA GAAATATCCA GATTTAAATT
801
TCATAATTGG AGGAGAGGGA CCAAGAGAA TCATTTTGGG AGAAGTTCGG GAAAGATACC AGCTGCATGA CAGgtattga
933
(0.8 kbp)
tgaatttcct gttgtcttga gggagaagat gtcaattatc totatttggg ttttaactga tgcgtacett aggtgtgttg
cttctcctgc at.....tgtaataa
aatagcagc ttggtttata saataaattt cttttgtagc atgagttttc actcctttct tcccctctca tttaaaaaat
Exon 4 (133 bp)
cagGGTGCCT CTTTTGGGAG CTTTAAACA CAAGGATGTT AGAAATGCT TAGTTCAGG ACATATTTT CTGAATACCT
934
CCCTTACTGA AGCATCTGC ATGGCGATCG TGGAAAGCAG CAGTTGTGGT TTACAGgtaa aaagctttga gggcattcat
1065
Intron 4 (148 bp)
ggttgggatt tctgtgtatt ttgaaaaata atgagacaca ttccataata atgttttaac tggttttgtt gatcttctg
Exon 5 (207 bp)
aggtatgatt atgggtggag atgtgttctt tctttctttt taagGTGTA AGTACCAGAG TTGGTGGAA TCTTGAGGTG
1067
CTCCAGAAA ACCTTATTAT TTTATGAGG CCTTCAGTAA AATCTTTGTG TGAAGGATTG GAAAAGGCTA TTTCCAAC
GAAATCAGG ACATTGCCAG CTCCAGAAA CATCCATAAC ATAGTAAAGA CTTTCTACAC CTGGAGGAAT GTTCAGAAA
Intron 5 (3.0 kbp)
GAACTGAAA Ggtatgtcac atgctgagaa aagattgtgt ctgaactctt acttgatgtt tcaogtacc atttgcttt
1273
tcttcat agatgtttac ctttt.....
.....ttat aaastgttc tgcaggatcg ggtcattggt tatcatggga caggtgatgg ggtgatgggt gaaagtgtc
acacttggct tctctccctc cagGTATATG ACCGGGTATC AGTGGAACT GTGTTGCCAA TGGACAAAC ACTGGACAGA
1274
CTTATTTCTC ACTGCGGCC AGTAACAGGC TACATCTTTG CTTTGTGGC AGTTTCAAC TTCCTCTCC TCATTTCTT
GAGATGGATG ACTCCAGATT CTATCATTGA ..... CATTGCTCTA CCTGCTACT TAGTTGATT TAAAGTGAAT
TTACAGTAT GAGAAATTG TGAAAAATAT ATTGTATTTC TTTTATGTT TCAAAAAGGT GCCTATGAAA AACTGATTTG
TTAAAACATG CTACATGTCC AAAAATAAAG ACCAGAATGA CATTTTGATA atttctgag tttgtcttat tttatgaaca
3589
gactattatt tactagtaaa taatagt

```

Figura 6 – Sequência nucleotídica do gene PIG-A (lida *et al.*, 1994b).

## OBJECTIVO

O objectivo deste trabalho foi identificar e caracterizar as mutações no gene *PIGA*, numa população de doentes com deficiências de proteínas ligadas ao GPI, ou com suspeita clínica de HPN, que se apresentaram com hemólise e/ou citopenias de causa não esclarecida. A selecção dos doentes e a avaliação da expressão de proteínas ligadas ao GPI nos diferentes tipos de células do sangue periférico, foi feita no Laboratório de Citometria de Fluxo. O gene *PIGA* (promotor e zona codificante) destes doentes foi sequenciado para a identificação das referidas mutações e outras possíveis alterações.

---

**MATERIAL E MÉTODOS**

---

---

## II Material e Métodos

### II.I Amostras

No presente trabalho foram estudados 17 doentes com diagnóstico de HPN, ou com suspeita clínica de HPN, do Hospital Geral de Santo António e de outros hospitais da região norte. Os doentes foram seleccionados na triagem do Grupo Hemato-oncológico do serviço de Hematologia Clínica. Foi enviado sangue periférico que foi conservado a -20°C até ao momento da extracção. Não foram aceites amostras com menos de 500µL, com excepção daquelas em que havia indicação de possuírem um clone HPN muito abundante.

Foram ainda usadas amostras de arquivo (03-10113, 03-10114, 03-10115), que tinham sido guardadas em forma de sedimento de células mononucleares.

### II.II Extracção de DNA

O DNA foi extraído de modo a concentrar as amostras ao máximo, uma vez que a grande maioria apresenta um número de células nucleadas muito baixo. Assim, usou-se um método automático de extracção que usa 1mL de sangue periférico concentrando o DNA cinco vezes (Volume de eluição de 200µL) – *MagnaPure LC* (Roche, Alemanha). Este sistema de extracção usa partículas magnéticas revestidas de sílica para adsorver o DNA e separá-lo dos restos celulares. Um magneto incorporado no aparelho permite-lhe isolar o DNA adsorvido à sílica. A eluição do DNA é efectuada com uma solução tamponada ligeiramente alcalina que permite diluir com mais eficiência o DNA (incluída no kit de extracção).

Usou-se um kit de extracção específico para a extracção de DNA a partir de sangue periférico *MagNA Pure LC DNA Isolation Kit – Large Volume* (Roche; Espanha).

O DNA foi conservado a 4°C depois da extracção.

As amostras em *pellet* foram reconstituídas com soro fisiológico e extraídas no mesmo aparelho de extracção automático *MagnaPure LC*, mas com um kit diferente – *MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I* (Roche; Espanha), usando um protocolo de extracção com uma lise externa, com o tampão de lise fornecido no kit. A lise celular faz-se durante 10 minutos, à temperatura ambiente num agitador. O resto da extracção fez-se no sistema automático e fez-se a eluição do DNA em 50µL de tampão de eluição.

### II.III Amplificação do gene *PIGA*

Amplificou-se a zona codificante do gene *PIGA*, as zonas intrónicas adjacentes e o promotor do gene *PIGA*. Os primers foram desenhados usando o programa OMIGATM 2.0,

(Oxford Molecular Company) de modo a obter-se uma temperatura de *annealing* igual para todos os *primers*. Alguns dos *primers* tiveram que ser desenhados manualmente devido a existência de algumas zonas com elevado conteúdo de GC (Tabela 3).

Todos os *primers* foram testados *in silico* com auxílio do programa OMIGA e usando um programa para análise de *primers* – *Virtual PCR* (Lexa et al., 2001; Lexa and Valle, 2003). Todos os *primers* foram sintetizados pela empresa Operon Biotechnologies (Qiagen, Alemanha).

Tabela 3 – Primers usados para a amplificação do gene *PIGA*.

PCR	Primers 5'→3'	T <sub>m</sub> (°C)	Tamanho primer (bp)	Tamanho PCR (bp)
Prom1	Prom1 (R)* CAGCCAATCACAAAGAGG	58	18	546
	Prom1 (F) CCTAGTCAAGCACCATCG	60	18	
Prom2 <sup>2</sup>	Prom2 (R) CAGAACAGCCCCATCCGAAA	62	20	331
	Prom2 (F)* CCAGGAAACCAGGGTGAGCA	64	20	
Exão 2.1	2.1 (R)* GAGCTGAGATCCTGTTTTACTCT	61	23	487
	2.1 (F) GAAAAAGAACTATGTGAATGGAT	56	23	
Exão 2.2	2.2 (R)* ACAGCCACGACCCTCTTTTCACAG	66	23	497
	2.2 (F) GCCAAACAATCATTATATACAAG	56	23	
Exão 3	3 (R) TGGATTCTCAGTCGTTCTGGTGA	63	23	244
	3 (F)* CTTCTCCCTCAAGACAACATGAA	61	23	
Exão 4.5	4.5 (R)* TCACTCCTTTCTTCCCCTCTC	63	21	580
	4.5 (F)* GTACGTGAAACATCAAGTAAGAG	59	23	
Exão 6	6 (R) GGTCATTGTTTATCATGGGACAG	61	23	361
	6 (F)* TCTTACAATCTAGGCTTCCTTC	59	22	

<sup>2</sup>Com excepção dos *primers* correspondentes a este segmento (Prom2), todos os outros foram desenhados com o auxílio do programa OMIGA.

\*Primers usados para preferencialmente para análise das seqüências. Os PCR Prom1 e Prom2 amplificam o promotor e o exão 1 (não codificante) do gene *PIGA*. Os PCR 2.1 e 2.2 amplificam o exão 2, o PCR 3 amplifica o exão 3 e zonas intrónicas adjacentes. O PCR 6 amplifica a zona codificante do exão 6 e o PCR 4.5 amplifica os exões 4 e 5. Para a sequenciação destes últimos exões faz-se a leitura de cada um dos exões em sentidos diferentes

No PCR usou-se uma concentração de 0.5µM de cada uma das combinações de primers, 200µM de dNTP's, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub> (fornecido com a enzima EXT), tampão [50mM Tris/HCl (pH 9.0 a 25°C), 15mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100] fornecido com a enzima e uma unidade de enzima Dynazyme-EXT DNA polimerase (Finnzymes, Finlândia). Usou-se uma quantidade de DNA mínima de aproximadamente 50ng de DNA por reacção de PCR e água ultrapura (Promega, Itália) até completar um volume final de 50 µL. A amplificação fez-se num termociclador Perkin Elmer 9600 (Roche). Fez-se uma desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 3 segmentos: desnaturação a 94°C durante 50 segundos, *annealing* a

60°C durante 30 segundos e amplificação a 72°C durante 1 minuto. Finalmente fez-se uma amplificação final a 72°C durante 10 minutos.

#### II.IV Análise e quantificação dos produtos de PCR

Todos os produtos de PCR foram analisados no sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Caliper, USA) em chip de DNA – *DNA 1000 LabChip Kit* (Agilent Technologies). Este sistema usa um sistema de electroforese capilar em microchip. As amostras são corridas juntamente com um marcador de pesos moleculares e de massa, que permite quantificar a massa e determinar o tamanho dos amplicons com grande rigor.

#### II.V Purificação e quantificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados com colunas Microcon-100 (Millipore, USA), segundo o protocolo descrito na bula do produto. Os produtos de PCR purificados foram corridos de novo num *DNA 1000 LabChip Kit*, no aparelho Agilent 2100 Bioanalyzer e quantificados para determinar a quantidade de produto de PCR a usar no passo seguinte (II.VI).

#### II.VI PCR assimétrico e preparação dos produtos para sequenciação

A sequenciação foi feita bireconalmente recorrendo aos primers usados na amplificação, usando-se preferencialmente os primers indicados na Tabela 3 para a análise das sequências. Todos os reagentes necessários à reacção, inclusive enzima e dideoxynucleótidos, estão contidos na mistura – kit *BigDye Terminator* vs3.1 (Applied Biosystems, Espanha). A reacção de PCR assimétrico foi efectuada com 80ng de produto de PCR purificado, ou quando tal não era possível, com um máximo de 10µL de DNA purificado. Além do DNA, a mistura continha, 4.0µL da mistura *Big Dye Terminator* vs3.1, 0.16pmol µL<sup>-1</sup> do primer correspondente para cada reacção, e água ultrapura (Promega, Itália) até um volume final de 20 µL. Todas as sequências com alterações foram confirmadas com nova amplificação do DNA e nova reacção de sequenciação nos dois sentidos.

A amplificação fez-se num termociclador Perkin Elmer 9600 (Roche). Fez-se uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 25 ciclos de 2 segmentos: desnaturação a 96°C durante 10segundos, *annealing* a 50°C durante 5segundos e amplificação a 60°C durante 4 minutos.

Os produtos do PCR assimétrico foram purificados com colunas AutoSeq – G50 (Amersham BioSciences, Holanda), segundo o protocolo descrito pelo kit.



## II.VII Sequenciação em electroforese capilar

Os produtos de PCR assimétrico purificados foram então misturados com igual volume de TSR (*Template Suppressor Reagent*) (*Applied BioSystems*, Espanha) e desnaturados durante 2 minutos a 95°C. De seguida foram imediatamente colocados em gelo, onde permaneceram durante 10 minutos. De seguida os produtos foram sequenciados num sequenciador automático ABI 310 (*Applied BioSystems*) e analisados com o programa Sequencing analysis vs5.2 (*Applied BioSystems*).

## II.VIII Análise das sequências

As sequências foram analisadas com auxílio do programa ChromasPro vs1.32 (Technelysium Pty) e com o programa BioEdit vs7.0.5.2 (Hall, 1999). Todos os electroferogramas foram analisados visualmente para identificação de pequenas populações com possíveis mutações. Finalmente foi igualmente realizado um alinhamento com o genoma humano (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast>) para melhor identificação de clones predominantes com mutações.

## RESULTADOS

### III Resultados experimentais

#### III.I Amostras e amplificação

Foram seleccionados 20 doentes para análise. O resumo dos dados clínicos dos doentes encontra-se na Tabela 4.

Os exões, promotor e zonas intrónicas adjacentes foram amplificados como indicado em material e métodos, e optimizados de modo a obter-se o mínimo de primer-dimer (Figura 7).

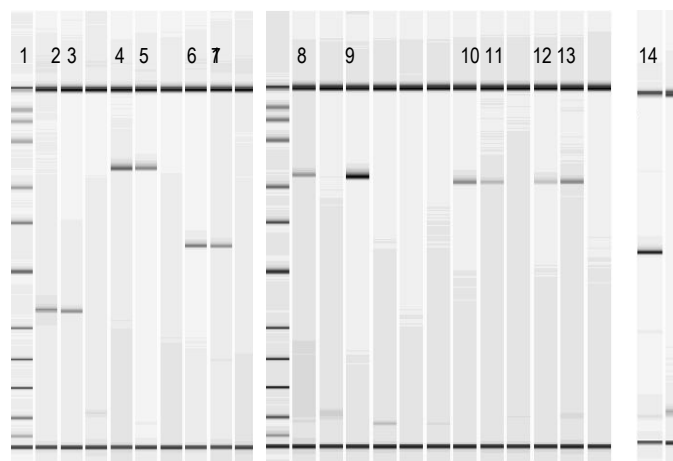


Figura 7 – Análise de electroforese para verificação de amplificação dos produtos de PCR para sequenciação do gene *PIGA*. 1) Marcador de pesos moleculares; 2 e 3) Produto de PCR 3; 4 e 5) Produto de PCR 4.5; 6 e 7) Produto de PCR 6; 8 e 9) Produto PCR Prom1; 10 e 11) Produto de PCR 2.1; 12 e 13) Produto de PCR 2.2; 14) Produto de PCR Prom2. Todas as sequências estão alinhadas com um marcador interno.

#### III.II Análise das alterações encontradas

Na grande maioria das amostras obteve-se um único PCR do tamanho esperado com excepção dos correspondentes à primeira zona do promotor (Prom1) para as amostras 03-10114, 03-10115, 04-87, 04-90, 04-2066, 08-373, 05-554 e 05-633, e para o PCR 2.2 da amostra 03-3044 (Tabela 4).

No caso do PCR Prom1 verifica-se a existência de duas bandas de tamanho muito próximo em algumas das amostras (Figura 8). Quando sequenciadas, estas amostras revelaram a existência de uma alteração C→G, em heterozigotia na posição -342 (Figura 8 e Figura 9). Esta alteração não se encontra em nenhuma zona de regulação já identificada.

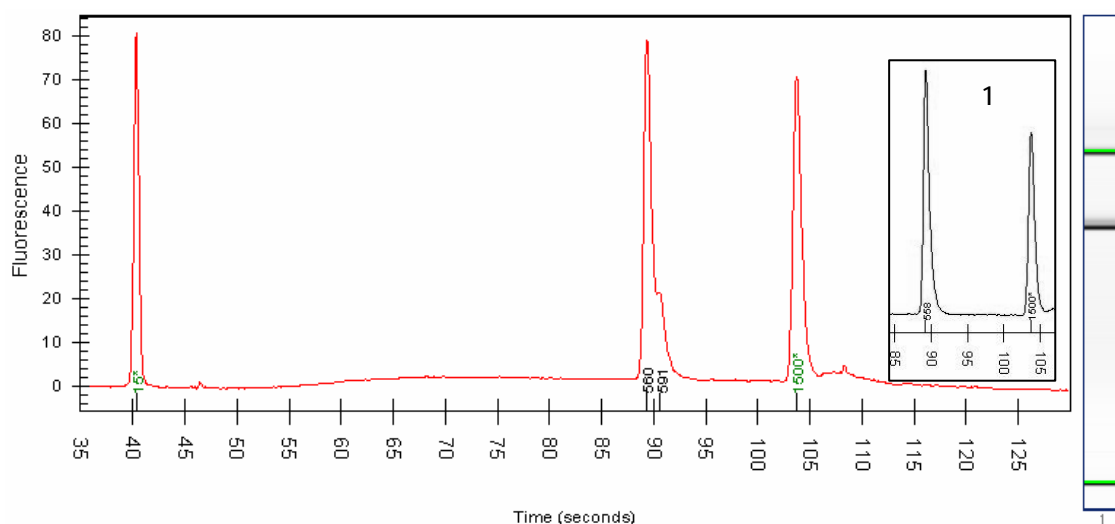


Figura 8 – Electroferograma do PCR Prom1. Verifica-se a existência de duas bandas (560 e 591 bp). No painel 1, encontra-se um segmento do electroferograma correspondente a um produto de PCR simples.

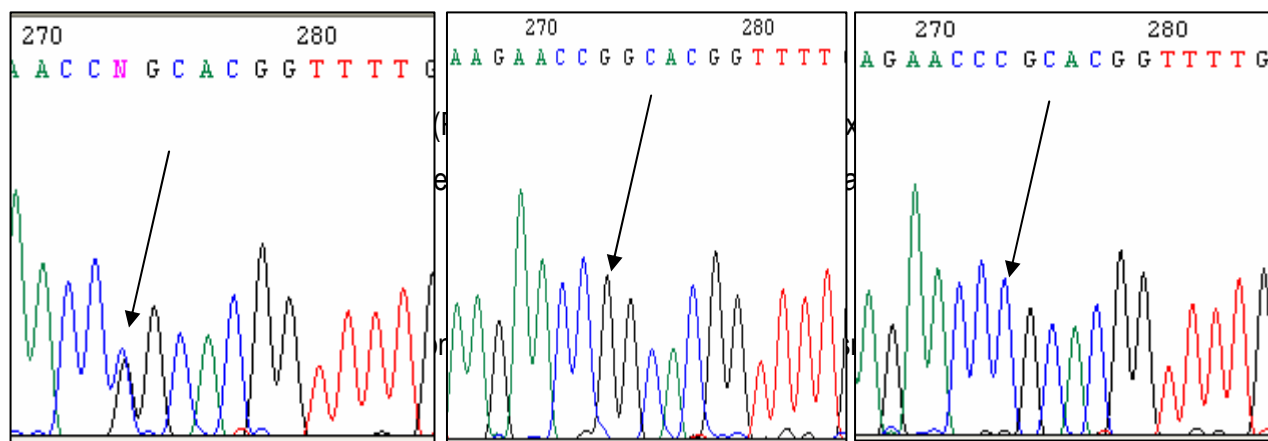


Figura 9 – Sequência do promotor do gene PIGA com alteração no nucleótido -342. À esquerda a alteração em heterozigotia, e ao centro e à direita, os alelos respectivos em homozigotia.

No caso da amostra 03-3044 a amplificação do PCR2.2 revelou a existência de mais do que um produto de PCR. Quando analisado em microchip a amostra apresentava 4 amplicons de tamanho diferente (Figura 11)

Curiosamente, em gel de agarose (que apresenta menor resolução), só eram visíveis 2 bandas para o PCR 2.2 desta amostra (Figura 10).

Tabela 4 – Resumo de informação clínica e resultados da sequenciação do gene *PIGA* para os doentes estudados. É de notar que as amostras 03-3906 e 04-627 correspondem ao mesmo doente, em momentos diferentes de avaliação da doença.

Amostra	Data de nascimento	Sexo	Informação clínica	nº leucócitos *1000/L	% clone HPN eritrócitos	%clone HPN Neutrófilos	%clone HPN Monócitos	Pesquisa de mutações no promotor <sup>3</sup>	Pesquisa de mutações na zona codificante <sup>3</sup>
03-10113		M		n.d	n.d	40%	46%	Sem alterações	Sem alterações
03-10114		F		n.d	n.d	99%	95%	-342C>G heterozigotia	Sem alterações
03-10115		F		n.d	n.d	91%	95%	-342C>G heterozigotia	Sem alterações
03-1753	15-04-1939	F	Pancitopenia marcada;esplenomegalia.	1500	Negativo	Negativo	Negativo	Sem alterações	Sem alterações
03-3044				n.d	n.d	96%	93%	Sem alterações	586delGTACT Thr192fx5
03-3906	01-08-1968	M		n.d	17%	68%	64%	-342C>G homozigotia	Sem alterações
04-87	15-11-1943	F	Pancitopenia em estudo.	2900	Negativo	Negativo	Negativo	-342C>G heterozigotia	Sem alterações
04-90	18-04-1946	F	Trombocitopenia em estudo.	5700	Negativo	Negativo	Negativo	-342C>G heterozigotia	Sem alterações
04-627	01-08-1968	M	HPN, reavalição.	3500	10%	67%	65%	PCR Prom1 sem alterações. PCR Prom 2 com segunda sequência.	Sem alterações
04-2066	18-07-1974	F	Trombose da veia porta.	5800	Duvidoso			-342C>G heterozigotia	Sem alterações
05-373	19-03-1958	F	Hipoplasia medular. HPN positiva em amostra anterior (Neutrófilos e monócitos)	3500	1,40%	3%	5%	-342C>G heterozigotia	Sem alterações
05-522	20-03-1933	M	Pancitopenia. Hemólise acentuada e hemoglobinúria. Resposta favorável à corticoterapia.	3000	29%	48%	23%	Sem alterações	Exão 4 e 5 sem alterações.
05-554	13-01-1932	F	SMD? Trombocitopenia de novo.	5300	Negativo	Negativo	Negativo	-342C>G heterozigotia	Sem alterações
05-626	05-07-1934	M		4400	17%	37%	50%	Sem alterações	Sem alterações
05-633	20-11-1979	F	HPN	5400	88%	99%	99%	-342C>G heterozigotia	Sem alterações
05-963	17-03-1931	M	Pancitopenia	2000	Negativo	Negativo	Negativo	n.d	Exão 2 sem alterações
05-989	12-02-1971	F	Anemia aplásica em imunossupressão.	1000	Negativo	Negativo	Negativo	Segmento Prom2 sem alterações.	Exões 2 e 4 sem alterações

<sup>2</sup> As sequências foram analisadas por alinhamento com a sequência descrita em (Iida *et al.*, 1994a) (gi60391270). n.d – não disponível.

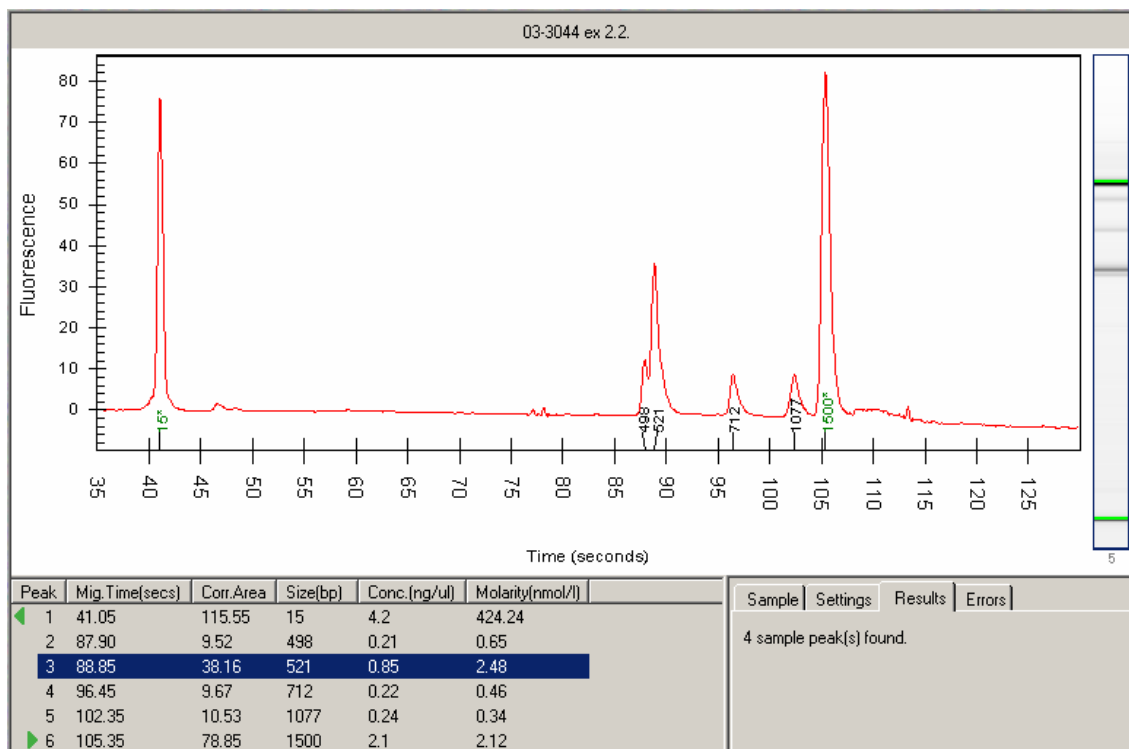


Figura 11 – Electroferograma do produto de PCR 2.2 para a amostra 03-3044.

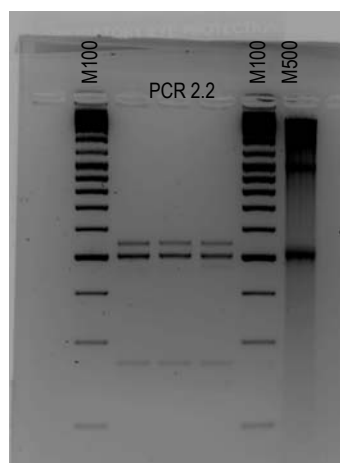


Figura 10 – PCR 2.2 para o doente 03-3044, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M100-marcador de peso molecular de 100 bp; M500-Marcador de peso molecular de 500 bp

A sequenciação da amostra anterior revelou a existência de uma mutação *frameshift* resultante de uma deleção de 5 nucleótidos (Figura 12). Esta mutação encontra-se em sobreposta à sequência normal, evidenciando a existência de um clone normal e de um clone com a referida mutação.

No caso da amostra 04-627 não foi possível analisar a sequência do PCR Prom2 uma vez que apresentava pelo menos uma sequência sobreposta impossibilitando a análise das sequências.

Para a amostra 05-522 só foi possível sequenciar os exões 4 e 5 da zona codificante. Não se sequenciou do mesmo modo, o PCR Prom1 das amostras 05-963 e 05-989, o PCR Prom2 da amostra 05-963, nem os PCR's 3, 4.5, e 6 da zona codificante nestas duas amostras.

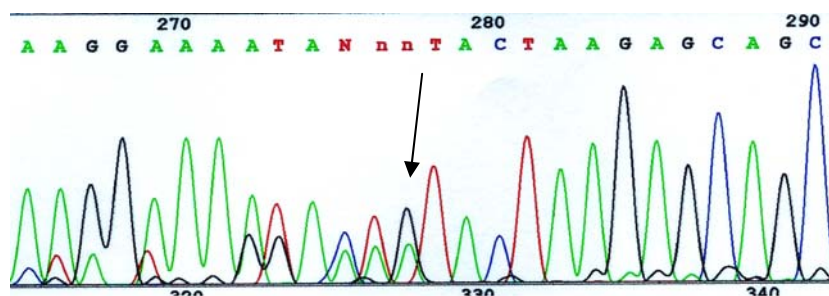


Figura 12 – Sequência do doente 03-3044 (PCR2.2) com deleção de GTACT.

## DISCUSSÃO



Em primeiro lugar, torna-se evidente a dificuldade de identificar alterações em clones pouco representados por métodos de sequenciação. A existência de ruído nas sequências faz a interpretação muito difícil e errônea, tendo que se recorrer à identificação visual das mutações e à comparação com sequências referência e a posterior confirmação para eliminar artefactos. Decerto métodos tais como PCR em tempo real seriam mais eficazes para a identificação de mutações e possíveis clones mutados mas, neste contexto, essas alternativas não são possíveis uma vez não existe uma mutação típica para a qual se possa desenhar sondas específicas e mais sensíveis.

No entanto, a identificação dos clones mutados mesmo em doentes com clones deficientes em âncoras GPI de grande representatividade não foi possível para a maioria dos doentes.

Foi identificada uma mutação (delGTACT) que provoca uma mutação *frameshift* que com todas a probabilidade é responsável pela falta de expressão da proteína, uma vez que a proteína é truncada no quinto codão após a mutação. No caso deste doente, o resultado, está de acordo com o previsto, sendo evidente dois clones populacionais: um com mutação e um normal embora pelas percentagens de células com clone HPN (>95%) pudéssemos assumir que só seria visível a sequência mutada.

Em relação às outras amostras, embora não se tenham detectado, mutações na maioria delas, identificou-se uma alteração no promotor (-342C→G) do gene *PIGA*. Esta apresentação pode representar um polimorfismo ainda não descrito ou uma mutação frequente na nossa população. Para excluir a possibilidade de ser uma alteração adquirida, e portanto poder ser causadora da doença, terá que se sequenciar as células epiteliais dos doentes para identificação do polimorfismo noutras linhas celulares que não as hematopoiéticas. Depois desta confirmação poder-se-ia então sequenciar uma série de indivíduos normais para determinação da frequência do polimorfismo/mutação na nossa população. Apesar de não fazer parte da base de dados de SNP's encontram-se já existem sequências descritas com os dois alelos (Iida *et al.*, 1994a) e NT\_011757).

Finalmente durante o trabalho, tornou-se evidente a importância da electroforese capilar, mesmo em aparelhos como o Agilent2100 para a identificação de possíveis alterações na sequência. Apesar de não apresentar uma sensibilidade absoluta, em determinados casos (ver Figura 8) mesmo mutações pontuais são evidentes usando este aparelho para analisar os produtos de PCR. No caso da deleção no exão 2 (Figura 11) não só foi nítida a diferença de

---

tamanho (deleção de 4 nucleótidos), como apareceram bandas adicionais. Estas bandas resultam decerto da alteração das características de migração provocadas pelo polímero usado nesta electroforese. A longo prazo e com óbvias optimizações a electroforese capilar em aparelhos tais como o Agilent2100 seriam uma óptima alternativa a técnicas, ou muito trabalhosas tais como o SSCP, ou que necessitam de aparelhos muito dispendiosos tal como o HPLC para fazer *screening* de mutações. No caso do contexto clínico pode ser importante a disponibilidade de uma ferramenta tal como esta que permite dirigir o estudo para um resultado mais rápido e eficaz.

Para concluir, existem outras possibilidades que permitem a explicação dos resultados obtidos e que permitiriam uma melhor caracterização destes doentes.

O facto de termos encontrado unicamente mutações num só dos doentes pode e dever-se a vários factores:

A amplificação pode ser mais eficiente para a sequência normal, uma vez que está descrito que foi possível identificar mutações no gene *PIGA* para praticamente todos os doentes descritos, e mesmo em indivíduos normais (Hu *et al.*, 2005). Isto leva a supor que é essencial uma selecção das células com deficiência em âncoras GPI para a identificação das mutações no gene *PIGA*. Neste caso podia-se tirar proveito da existência de um citómetro com capacidade de *Cell Sorter* para se isolar as células do clone HPN.

No entanto, e dada a existência de amostras com grandes clones HPN, não é de excluir a hipótese de que, na nossa população, as mutações não sejam mutações pontuais ou pequenas deleções. Os nossos doentes de HPN, poderão eventualmente apresentar grandes deleções que não são detectáveis por sequenciação, ou mesmo até alterações que não levam a alterações da sequência, tais como as alterações na metilação do DNA. Para estudar a primeira hipótese seria necessário obter amostras com muito maior quantidade para se proceder a estudos de Long PCR ou mesmo Southern-Blot. No último caso pode-se verificar a existências de ilhas CpG no promotor de modo a estudar essa possibilidade.

Também será importante definir no futuro, a importância do polimorfismo/mutação encontrado no promotor com um estudo alargado da nossa população. Neste caso será simples desenhar um PCR em tempo real para a detecção do polimorfismo/mutação. No caso de se vir a confirmar a patogenicidade desta alteração, teríamos assim, uma ferramenta simples e rápida para a identificação dos doentes com HPN.

## BIBLIOGRAFIA

- Bahr MJ, Schubert J, Bleck JS, Tietge UJ, Boozari B, Schmidt RE, Klempnauer J, Strassburg CP, and Manns MP (2003) Recurrence of Budd-Chiari syndrome after liver transplantation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Transpl Int*, 16, 890-894.
- Bessler M, Hillmen P, Longo L, Luzzatto L, and Mason PJ (1994) Genomic organization of the X-linked gene (PIG-A) that is mutated in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and of a related autosomal pseudogene mapped to 12q21. *Hum Mol Genet*, 3, 751-757.
- Chen G, Zeng W, Maciejewski JP, Kcyvanfar K, Billings EM, and Young NS (2005) Differential gene expression in hematopoietic progenitors from paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients reveals an apoptosis/immune response in /'normal/' phenotype cells. 19, 862-868.
- CLAPP MP, WILLIAMS MJ, and MENDEL JL (1952) Observations on the hemolytic mechanism of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; demonstration of the activity of at least two serum factors in PNH hemolysis. *Blood*, 7, 1117-1124.
- Eisenhaber B, Maurer-Stroh S, Novatchkova M, Schneider G, and Eisenhaber F (2003) Enzymes and auxiliary factors for GPI lipid anchor biosynthesis and post-translational transfer to proteins. *Bioessays*, 25, 367-385.
- Erickson RP (2003) Somatic gene mutation and human disease other than cancer. *Mutat Res*, 543, 125-136.
- Graham ML, Rosse WF, Halperin EC, Miller CR, and Ware RE (1996) Resolution of Budd-Chiari syndrome following bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*, 92, 707-710.
- Guther ML, Leal S, Morrice NA, Cross GA, and Ferguson MA (2001) Purification, cloning and characterization of a GPI inositol deacylase from *Trypanosoma brucei*. *EMBO J*, 20, 4923-4934.
- Hall C, Richards SJ, and Hillmen P (2002a) The glycosylphosphatidylinositol anchor and paroxysmal nocturnal haemoglobinuria/aplasia model. *Acta Haematol*, 108, 219-230.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*, 41, 95-98.
- Holguin MH, Fredrick LR, Bernshaw NJ, Wilcox LA, and Parker CJ (1989) Isolation and characterization of a membrane protein from normal human erythrocytes that inhibits reactive lysis of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest*, 84, 7-17.
- Hu R, Mukhina GL, Piantadosi S, Barber JP, Jones RJ, and Brodsky RA (2005) PIG-A mutations in normal hematopoiesis. *Blood*, 105, 3848-3854.
- Iida Y, Takeda J, Miyata T, Inoue N, Nishimura J, Kitani T, Maeda K, and Kinoshita T (1994b) Characterization of genomic PIG-A gene: a gene for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 83, 3126-3131.
- Iida Y, Takeda J, Miyata T, Inoue N, Nishimura J, Kitani T, Maeda K, and Kinoshita T (1994a) Characterization of genomic PIG-A gene: a gene for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 83, 3126-3131.
- Jeremy M.Berg, John L.Tymoczko, and Lubert Stryer (2005). Lipids and Cell Membranes. In W.H.Freeman (Ed.), *Biochemistry*, ., pp. 319-344.

- Johnson RJ and Hillmen P (2002) Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Nature's gene therapy? *Mol Pathol*, 55, 145-152.
- Kulkarni S and Bessler M (2002) The effect of GPI-anchor deficiency on apoptosis in mice carrying a Piga gene mutation in hematopoietic cells. *J Leukoc Biol*, 72, 1228-1233.
- Lexa M, Horak J, and Brzobohaty B (2001) Virtual PCR. *Bioinformatics*, 17, 192-193.
- Lexa M and Valle G (2003) PRIMEX: rapid identification of oligonucleotide matches in whole genomes. *Bioinformatics*, 19, 2486-2488.
- Lillico S, Field MC, Blundell P, Coombs GH, and Mottram JC (2003) Essential Roles for GPI-anchored Proteins in African Trypanosomes Revealed Using Mutants Deficient in GPI8. *Mol Biol Cell*, 14, 1182-1194.
- Miyata T, Takeda J, Iida Y, Yamada N, Inoue N, Takahashi M, Maeda K, Kitani T, and Kinoshita T (1993) The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. *Science*, 259, 1318-1320.
- Mortazavi Y, Merk B, McIntosh J, Marsh JC, Schrezenmeier H, and Rutherford TR (2003) The spectrum of PIG-A gene mutations in aplastic anemia/paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (AA/PNH): a high incidence of multiple mutations and evidence of a mutational hot spot. *Blood*, 101, 2833-2841.
- Nagakura S, Ishihara S, Dunn DE, Nishimura J, Kawaguchi T, Horikawa K, Hidaka M, Kagimoto T, Eto N, Mitsuya H, Kinoshita T, Young NS, and Nakakuma H (2002) Decreased susceptibility of leukemic cells with PIG-A mutation to natural killer cells in vitro. *Blood*, 100, 1031-1037.
- Nicholson-Weller A, Spicer DB, and Austen KF (1985) Deficiency of the complement regulatory protein, "decay-accelerating factor," on membranes of granulocytes, monocytes, and platelets in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*, 312, 1091-1097.
- Nicholson-Weller A, March JP, Rosenfeld SI, and Austen KF (1983) Affected Erythrocytes of Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria are Deficient in the Complement Regulatory Protein, Decay Accelerating Factor. *PNAS*, 80, 5066-5070.
- Oni SB, Osunkoya BO, and Luzzatto L (1970) Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: evidence for monoclonal origin of abnormal red cells. *Blood*, 36, 145-152.
- Pangburn MK, Schreiber RD, and Muller-Eberhard HJ (1983) Deficiency of an Erythrocyte Membrane Protein with Complement Regulatory Activity in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *PNAS*, 80, 5430-5434.
- Pielsticker LK, Mann KJ, Lin WL, and Sevlever D (2005) Raft-like membrane domains contain enzymatic activities involved in the synthesis of mammalian glycosylphosphatidylinositol anchor intermediates. *Biochem Biophys Res Commun*, 330, 163-171.
- Richards SJ, Rawstron AC, and Hillmen P (2000a) Application of flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry*, 42, 223-233.
- Rosse WF, Dourmashkin R, and Humphrey JH (1966) IMMUNE LYSIS OF NORMAL HUMAN AND PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA (PNH) RED BLOOD CELLS: III. THE MEMBRANE DEFECTS CAUSED BY COMPLEMENT LYSIS. *J Exp Med*, 123, 969-984.
- Rosse WF, Hillmen P, and Schreiber AD (2004) Immune-Mediated Hemolytic Anemia. *Hematology*, 2004, 48-62.
- Rosti V (2000) The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*, 85, 82-87.
- Strubing P (1882) Paroxysmale haemoglobinurie. *Dtsch Med Wochensc*, 8, 1-8.
- van den Bergh A (1911) Ictère hémolytique avec crises hémoglobinuriques. *Rev Méd Paris*, 31, 63-69.

Walport MJ (2001) Complement. First of two parts. *N Engl J Med*, 344, 1058-1066.

Watanabe R, Kinoshita T, Masaki R, Yamamoto A, Takeda J, and Inoue N (1996) PIG-A and PIG-H, which participate in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis, form a protein complex in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 271, 26868-26875.

<http://www.thecrookstoncollection.com/>

<http://www.hosprract.com/genetics/9709gen.htm>

<http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/>

<http://mendel.imp.univie.ac.at/SEQUENCES/gpi-biosynthesis/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast>

## ANEXOS

(Sequências representativas das sequências obtidas para a sequenciação do gene *PIGA*)