

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Análise abrangente de variantes de *GNPTAB* associadas à  
atividade deficiente da GlcNAc-1-fosfotransferase**

Nataniel Floriano Ludwig

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Ida Vanessa Doerdelein Schwartz

Coorientador: Fernanda Sperb-Ludwig

Porto Alegre  
Agosto de 2020

## Contextualização

Os resultados presentes nessa tese foram desenvolvidos durante o curso de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Departamento de Genética, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Estes resultados fazem parte de uma ampla pesquisa em andamento, coordenada pela Profa. Dr. Ida Vanessa D. Schwartz, e que tem como objetivo principal produzir novas informações úteis para o entendimento das Mucopolidoses II e III alfa/beta. Os estudos foram desenvolvidos no Laboratório BRAIN – Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences - que está localizado no Centro de Pesquisa Experimental, também no Serviço de Genética Médica e no Centro de Pesquisa Clínica, todas estruturas pertencentes ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Uma parte dos resultados descritos nessa tese foram desenvolvidos como um doutorado sanduíche realizado no grupo liderado pelos pesquisadores Dr. Thomas Braulke e Dr. Sandra Pohl, localizado no Department of Osteology and Biomechanics da University Medical Center Hamburg-Eppendorf, localizada na cidade de Hamburg na Alemanha.

Os projetos desenvolvidos nessa tese foram realizados com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE) e do Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation, SFB877-B3, PO 1539/1-1, KU 1240/10-1).

## Agradecimentos

As minhas orientadoras, Ida Vanessa Doederlein Schwartz e Fernanda Sperb-Ludwig. Obrigado pela confiança depositada lá em 2013, quando começamos a trabalhar juntos. Foi aquele ato de confiança e todas as experiências com vocês, e através de vocês, que possibilitaram meu crescimento profissional e pessoal. Obrigado pela dedicação do seu tempo e energia para contribuir com a minha formação profissional, sempre lembrarei disso. Também gostaria de agradecer aos meus orientadores internacionais, Thomas Braulke e Sandra Pohl, que mesmo num curto espaço de tempo contribuíram com a minha formação.

Aos meus colegas de laboratório, do Brain, do Centro de Pesquisa Experimental e Clínica e grupo de pesquisa com Mucopolidose do Brasil e Alemanha. Gostaria de agradecer pelas conversas sobre protocolos, sobre experimentos, sobre a carreira, sobre a vida e sobre o cotidiano. Pelos momentos de descontração, pelas brincadeiras e por fim, pela boa convivência.

Aos meus amigos. Aqueles que estão por perto, compartilhando desse momento da minha vida. Mas também aqueles que não estão aqui ao meu lado, que minhas escolhas de vida os distanciaram de mim. A todos esses, agradeço por quebrar a rotina, por tornar pequenos momentos em grandes lembranças, por pertencer a minha história e também por possibilitar que eu pertença as suas.

A minha família. Simplesmente por tudo, sem vocês esse momento não seria possível. Obrigado pelo carinho, pela compreensão, pela dedicação, pelo amor e pelo apoio. Obrigado por estar aqui, por eu ter para onde voltar. Obrigado pelos exemplos de vida e de pessoas que vocês são para mim. Aos meus pais, obrigado por me ensinar a sonhar, por possibilitar que eu fosse atrás desse sonho, e por todo o apoio que vocês já me deram, que estão dando nesse momento e que ainda darão. Obrigado por me possibilitar o que vocês dois não tiveram. Tudo o que eu conquistei é de vocês, eu espero um dia poder retribuir.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Fundo de Incentivo a Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM) e a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) que possibilitaram que esse trabalho fosse desenvolvido.

## Sumário

Introdução.....	12
Lisossomos .....	12
A via de manose-6-fosfato.....	14
As Mucopolídeos II e III.....	19
As ML II e III apresentam um espectro de manifestações clínicas .....	19
Características fisiopatológicas .....	20
Características moleculares .....	24
As subunidades $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ são constituídas de diferentes domínios .....	24
Os genes <i>GNPTAB</i> e <i>GNPTG</i> são considerados heterogêneos .....	35
As variantes patogênicas e a consequente gravidade do fenótipo.....	39
As ML II e III são doenças raras .....	41
A necessidade de um diagnóstico diferencial.....	42
Tratamentos: uma série de abordagens <i>in vitro</i> .....	44
Justificativa.....	47
Objetivos.....	49
Capítulo 1 – Combined <i>in vitro</i> and <i>in silico</i> analyses of missense mutations in <i>GNPTAB</i> provide new insights into the molecular bases of mucopolidosis II and III alpha/beta .....	50
Capítulo 2 – <i>GNPTAB</i> missense mutations cause loss of GlcNAc-1-phosphotransferase activity in mucopolidosis type II through distinct mechanisms .....	58
Capítulo 3 – A multi-technique approach to genetic diagnosis: a case report of a ML III alpha/beta patient in Brazil .....	64
Capítulo 4 – A decade of molecular diagnosis of Mucopolidosis II and III in Brazil: a pooled analysis of 33 patients.....	71
Discussão .....	93
O sítio catalítico da GlcNAc-1-fosfotransferase .....	93
As variantes do tipo troca de sentido retiradas no RE.....	94
Diagnóstico das ML II/III.....	95
Avaliação da atividade da GlcNAc-1-fosfotransferase .....	97
Conclusões por objetivo .....	98
Considerações finais e perspectivas .....	97
Referências Bibliográficas.....	98
Anexos e Apêndices .....	109
Anexo A - Carta de Aprovação do Projeto 2019-0374 pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre .....	109
Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pacientes Participantes do Projeto de Pesquisa 2018-0639.....	115
Apêndice B – Pôster apresentado em congressos da área .....	120
Apêndice C – Produção científica não relacionada à tese .....	122

## Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

RE - Retículo endoplasmático

COP - Coatômero

M6P - Manose-6-fosfato

GlcNAc - N-acetylglucosamine

UDP - Uridina Difosfato

Enzima descobridora - N-Acetylglucosamina-1-phosphodiester  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidase

MPR - Receptores de manose-6-fosfato

ML - Mucopolidose(s)

*GNPTAB* - Gene que codifica as subunidades  $\alpha/\beta$  da enzima GlcNAc-1-fosfotransferase

*GNPTG* - Gene que codifica a subunidade  $\gamma$  da enzima GlcNAc-1-fosfotransferase

S1P - Proteína Site-1-protease

HR-M6P - Domínio de homologia ao receptor de M6P

$\alpha$ -MM -  $\alpha$ -metil D-Manosídeo

aa - aminoácidos

## Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1 - Sistema endolisossomal e a via de manose-6-fosfato. ....	15
Figura 2 - Síntese dos Marcadores de Manose-6-fosfato. ....	17
Figura 3 – Estrutura das subunidades da GlcNAc-1-fosfotransferase.....	25
Figura 4 - Representação da estrutura de domínios presente na subunidade $\gamma$ .....	26
Figura 5 - Domínios identificados no precursor $\alpha/\beta$ do gene <i>GNPTAB</i> .....	29
Figura 6 – Distribuição dos dados genéticos de pacientes descritos com ML II e III.....	37
Figura 7 – Realização da mensuração da atividade da GlcNAc-1-fosfotransferase.....	43
Tabela 1 – Estudos funcionais de variantes patogênicas do gene <i>GNPTG</i> .....	26
Tabela 2 – Resultados de estudos funcionais com variantes patogênicas do gene <i>GNPTAB</i> .....	33

## Resumo

As hidrolases lisossômicas são peptídeos sintetizados em ribossomos acoplados à membrana, e concomitantemente incorporados ao lúmen do retículo endoplasmático. Ainda nessa organela, essas proteínas são modificadas com oligossacarídeos padrão em resíduos de asparaginas contidos em sua estrutura primária. A geração de resíduos de manose-6-fosfato (M6P) nos oligossacarídeos presentes nas hidrolases lisossômicas garante o direcionamento destas aos compartimentos lisossomais. A primeira etapa da geração de M6P é realizada pela GlcNAc-1-fosfotransferase, que é residente da porção *cis* do complexo de Golgi, e realiza o reconhecimento das hidrolases e a transferência de um resíduo de GlcNAc-1-fosfato do doador UDP-GlcNAc para o resíduo de manose na posição 6 do oligossacarídeo presente na hidrolase. A GlcNAc-1-fosfotransferase é um complexo hexamérico formado por duas subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  ( $\alpha^2\beta^2\gamma^2$ ), onde as duas primeiras são codificadas pelo gene *GNPTAB* e a terceira pelo gene *GNPTG*. Variantes patogênicas identificadas no gene *GNPTAB* causam as doenças lisossômicas raras Mucopolidoses (ML) II e III alfa/beta, e variantes em *GNPTG* causam a ML III gama. Essas doenças são graves e caracterizadas por um extravasamento de hidrolases lisossômicas ao ambiente extracelular e, conseqüentemente, a ausência destas nos compartimentos lisossomais, o que ocasiona um acúmulo de macromoléculas não degradadas. **Objetivos:** 1) Caracterizar os mecanismos fisiopatológicos de variantes patogênicas de *GNPTAB*; 2) Caracterizar pacientes brasileiros com ML II e III alfa/beta em relação a variantes patogênicas em *GNPTAB*. **Metodologia:** Etapa 1 - estudo *in vitro*, no qual construtos contendo as variantes p.Asp76Gly, p.Ser385Leu, p.Glu389Lys, p.Asp408Asn, p.His956Tyr, p.Arg986Cys e p.Leu1168Glnfs\*5 do gene *GNPTAB* foram geradas através de mutagênese sítio-dirigida, e transfectados por 24 horas em células HEK ou HeLa em condições normais de cultura celular. Extratos celulares foram avaliados através de deglicosilação enzimática, western blotting, imunofluorescência e microscopia confocal, e atividade enzimática residual. Etapa 2 - estudo transversal com amostragem por conveniência, no qual foi obtida amostra de DNA genômico ou RNA total de 18 pacientes não relacionados com ML II (n=10) ou III (n=8). O gene *GNPTAB* foi analisado através de sequenciamento de Sanger (n=17) e sequenciamento de nova geração (n=1). As variantes do tipo troca de sentido, ainda não descritas na literatura, foram pesquisadas em 200 alelos controles brasileiros. Etapa 3 - estudo retrospectivo que incluiu 32 pacientes brasileiros não relacionados (consanguinidade, n=6/32) com diagnóstico clínico

e genético de ML II/III alfa/beta. A frequência regional dos alelos alterados foi determinada.

**Resultados:** Etapa 1 – as variantes p.Ser385Leu, p.Glu389Lys, p.Asp408Asn, p.His956Tyr e p.Arg986Cys são expressas, transportadas e clivadas por S1P de maneira comparável à proteína selvagem, contudo todos os mutantes apresentam atividade residual inferior a 5%. Já a proteína mutante p.Asp76Gly é modificada com estruturas de glicosilação, permanece retida no retículo endoplasmático e, por consequência, possui atividade residual indetectável.

Etapa 2 - O genótipo foi determinado em 18 pacientes (ML II= 10, III alfa/beta= 8). Um total de 16 diferentes variantes foram encontradas, sendo nove ainda não descritas na literatura: r.86\_116conNM\_024312.5:19\_49, c.227A>G, c.831delT, c.1154C>T, c.1763insA, c.1927delAATT, c.2034dup, c.2720\_2721del e c.3333T>G. Somente as variantes c.3503\_3504del (n=10/31), c.1208T>C(n=4/31), c.242G>T (n=3/31) e c.2249dup (n=2/31 alelos) foram recorrentes.

Etapa 3 - Os pacientes eram originários de todas as regiões do Brasil (Sudeste n=14, Nordeste n=10, Sul n=4, Centro-oeste n=3, Norte n=1), sendo 6/32 consanguíneos. As variantes mais prevalentes foram a c.3503\_3504del (n= 19, Nordeste n=9, Sudeste n=4, Centro-oeste n=4, Sul n=2), associada à forma grave da doença, e a c.1208T>C (n= 6, Nordeste n=3, Sudeste n=2, Centro-oeste n=1), associada à forma mais branda. A variante c.3503\_3504del é a mais frequentemente encontrada nas regiões Centro-oeste, Nordeste e Sudeste do Brasil, enquanto a c.1196C>T é identificada em 42,8% dos alelos da região Sul.

**Conclusões:** a caracterização do impacto funcional de variantes do tipo troca de sentido permitem concluir que os resíduos p.Glu389, p.Asp408, p.His956 e p.Arg986 são importantes para a função da catalítica da GlcNAc-1-fosfotransferase, enquanto que o aminoácido p.Asp76 pode estar envolvido no transporte da enzima ao complexo de Golgi. A análise genética dos pacientes brasileiros com ML II e III confirma a alta heterogeneidade genética e a alta frequência de variantes patogênicas privadas do gene *GNPTAB*, além de reiterar a variante c.3503\_3504del como a predominantemente identificada nessa população. Sob a perspectiva de todos os pacientes diagnosticados com ML II/III no Brasil, é possível concluir que diferentes regiões apresentam frequências alélicas de variantes patogênicas específicas, o que pode ser explicado através da ocorrência de efeito fundador ou altas taxas de consanguinidade, ou uma combinação de ambas.



## Abstract

Lysosomal hydrolases are peptides synthesized in ribosomes attached to the membrane, and concomitantly incorporated to the lumen of the endoplasmic reticulum. Still in this organelle, these proteins are modified with standard oligosaccharides in asparagine residues contained in their primary structure. The generation of mannose-6-phosphate (M6P) residues in the oligosaccharides present in lysosomal hydrolases guarantees the direction of these to the lysosomal compartments. The first stage of M6P generation is performed by GlcNAc-1-phosphotransferase, which is resident in the *cis* portion of the Golgi complex, and performs the recognition of the hydrolases and the transfer of a residue of GlcNAc-1-phosphate from the UDP-GlcNAc donor to the mannose residue in position 6 of the oligosaccharide present in the hydrolase. GlcNAc-1-phosphatetransferase is a hexameric complex formed by two subunits  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  ( $\alpha^2\beta^2\gamma^2$ ), where the first two are encoded by the *GNPTAB* gene and the third by the *GNPTG* gene. Pathogenic variants identified in the *GNPTAB* gene cause rare lysosomal diseases Mucopolysaccharidosis (ML) II and III alpha/beta, and variants in *GNPTG* cause the ML III gamma. These diseases are severe and characterized by an overflow of lysosomal hydrolases into the extracellular environment and, consequently, their absence in lysosomal compartments, which causes an accumulation of non-degraded macromolecules.

**Objectives:** 1) To characterize pathophysiological mechanisms of *GNPTAB* pathogenic variants; 2) To characterize Brazilian patients with ML II and III alpha/beta in relation to *GNPTAB* pathogenic variants. **Methodology:** Section 1 - in vitro study, in which constructs containing the variants p.Asp76Gly, p.Ser385Leu, p.Glu389Lys, p.Asp408Asn, p.His956Tyr, p.Arg986Cys and p.Leu1168Glnfs\*5 of the *GNPTAB* gene were generated by site-directed mutagenesis, and transfected for 24 hours in HEK or HeLa cells under normal cell culture conditions. Cell extracts were evaluated by enzymatic deglycosylation, western blotting, immunofluorescence and confocal microscopy, and residual enzymatic activity. Section 2 - cross-sectional study with convenience sampling, in which a sample of genomic DNA or total RNA was obtained from 18 patients unrelated ML II (n=10) or III alpha/beta (n=8). The *GNPTAB* gene was analyzed through Sanger sequencing (n=17) and new generation sequencing (n=1). Missense variants not described in the literature were researched in 200 Brazilian control alleles. Section 3 - retrospective study that included 32 unrelated Brazilian patients (consanguinity, n=6/32) with clinical and genetic diagnosis of ML II/III alpha/beta. The regional frequency of the altered alleles was determined. **Results:**

Section 1 - the variants p.Ser385Leu, p.Glu389Lys, p.Asp408Asn, p.His956Tyr and p.Arg986Cys are expressed, transported and cleaved by S1P as the wildtype protein, however all mutants present residual activity lower than 5%. The p.Asp76Gly mutant is modified with glycosylation structures, remains retained in the endoplasmic reticulum and, consequently, has undetectable residual activity. Section 2 - The genotype was determined in 18 patients (ML II= 10, III alpha/beta= 8). A total of 16 different variants were found, nine of which have not yet been described in the literature: r.86\_116conNM\_024312.5:19\_49, c.227A>G, c.831delT, c.1154C>T, c.1763insA, c.1927delAATT, c.2034dup, c.2720\_2721del and c.3333T>G. Only variants c.3503\_3504del (n=10/31), c.1208T>C (n=4/31), c.242G>T (n=3/31) and c.2249dup (n=2/31 alleles) were recurrent. Section 3 - The patients were from all regions of Brazil (Southeast n=14, Northeast n=10, South n=4, Midwest n=3, North n=1), with 6/32 being consanguineous. The most prevalent variants were c.3503\_3504del (n=19, Northeast n=9, Southeast n=4, Midwest n=4, South n=2), associated with the severe form of the disease, and c.1208T>C (n=6, Northeast n=3, Southeast n=2, Midwest n=1), associated with the milder form. Variant c.3503\_3504del is the most frequently found in the Midwest, Northeast, and Southeast regions of Brazil, while c.1196C>T is identified in 42.8% of the alleles in the South. **Conclusions:** The characterization of the functional impact of missense variants allows the conclusion that the p.Glu389, p.Asp408, p.His956 and p.Arg986 residues are important for the catalytic function of GlcNAc-1-phosphotransferase, while the amino acid p.Asp76 may be involved in the transport of the enzyme to the Golgi complex. The genetic analysis of Brazilian patients with ML II and III alpha/beta confirms the high genetic heterogeneity and the high frequency of individual pathogenic variants of the *GNPTAB* gene, and reiterates the variant c.3503\_3504del as the predominant one identified in this population. From the perspective of all patients diagnosed with ML II/III in Brazil, it is possible to conclude that different regions present allelic frequencies of specific pathogenic variants, which can be explained by the occurrence of a founding effect or high inbreeding rates, or a combination of both.

## **Introdução**

### *Lisossomos*

Inicialmente descritos como “estruturas membranosas no formato de bolsa”, a história da descoberta dos lisossomos advém de pesquisas realizadas na década de 1950. Christian de Duve e seu grupo trabalhavam com a enzima glicose-6-fosfatase em hepatócitos, particularmente interessados em determinar a localização intracelular dessa proteína. Para tal, trabalhavam com uma série de centrifugações em meios de sacarose com o intuito de obter diferentes fracionamentos celulares em que pudessem identificar a enzima supracitada. A estratégia acabou se mostrando efetiva, uma vez que os autores identificaram que a enzima se encontrava em estruturas denominadas de microcosmos, contudo também foi importante para plantar a pergunta que anos depois levaria a descrição dos lisossomos (Duve et al. 1954).

Como forma de caracterização do particionamento de organelas intracelulares que pudessem conter a enzima glicose-6-fosfatase, os autores utilizavam a enzima fosfatase ácida como marcador. Contudo, a atividade residual dessa enzima se apresentava indetectável nas frações analisadas após a centrifugação, porém quando as frações eram reavaliadas após alguns dias a atividade residual aumentava e atingia os valores normais. A conclusão foi de que a fosfatase ácida estava inserida em um compartimento membranoso que a separava de seu substrato, e que algum tratamento físico ou químico, ou mesmo a baixa temperatura onde as amostras eram mantidas, era aplicado durante o armazenamento e isso ocasionava o rompimento da membrana e permitia que a enzima encontrasse seu substrato. A descoberta modificou os rumos de pesquisa do grupo, que passou a estudar e identificar outros exemplos de enzimas nesse contexto, que levaram a descoberta e descrição das enzimas  $\beta$ -glucuronidase, Catepsina D, ribonuclease e desoxirribonuclease. Como todas eram caracterizadas como hidrolases que apresentavam atividade em ambientes ácidos e digeriam diferentes substratos, o termo lisossomo (palavras gregas “Lysis” e “Soma”, que significam destruir e corpo) foi consequentemente indicado (Duve et al. 1954; de Duve 2005).

Desde então, muitas descobertas foram realizadas e o entendimento sobre o funcionamento dessa organela evoluiu. Lisossomos são organelas delimitadas por membranas que contêm uma série de proteínas que realizam a degradação de um diverso

grupo de macromoléculas. As proteínas que realizam essa degradação são chamadas de hidrolases lisossômicas, um grupo de 60 proteínas que podem ser classificadas como proteases, sulfatases, nucleases, lipases, fosfatases, glicosidases e que apresentam atividade ótima em ambiente de pH 5. Além de hidrolases, o lisossomo também apresenta em sua membrana uma grande variedade de proteínas transmembrana que possuem a função de controlar o fluxo de íons, criar um ambiente luminal ácido, posicionar a organela no citoplasma, realizar o transporte de moléculas através da membrana ou garantir a homeostase membranal e intraluminal. O material encontrado no lúmen de um lisossomo pode ser de origem endocítica, fagocítica ou autofágica, e após degradação esse material pode ser liberado no citoplasma para ser utilizado em outros processos celulares (Sabatini and Adesnik 2015; Trivedi et al. 2020).

Lisossomos são estruturas com diâmetro médio de 0.2–0.3  $\mu\text{m}$  e não são organelas uniformes, seu conteúdo intraluminal pode ser variado e determinar seu tamanho e morfologia. Uma única célula pode conter centenas de lisossomos, todos diferentes entre si, mas todos realizando a mesma função. Função essa que modificou drasticamente ao longo do tempo, passando de uma organela que apenas degrada macromoléculas para uma organela que controla e responde a diferentes estímulos fisiológicos e que tem sido atribuído papel essencial na homeostase celular (Sardiello 2016; Perera and Zoncu 2016; Lamming and Bar-Peled 2019; Trivedi et al. 2020).

A síntese dessas organelas é um processo ainda não estabelecido, e não há consenso entre as hipóteses existentes (Trivedi et al. 2020). Lisossomos fazem parte do que atualmente é chamado de sistema endolisossomal, este formado por endossomos precoces/tardios, corpos multivesiculares e lisossomos. Endossomos precoces estão normalmente situados na periferia celular e são os receptores usuais da via de internalização endocítica. O material incorporado é mantido em vesículas intraluminais e o acúmulo gradual destas é chamado de corpos multivesiculares, que são importantes componentes na maturação de endossomos precoces para endossomos tardios. Concomitante ao contínuo recebimento de materiais para degradação, endossomos precoces/corpos multivesiculares passam por mudanças fisiológicas e estruturais, como diminuição do pH intraluminal e aumento da quantidade de hidrolases lisossômicas, e reposicionamento da organela na região perinuclear. Finalmente, endossomos tardios são fundidos a lisossomos e a degradação do material intraluminal é realizada (Hu et al. 2015; Trivedi et al. 2020).

### *A via de manose-6-fosfato*

Parte vital para o correto funcionamento do sistema endolisossomal é a presença das hidrolases lisossômicas no lúmen da organela final na via de degradação de macromoléculas, que é o lisossomo. Hidrolases lisossômicas são sintetizadas por ribossomos presos à parede citoplasmática do Retículo endoplasmático (RE), e através de sinalização são incorporadas ao lúmen dessa organela, onde são modificadas com oligossacarídeos adicionados aos resíduos de asparagina (N-glicosilação), especificamente do tipo rico em manose (Braulke et al. 2015; Sabatini and Adesnik 2015).

O complexo de Golgi é uma organela apontada como o centro distribuidor de proteínas endereçadas a diversos compartimentos intracelulares e/ou para secreção. Essa organela pode ser subdividida em rede *cis*; cisternas *cis*, *medial* e *trans*; e rede *trans*. Uma vez que hidrolases lisossômicas são identificadas no RE por adaptadores específicos (di Ronza et al. 2018), o transporte por vesículas especializadas do tipo coatômero (COP) tipo II faz a entrega destas na rede *cis* do complexo de Golgi, onde é realizada a síntese da marcação que direcionará as hidrolases lisossômicas aos compartimentos lisossomais (Figura 1) (Braulke et al. 2015; Trivedi et al. 2020).

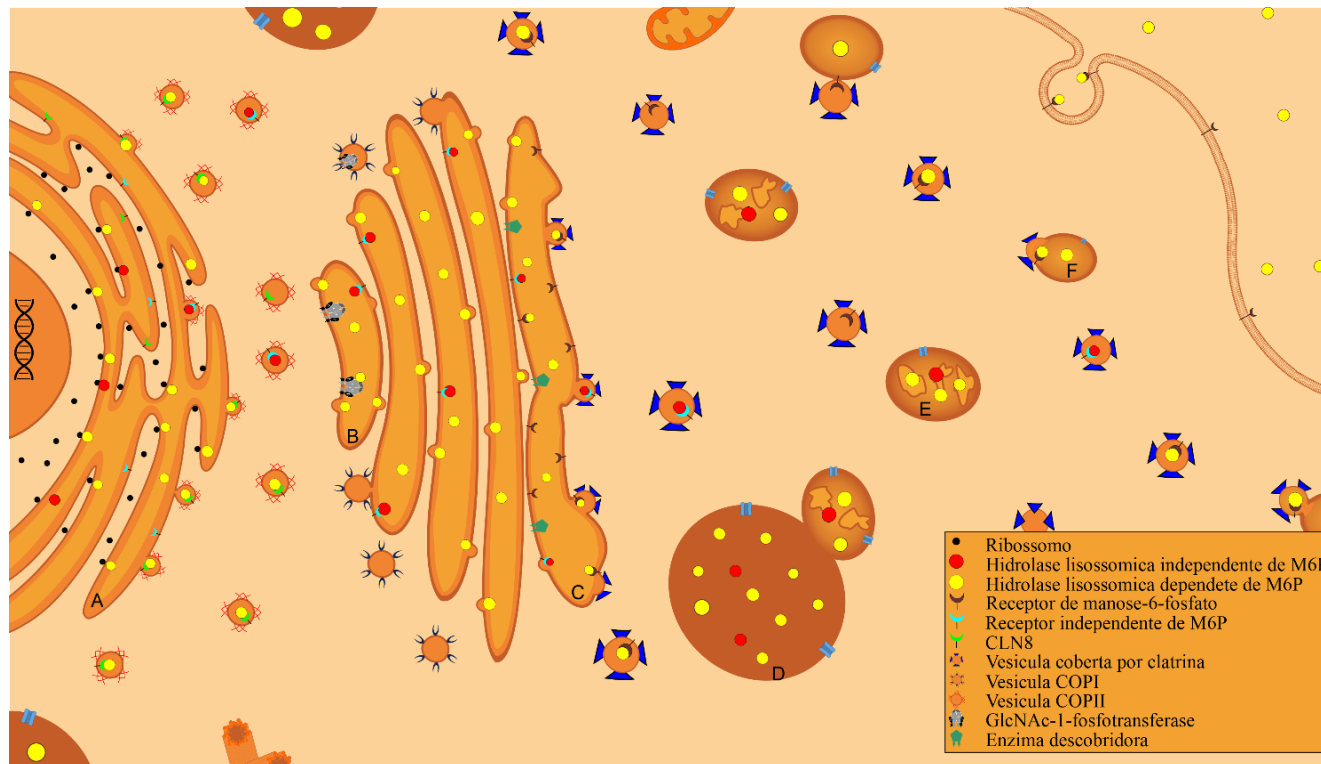


Figura 1 - **Sistema endolisossomal e a via de manose-6-fosfato.** A síntese de Hidrolases Lisossômicas é realizada por ribossomos que estão associados à face citoplasmática da membrana do Retículo Endoplasmático (RE) rugoso (A), a sequência de polipeptídios é então internalizada em vesículas COPII que emergem da membrana do RE liso. Essas vesículas são fusionadas à membrana da porção *cis* do complexo de Golgi (B), e é nessa região que a enzima GlcNAc-1-fosfotransferase adiciona o marcador de manose-6-fosfato (M6P) nas hidrolases lisossômicas que serão enviadas aos compartimentos lisossomais. O passo seguinte é o transporte destas através do Complexo de Golgi em direção à porção *trans*, onde a enzima descobridora realiza a remoção do N-acetilglucosamina (GlcNAc) e expõe os resíduos de M6P (C). Receptores de M6P (MPRs) reconhecem e se ligam às hidrolases lisossômicas, o complexo é incorporado em Vesículas cobertas por Clatrina que emergem da membrana e realizam a entrega aos compartimentos lisossomais (endossomos precoces ou tardios, E e F, respectivamente). Uma vez internalizadas, o ambiente intraluminal ácido ocasiona a liberação do ligante pelo receptor, que pode então voltar à porção *trans* do complexo de Golgi e realizar novos turnos de entrega de hidrolases lisossômicas. Endossomos tardios são fusionados aos lisossomos, que então realizam a degradação das macromoléculas (D). Adaptado de Sabatini & Adesnik (2015).

A marcação que ocasionará o transporte das hidrolases é chamado de manose-6-fosfato (M6P), que é sintetizado através da ação sequencial de duas enzimas diferentes. Na rede *cis* do complexo de Golgi, hidrolases são reconhecidas pela enzima N-acetilglucosamina (GlcNAc)-1-fosfotransferase que catalisa a transferência de um resíduo de GlcNAc-1-fosfato, do doador difosfato de uridina (UDP)-GlcNAc, para a manose na posição 6 do oligossacarídeo presente na hidrolase lisossômica. Em contínuo transporte através de vesículas, na rede *trans* do complexo de Golgi a ação da enzima N-acetilglucosamina-1-phosphodiester  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidase (enzima descobridora, do inglês *uncovering enzyme*) remove o resíduo de GlcNAc e expõe a marcação de fosfato no oligossacarídeo (Figura 2) (Braulke et al. 2015).

Assim que os resíduos de fosfato são expostos, receptores transmembrana de M6P (MPR), localizados na rede *trans* do complexo de Golgi, reconhecem e interagem formando um complexo MPR-hidrolase lisossômica, que é preferencialmente formado em ambiente com pH 6.5 – 6.7. Esse complexo é reconhecido por proteínas acessórias que realizam a inserção em vesículas cobertas por clatrina, que brotam da rede *trans* do complexo de Golgi e fazem o transporte das hidrolases lisossômicas aos compartimentos lisossomais (Figura 1C). Após fusão com os compartimentos lisossomais, o pH ácido intraluminal garante a dissociação entre hidrolase e MPR, que então pode retornar a rede *trans* para novas rodadas de transporte. É importante apontar que uma parte dos complexos MPR-hidrolase lisossômica pode ser enviado a membrana plasmática (Braulke et al. 2015; Bajaj et al. 2019).

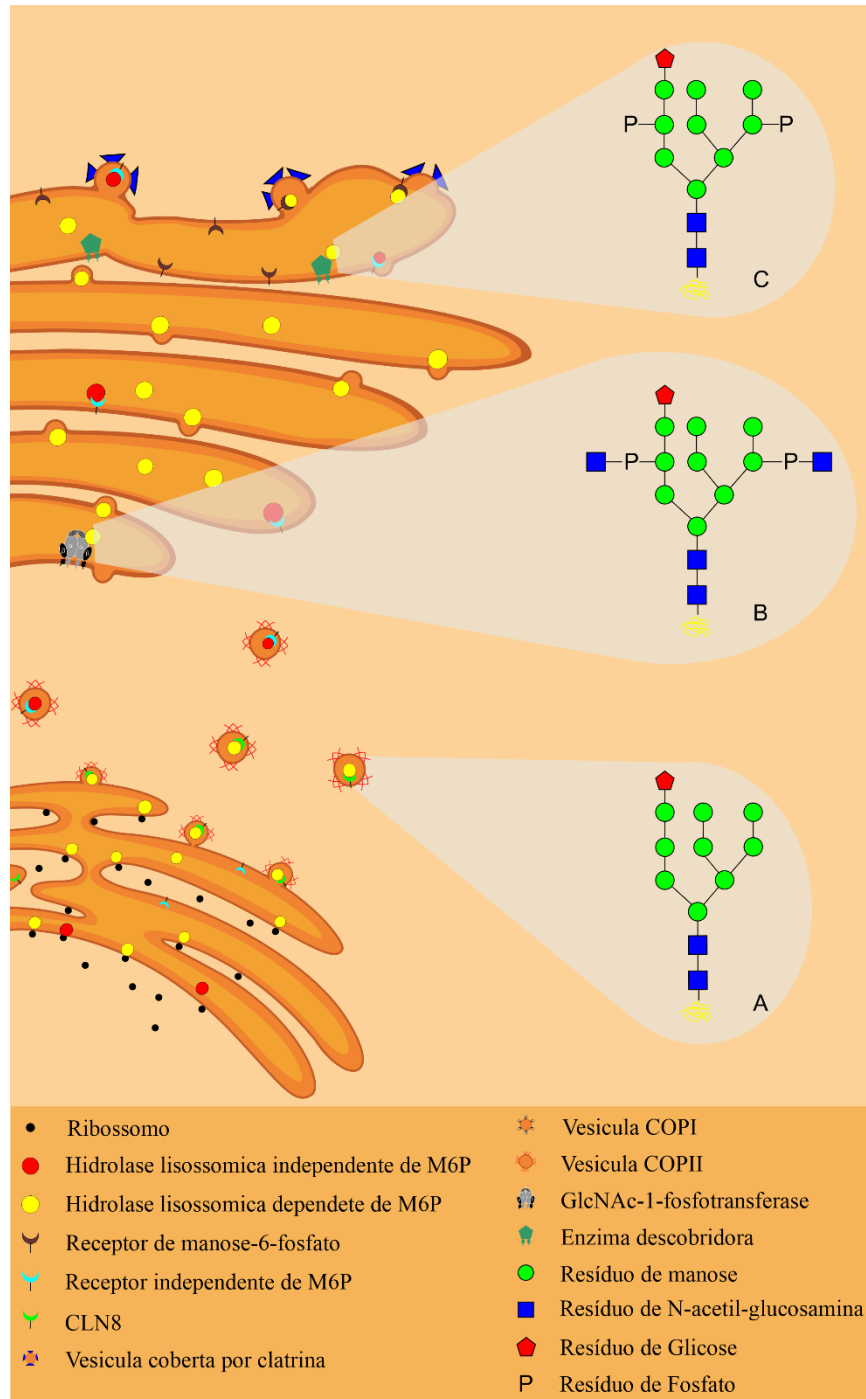


Figura 2 - **Síntese dos Marcadores de Manose-6-fosfato.** Proteínas modificadas com oligossacarídeos sintetizadas no Retículo endoplasmático (RE) são transportadas a porção *cis* do complexo de Golgi em vesículas membranares (A). A enzima GlcNAc-1-fosfotransferase adiciona resíduos de N-acetilglucosamina-fosfodiéster (GlcNAc-fosfodiéster) (B) nas glicoproteínas que serão direcionadas aos compartimentos lisossomais. Essas proteínas percorrem o complexo de Golgi em direção à porção *trans* da organela, onde a enzima descobridora realiza a remoção do GlcNAc e expõe os resíduos de fosfato (C), possibilitando assim que as hidrolases lisossômicas sejam reconhecidas pelos receptores de manose-6-fosfato e prossigam aos compartimentos lisossomais através das vesículas cobertas por Clatrina. Adaptado de Braulke et al. e Sabatini and Adesnik (2015).



Foram descritos dois tipos de MPR, que apresentam particularidades em relação à estrutura, disposição intracelular e peso molecular. O primeiro deles é o MPR300 (também conhecido como receptor cátion-independente MPR, CI-MPR, ou receptor tipo-insulina do fator de crescimento II), que apresenta dois domínios de ligação para M6P, de ocorrência preferencial em ambiente neutro, e é encontrado na rede *trans*, endossomos precoce e tardio e também na membrana plasmática. Já o MPR46 (também conhecido como receptor cátion-dependente, CD-MPR) é uma proteína transmembrana que depende de  $Mn^{2+}$  e um ambiente mais ácido para que a ligação ocorra e é observado na rede *trans* e endossomos precoce e tardio, porém não o é na membrana plasmática. Não é totalmente estabelecida a função específica de um e outro, mas em função da força de ligação entre receptor e resíduo de M6P e preferências de pH, acredita-se que o MPR300 realiza o envio de hidrolases aos endossomos tardios enquanto o MPR46 aos endossomos precoce, e que ambos não são identificados em lisossomos (Braulke et al. 2015; Hu et al. 2015; Bajaj et al. 2019).

O fato da enzima GlcNac-1-fosfotransferase apresentar a capacidade de fosforilação de poucas proteínas outras que não hidrolases lisossômicas (Lin Liu et al. 2017), indica uma grande especificidade desse complexo enzimático para mais de 50 hidrolases diferentes. Esforços em tentar identificar uma característica comum a todas as hidrolases falharam em apontar sequências sinais na cadeia de aminoácidos ou mesmo a presença de oligossacarídeos em posições específicas, o que pode indicar que a GlcNac-1-fosfotransferase deve reconhecer uma característica global e demonstra a flexibilidade desse complexo hexamérico (Braulke et al. 2015; van Meel et al. 2016).

A via de M6P não é a única a realizar o direcionamento de hidrolases lisossômicas aos compartimentos lisossomais (Coutinho et al. 2012; Braulke et al. 2015). Já foi evidenciado que a proteína lisossomal transmembrana LIMP-2 realiza a interação com a hidrolase  $\beta$ -glucocerebrosidase ainda no RE e, através da presença de um sinal dileucina na posição C-terminal, realiza o transporte até os compartimentos lisossomais. Interessante notar que a proteína LIMP-2 pode ser substrato da GlcNac-1-fosfotransferase e que interage com receptores MPR (Zhao et al. 2014; Blanz et al. 2015). Outro exemplo é a proteína Sortilina-1, que tem sido relacionado ao envio das hidrolases prosaposina (proteína ativadora de outras hidrolases) (Lefrancois et al. 2003; Hassan et al. 2004; Zeng et al. 2009), esfingomielase ácida (Ni and Morales 2006) e as catepsinas D e H (Canuel et al. 2008).

### *As Mucopolídeos II e III*

Descritas pela primeira vez na década de 1970 (Leroy and Demars 1967; Spranger and Wiedemann 1970), esse grupo de doenças pode ser dividido em Mucopolíose (ML) II (ML II - MIM #252500) e ML III alfa/beta (ML III alfa/beta; MIM #252600), causadas por variantes no gene *GNPTAB*, e a ML III gama (ML III gama; MIM #252605), causada por variantes patogênicas no gene *GNPTG*. Ao longo dos últimos 50 anos a nomenclatura das três doenças foi modificada, onde ML III alfa/beta já foi chamada de ML IIIA e a ML III gama de ML IIIC. Todas são classificadas como doenças autossômicas recessivas, e podem ser agrupadas como Erros Inatos do Metabolismo e Doenças Lisossômicas (Cathey et al. 2008; Braulke et al. 2015).

As ML II e III apresentam um espectro de manifestações clínicas

As ML II, III alfa/beta e III gama podem ser clinicamente distinguíveis através da idade de aparecimento dos sintomas e gravidade da progressão da doença (Leroy et al. 1993; Braulke et al. 2015). A avaliação de uma coorte de pacientes do Brasil demonstrou que pacientes com ML II apresentam uma média de idade ao aparecimento dos sintomas de 4 meses, que é significativamente precoce quando comparado com pacientes com diagnóstico de ML III alfa/beta (~7 anos) e III gama (~12 anos) (Alegra et al. 2019). Dados semelhantes são encontrados em outras populações de pacientes (Cathey et al. 2010; David-Vizcarra et al. 2010; Tabone et al. 2019).

ML II é uma doença grave, sistêmica, que pode apresentar sintomas ainda no período gestacional e/ou ser evidente ao nascimento com a maior parte dos pacientes apresentando medidas antropométricas abaixo do normal. Os pacientes apresentam retardo de crescimento no primeiro ano de vida e que evolui para ausência de crescimento no segundo; normalmente a doença evolui com atraso na obtenção de estágios do neurodesenvolvimento motor. Entre os sintomas mais comumente observados estão a face infiltrada, presença de hiperplasia gengival, disostose múltipla, restrição articular generalizada, craniostenose, baixa estatura e mãos em garra. Capacidade de caminhada sem suporte e desenvolvimento da fala, limitada a algumas palavras, é de rara ocorrência. A doença evolui rapidamente e normalmente o

desfecho óbito está relacionado a infecções respiratórias e ocorre na primeira década de vida (Cathey et al. 2010; Alegria et al. 2019; Ceroni et al. 2019; Tabone et al. 2019).

Em conjunto, as ML III são doenças mais brandas. Dados de diversas coortes de pacientes descrevem ausência de sintomas no período gestacional ou nascimento com valores antropométricos dentro do esperado. Os primeiros sintomas podem surgir ainda na infância, sendo a contratura das mãos um dos primeiros sintomas observados. A evolução pode acarretar restrição articular de membros superiores e inferiores, dores e problemas ósseos, para o último tem sido relatado a necessidade de intervenção cirúrgica. Outras manifestações clínicas que podem ser observadas incluem problemas oftalmológicos e infecções respiratórias. Esses pacientes podem apresentar algum atraso na conquista dos marcos do neurodesenvolvimento, contudo participam em regimes escolares tradicionais e podem cursar o nível superior. A ML III gama é considerada clinicamente mais leve que a ML III alfa/beta (Cathey et al. 2010; David-Vizcarra et al. 2010; Alegria et al. 2019; Ceroni et al. 2019; Nampoothiri et al. 2019).

#### Características fisiopatológicas

Inicialmente denominada de *I-cell disease* (*Inclusion cell disease*), que em tradução literal significaria “doença de células com inclusões”, as ML II/III receberam essa denominação em função da observação de uma infinidade de pequenos pontos espalhados no citoplasma celular de fibroblastos de pacientes (Leroy and Demars 1967; Spranger and Wiedemann 1970), e que posteriormente também foram identificados em modelos animais (H. Maxrier et al. 2003; Kollmann et al. 2012). Pacientes com variantes patogênicas que afetem a atividade da enzima GlcNAc-1-fosfotransferase vão apresentar uma inabilidade em transportar hidrolases lisossômicas aos lisossomos, que em última instância serão extravasadas ao ambiente extracelular. Por consequência, lisossomos acabam por acumular todo o material que deveria ser degradado pelas hidrolases ausentes, e são essas estruturas que foram observadas em 1970 e que originaram o nome dessas doenças (Bräulke et al. 2015).

Nos últimos cinquenta anos, muitos estudos de caracterização com linhagens primárias de pacientes ou modelos animais identificaram uma grande variedade de materiais acumulados nos lisossomos de pacientes com ML II/III. Em fibroblastos foi observado um

acúmulo de gangliosídeos GM2, glicoconjugados caracterizados, através do uso de lectinas, com resíduos do tipo galactose, N-acetilglucosamina e manose (Kawashima et al. 2007), além disso foi demonstrado o acúmulo do aminoácido cisteína (Tietze and Butler 1979; Greene et al. 1985), bem como de fosfolipídios e colesterol total (Otomo et al. 2011). Uma vez que esse tipo de análise é restrita aos tipos celulares de fácil acesso, a caracterização de outros tecidos foi realizada predominantemente em modelos animais. No sistema nervoso central foi evidenciado o acúmulo de materiais muito semelhantes em lisossomos de neurônios corticais, no hipocampo e cerebelo. Além disso, foi demonstrado que modelos animais de ML II apresentam uma significativa redução do número de neurônios e células de Purkinje que, em conjunto com a atrofia cerebral, são achados indicativos de neurodegeneração progressiva (Kollmann et al. 2012).

Com compartimentos lisossomais saturados de materiais não degradados, não é surpreendente a identificação de que fibroblastos de pacientes com ML II apresentam três vezes mais lisossomos que células selvagens, e que esses apresentam um pH mais básico que o normal ( $5,29 \pm 0,08$  versus  $4,79 \pm 0,10$  para ML II e selvagens, respectivamente) (Otomo et al. 2011). Modelos animais confirmam esses achados e ainda demonstram que essas estruturas lisossômicas são maiores quando comparados às selvagens ( $500\text{nm}-2\mu\text{m}$  versus  $300-600\text{nm}$ , respectivamente) (Boonen et al. 2011). Como lisossomos são importantes para o correto funcionamento da autofagia, estudos de imunofluorescência demonstraram a presença significativamente elevada das proteínas LC3-II e cadaverina, que estão relacionadas às estruturas de autofagossomos e autolisossomos, respectivamente. Importante ressaltar que essas estruturas colocalizam com os marcadores lisossomais LysoTracker e Lamp-2, demonstrando que há fusão destas com o lisossomo. Contudo, o acúmulo de proteínas p62 indicam a inabilidade das estruturas lisossomais em realizar a degradação desse material, o que é esperado em função da ausência de hidrolases lisossômicas nestas organelas. Dados de modelos animais confirmaram o mesmo padrão em neurônios (Boonen et al. 2011; Kollmann et al. 2012). Interessante notar que a inibição da autofagia, através da droga 3-MA, foi capaz de restaurar alguns aspectos da disfunção mitocondrial observado em fibroblastos de pacientes (Otomo et al. 2009a).

Outro aspecto observado em uma coorte de pacientes com ML II foi a pobre resposta na formação de antígenos em resposta a vacinação. Estudos subsequentes identificaram baixos níveis das imunoglobulinas IgG, IgA e IgM, além de uma baixa percentagem de

linfócitos B, em sua maioria imaturos. Ao contrário desses, linfócitos T foram encontrados em quantidade elevadas em relação a controles pareados por idade (Otomo et al. 2015). Dados de três pacientes com ML III gama aparentemente demonstraram que a atividade residual maior do que em ML II da GlcNAc-1-fosfotransferase, característica nesses pacientes, parece garantir uma adequada função imunológica nessa doença (Fernanda Sperb-Ludwig et al. 2019).

Catepsinas B, H e S tem sido indicadas como importantes proteases para degradação e posterior apresentação de antígenos, realizados por linfócitos B, através do complexo de histocompatibilidade (MHC) II (Sadegh-Nasser and Kim 2015). A utilização de modelo animal de MLII demonstrou que linfócitos B apresentaram a mesma capacidade de internalização de antígenos que células selvagens, contudo, o processamento proteolítico é significativamente reduzido no modelo animal, o que pode ser explicado pelos baixos níveis intracelulares encontrados de diferentes Catepsinas. Em última instância, foi observado uma diminuição de ~50% na apresentação de moléculas do complexo MCH II na membrana plasmática de linfócitos B, que é suportado pela presença de acúmulo de material nesse tipo celular (Yokoi et al. 2018), e conseqüentemente uma diminuição nos níveis de apresentação de antígeno para linfócitos T. Possivelmente, essas características fisiopatológicas previnem o sistema imunológico de responder de forma eficaz contra patógenos, fato que é evidenciado pela baixa resposta a vacinas por parte dos pacientes com ML II (Otomo et al. 2015).

Como visto anteriormente, a presença de sintomas relacionados ao sistema ósseo é comum em todas as três ML II/III. Na literatura, dados sobre a fisiopatologia desse sintoma se resumem a uma amostra de biópsia da crista ilíaca de uma paciente ML II de três anos de idade. As análises indicaram a presença de marcadores de hiperparatireoidismo, que é um achado clínico mencionado em outros pacientes (Unger et al. 2005; David-Vizcarra et al. 2010; Alfadhel et al. 2013; Alegria et al. 2013; Lai and Lachman 2016), que é caracterizado pelo aumento da produção do hormônio paratireóide (PTH). A quantificação de PTH no soro da paciente foi comparável a controles pareados por idade, porém a quantificação de deoxipiridinolina, um marcador de reabsorção óssea, estava aumentada em amostra de urina (Kollmann et al. 2013).

Para explorar em mais detalhes esse processo, estudos com modelo animal de ML II confirmaram a presença de elevada reabsorção óssea, que é até duas vezes maior que animais

normais. Adicionalmente, foi evidenciada a atividade prejudicada de osteoblastos e osteoclastos, muito em função da presença de acúmulo de material no interior das células e diferentes padrões de secreção e ativação de uma série de hidrolases lisossômicas. Essas características são apontadas como responsáveis pela desregulada osteoclastogênese observada nessa doença (Meel et al. 2011; Kollmann et al. 2013).

Outro ponto que pode contribuir para a fisiopatologia óssea observada é a interleucina-6 (IL-6), que tem sido apontada como indutora de osteoclastogênese. Caracterização *in vitro* de um modelo ML II demonstrou um aumento de cinco vezes na expressão gênica de células e na imunoquantificação do meio de cultura, indicando uma maior produção e secreção de IL6 em osteoblastos, e que esses aumentos estão relacionados ao acúmulo de colesterol em estruturas lisossômicas. Recentemente, uma abordagem terapêutica de terapia gênica para modelo animal de ML II demonstrou que após restituição da expressão de GlcNAc-1-fosfotransferase, houve uma subsequente diminuição na produção e secreção de IL-6 em cartilagem articular e melhora de biomarcadores do tecido ósseo (melhor descrito no item Tratamentos: uma série de abordagens *in vitro*) (Kollmann et al. 2013; Ko et al. 2016).

Por último, existem evidências que a via de TGF- $\beta$  também pode influenciar negativamente a fisiopatologia dos sintomas ósseos observados em ML II/III. Estudos com um modelo zebrafish de ML II (Flanagan-Steet et al. 2009) demonstraram variações na expressão das proteínas Sox9 e Smad2, este último é uma proteína pertencente a via de sinalização de TGF- $\beta$ , nos primeiros estágios de desenvolvimento embriológico. As proteínas Sox9 e Smad2 tem sido conectadas a regulação do colágeno tipo II em tecido cartilaginoso, que em conjunto com altos níveis de secreção de diversas catepsinas, em decorrência da ausência de resíduos de M6P em células de ML II, podem contribuir para o desbalanço do crescimento e manutenção da matriz extracelular. Recentemente, foi demonstrado que fibroblastos de pacientes com ML II apresentaram aumento da expressão do receptor Sortilina-1, que é acompanhado por uma diminuição na secreção de TGF-  $\beta$  e aumento da presença deste em lisossomos (Barnes et al. 2020).

## Características moleculares

As subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  são constituídas de diferentes domínios

A GlcNAc-fosfotransferase é um complexo hexamérico de 540 kDa composto de três diferentes subunidades, duas  $\alpha$ , duas  $\beta$  e duas  $\gamma$  (Reitman et al. 1984; Bao et al. 1996). As subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  são transcritas juntas em um precursor  $\alpha\beta$  codificado pelo gene *GNPTAB*, enquanto a subunidade  $\gamma$  é codificada pelo gene *GNPTG* como uma proteína solúvel (Raas-Rothschild et al. 2000; Tiede et al. 2005). Estudos de modelos animais nocaute para o gene *GNPTAB* demonstram a completa ausência de formação de sinais de M6P, indicando assim que a função catalisadora da enzima se encontra nas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . Já estudos com modelo animal nocaute para o gene *GNPTG* indicam que a subunidade  $\gamma$  é importante para um grupo das hidrolases lisossômicas, pois esse modelo animal ainda apresenta a capacidade de realizar a fosforilação do restante das hidrolases (Qian et al. 2010; Di Lorenzo et al. 2018).

O precursor  $\alpha\beta$  possui sequências de sinalização para endereçamento para o RE, que estão presentes no domínio transmembrana na região N-terminal e que garantem o reconhecimento deste pela partícula de reconhecimento de sinal (SRP). Esse reconhecimento e interação causam a parada momentânea da tradução do ribossomo livre e realizam a translocação e acoplamento do complexo SRP-ribossomo livre ao receptor de SRP presente na membrana do RE. O complexo é então vinculado a Proteína Translocadora, que está presente na membrana do RE. Por consequência, o complexo receptor SRP-SRP é liberado e a tradução da proteína reinicia, onde a cadeia nascente de polipeptídios é diretamente adicionado ao lúmen do RE. Ainda, os domínios transmembrana N- e C-terminais garantem que a proteína será inserida na membrana do RE (Egea et al. 2005; Alberts et al. 2017; Lee et al. 2020).

Sendo assim, o precursor  $\alpha/\beta$  é uma proteína de membrana tipo III com 190 kDa que apresenta 1256 aminoácidos. Ainda no RE, o precursor recebe oligossacarídeos normais pré-formados (composto de N-acetilglucosamina, manose e glicose) em alguns dos 20 potenciais sítios de N-glicosilação (17 na porção correspondente da subunidade  $\alpha$  e 3 da subunidade  $\beta$ ). Após formação do complexo com a subunidade  $\gamma$ , sinais presentes nas porções N- e C-terminais da cauda ( $^5\text{Leu-Leu}^6$  e um motivo  $^{1253}\text{Arg-Ile-Arg}^{1255}$ , respectivamente) garantem o transporte por vesículas revestidas por COP II, evento dependente da proteína Sar1, até o

Complexo de Golgi. Através da clivagem proteolítica pela site-1-protease (S1P) (Figura 3), crucial para garantir a função catalítica, entre as posições Lys928 e Asp929, as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  ativas são formadas como proteínas com 145 e 45 kDa de massa, respectivamente (Encarnação et al. 2011; Franke et al. 2013; Coutinho 2014; Braulke et al. 2015; Velho et al. 2017).

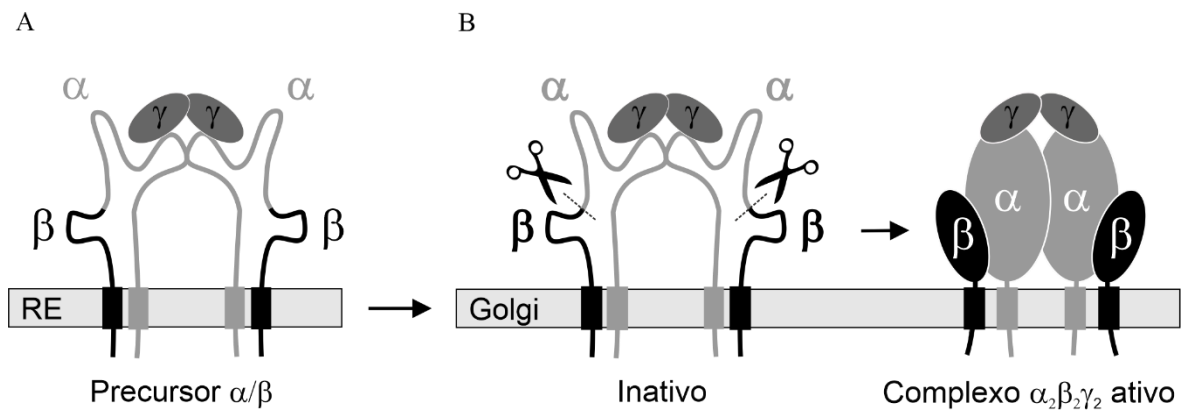


Figura 3 – **Estrutura das subunidades da GlcNAc-1-fosfotransferase.** **A** Ainda no retículo endoplasmático (RE), o complexo entre precursor  $\alpha\beta$  e a subunidade  $\gamma$  é formado e então transportado ao complexo de Golgi (Golgi). **B** No complexo de Golgi, a clivagem pela enzima S1P garante a formação das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  maduras e um complexo da GlcNAc-1-fosfotransferase ativo. Adaptado de Velho et al (2019).

Após clivagem pela enzima S1P, a subunidade  $\alpha$  humana madura é uma proteína de membrana tipo II que compreende 928 aminoácidos, subdivididos em uma extremidade N-terminal de 19 aminoácidos, um domínio transmembrana de 22 aminoácidos e um subsequente domínio luminal compreendendo 886 resíduos. Já a subunidade  $\beta$  madura é uma proteína de membrana tipo I que possui o domínio transmembrana, citoplasmático e luminal contendo 23, 21 e 284 aminoácidos, respectivamente (Tiede et al. 2005; Kudo et al. 2005).

Por sua vez, a subunidade  $\gamma$  é uma proteína solúvel de 36 kDa que apresenta 305 aminoácidos e é altamente conservada entre várias espécies (Figura 4) (Raas-Rothschild et al. 2000; Tiede et al. 2005). Por se tratar de uma proteína solúvel, o processo de tradução ocorre de maneira semelhante ao precursor  $\alpha\beta$ , contudo o produto do gene *GNPTG* não é inserido a membrana e sim liberado no lúmen do RE. Neste ambiente, a subunidade  $\gamma$  recebe duas cadeias de N-glicosilação do tipo rico em manose, seguido da interação com a subunidade  $\alpha$  do precursor  $\alpha\beta$ , para que então o complexo seja transportado ao complexo de Golgi (Encarnação et al. 2011).



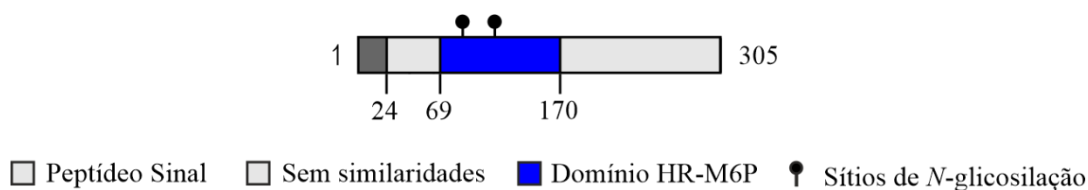


Figura 4 - **Representação da estrutura de domínios presente na subunidade  $\gamma$ .** O produto do gene *GNPTG* é traduzido como uma proteína solúvel com 305 aminoácidos (aa) divididos em um peptídeo sinal (cinza escuro, aa 1-24) e um domínio de homologia ao receptor de M6P (HR-M6P, azul, aa 69-170). Adaptado de Velho et al (2016).

A sequência de 305 aminoácidos da proteína solúvel de *GNPTG* apresenta uma região de homologia ao receptor de M6P (HR-M6P) (Figura 4) (Munro 2001; Castonguay et al. 2011). A similaridade da sequência de aa desse domínio pode indicar que essa região seria responsável por realizar a interação com os oligossacarídeos presentes nas hidrolases lisossômicas. As proteínas mutantes p.Gly106Ser, p.Gly126Ser e p.Cys142Tyr (Tabela 1), identificadas em pacientes e que estão presentes nesse domínio, quando analisadas funcionalmente demonstram que há interação com o precursor  $\alpha\beta$  e transporte ao complexo de Golgi, contudo a atividade residual foi capaz de restaurar apenas ~20% da fosforilação de quatro hidrolases lisossômicas diferentes (van Meel and Kornfeld 2016). Ainda, os dois sítios de N-glicosilação estão presentes nesse domínio e sua ausência, avaliada pela inserção de mutantes p.Asn88Gln e p.Asn115Gln, está relacionada à proteínas instáveis e com diminuição significativa do transporte ao complexo de Golgi, possivelmente relacionado a problemas de interação com a subunidade  $\alpha$  (Encarnação et al. 2011).

Tabela 1 – **Estudos funcionais de variantes patogênicas do gene *GNPTG***

Domínio	Alteração Patogênica		Transporte <sup>1</sup>	Atividade enzimática <sup>2</sup>	Referência
	cDNA	Proteína			
HR-M6P	c.316G>A	p.Gly106Ser	+/-	>20%	van Meel and Kornfeld 2016
	c.376G>A	p.Gly126Ser	NA	>20%	van Meel and Kornfeld 2016)
			+/-	NA	Barea et al. 2015
	c.425G>A	p.Cys142Tyr	+/-	>20%	van Meel and Kornfeld 2016
	c.857C>T	p.Thr286Met	+	100%	van Meel and Kornfeld 2016
	Artificial <sup>3</sup>	p.Asn88Gln	-	NA	Encarnação et al. 2011
	Artificial <sup>3</sup>	p.Asn115Gln	-	NA	Encarnação et al. 2011

NA – Não avaliado. <sup>1</sup> Transporte avaliado através da co-localização da proteína de *GNPTG* no complexo de Golgi pela técnica de imunofluorescência. <sup>2</sup> Avaliado através da atividade residual das hidrolases lisossômicas  $\beta$ -hexosaminidase,  $\alpha$ -galactosidase A,  $\beta$ -manosidase e  $\alpha$ -manosidase em células *GNPTG*<sup>-/-</sup> HeLa. <sup>3</sup> Variantes patogênicas que não foram identificadas em pacientes, mas sim geradas artificialmente em laboratório.

Através de análises de similaridade de sequência de aminoácidos do precursor  $\alpha\beta$ , foram identificados diferentes domínios (Figura 5) que tem sido extensivamente estudados utilizando uma combinação de diagnóstico genético dos pacientes e estudos funcionais das variantes patogênicas identificadas (Tabela 2).

Como mencionado anteriormente, a GlcNAc-1-fosfotransferase é uma enzima residente da porção *cis* do complexo de Golgi. As sinalizações que garantem o transporte do complexo enzimático para o complexo de Golgi são conhecidos (Franke et al. 2013), porém tão importante quanto o transporte ao destino final é garantir que a enzima permanecerá onde deve realizar sua função. As primeiras evidências que surgiram nesse sentido, são oriundas de estudos com as proteínas mutantes identificadas na porção N-terminal, p.Lys4Gln e p.Ser15Tyr. Estes mutantes apresentaram diminuições nos níveis de subunidade  $\beta$  e a atividade residual de 32% e 41% para p.Lys4Gln e p.Ser15Tyr, respectivamente (Tabela 2). Contudo, contrariando a presença no complexo de Golgi, que é indicado pela formação de subunidade  $\beta$ , a localização intracelular, avaliada através da imunofluorescência, não coincide com o marcador das organelas complexo de Golgi e RE, e sim com pequenos pontos espalhados no citoplasma. A presença de estruturas de N-glicosilação do tipo híbrida e complexa na proteína mutante, modificações estas realizadas por enzimas residentes das cisternas *medial* e *trans* do complexo de Golgi, indicam que a localização da proteína mutante possivelmente seriam estruturais lisossomais. Por fim, a utilização de marcadores de imunofluorescência demonstraram que as proteínas mutantes colocalizavam com endossomos precoces e eram rapidamente degradados. Uma vez que as modificações pós-traducionais das proteínas mutantes estavam presentes e que a atividade enzimática residual era relativamente alta (30% não é esperado causar a doença), foi concluído que as modificações nos aminoácidos p.Lys4 e p.Ser15 tornam a GlcNAc-1-fosfotransferase mutante incompatível com a permanência na membrana do complexo de Golgi e causam o direcionamento desta para degradação nos compartimentos lisossomais (van Meel et al. 2014). O mesmo efeito foi reportado posteriormente para os mutantes p.Phe24Val, p.Gly26Asp, p.Ala34Pro e p.Glu36Pro, identificados na porção transmembrana da subunidade  $\alpha$  (Lee et al. 2020).

Outras duas proteínas mutantes, p.Val27Asp e p.Val28Asp, apresentaram um padrão particularmente diferente do então evidenciado. Também encontradas no domínio transmembrana da subunidade  $\alpha$ , estes mutantes apresentaram considerável decréscimo na

expressão proteica, com subsequente atividade residual nula e ausência da subunidade  $\beta$ . Além disso, a proteína do precursor  $\alpha/\beta$  mutante apresentou uma migração mais rápida que a proteína selvagem, indicando um peso molecular inferior. Utilizando a glicosidase endoH, enzima que realiza a clivagem de cadeias de oligossacarídeos do tipo rico em manose, foi demonstrado que, diferente da proteína selvagem, os mutantes não apresentaram nenhuma mudança no peso molecular, indicando a ausência desse tipo de modificação. Assim, foi concluído que as proteínas mutantes p.Val27Asp e p.Val28Asp não eram inseridas no lúmen do RE, onde a inserção desse tipo de oligossacarídeos acontece, o que também explica a diminuição da expressão proteica, uma vez que esses mutantes seriam rapidamente degradados no citoplasma (Lee et al. 2020).

A identificação da presença de estruturas do tipo híbrida e complexa nos oligossacarídeos da GlcNac-1-fosfotransferase requer que esta seja processada pela maquinaria da N-glicosilação presente nas porções *medial* e *trans* do complexo de Golgi (van Meel et al. 2014). Como o complexo enzimático é residente da porção *cis* desta organela, há a necessidade de que ocorra o transporte retrógrado da enzima da porção *trans* à *cis*. Concomitante, há o fato de que a deleção da porção citoplasmática da região C-terminal não afeta o transporte, clivagem por S1P e atividade residual (van Meel et al. 2014), e de que os mutantes discutidos previamente estão presentes na região citoplasmática N-terminal. Neste contexto, foi identificado que a porção citoplasmática N-terminal da proteína tem a capacidade de interagir com as subunidades  $\delta$  e  $\zeta$  da proteína COP I, que são vesículas de transporte interno do complexo de Golgi, através da sequência sinal provável  $\phi$ -(K/R)-X-L-X-(K/R). Importante ressaltar que as proteínas mutantes p.Lys4Gln e p.Arg8Gly afetariam aminoácidos dessa sequência sinal indicada e que estes mutantes de fato apresentam prejuízo na interação com as subunidades supracitadas. Ainda que essa sequência sinal tenha sido identificada em outras glicosiltransferases residentes do complexo de Golgi, não é possível definir com exatidão que apenas estes aminoácidos estão envolvidos na sinalização, uma vez que o mutante p.Ser15Tyr apresenta incapacidade de permanecer no complexo de Golgi e está localizado fora dessa sequência (Liu et al. 2018; Welch and Munro 2019).

Como previamente mencionado, a interação entre a subunidade  $\gamma$  e o precursor  $\alpha/\beta$  acontece ainda no RE, pois esse possui a sinalização para garantir o transporte ao complexo de Golgi. Estudos de clonagem e mutagênese demonstraram que essa interação ocorre

especificamente em uma região da subunidade  $\alpha$ , mais especificamente entre os resíduos 535 e 698, que então foi denominada de domínio  $\gamma$ -binding (Velho et al. 2016a).

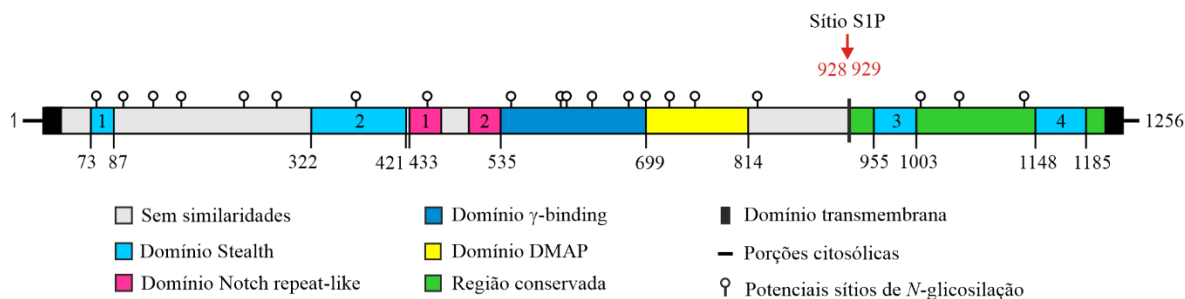


Figura 5 - **Domínios identificados no precursor  $\alpha/\beta$  do gene *GNPTAB*.** Por análise de similaridade foram identificados os seguintes domínios: Stealth (azul claro) divididos em quatro regiões (73-86, CR1; 322-421, CR2; 955-1003, CR3; 1138-1194, CR4), Notch repeat-like 1 e 2 (rosa),  $\gamma$ -binding (azul escuro), DMAP (amarelo), regiões altamente conservadas (verde) e regiões sem similaridade identificada (cinza). O precursor conta com 20 possíveis sítios de N-glicosilação (círculos brancos) e dois domínios transmembrana (preto). O sítio de clivagem da enzima S1P é demonstrado entre os aminoácidos 928-929. Adaptado de Velho et al (2016).

O complexo enzimático da GlcNAc-1-fosfotransferase realiza a transferência de um grupamento GlcNAc-1-fosfato para os oligossacarídeos presentes nas hidrolases lisossômicas. Para tal, a enzima necessita reconhecer e interagir com esses substratos, função essa ainda não bem estabelecida. Contudo, estudos de análises funcionais tem gerado informações que permitem criar hipóteses sobre esse tema. A subunidade  $\alpha$  possui dois domínios denominados de Notch-repeat-like (NOTCH), 1 e 2, entre os resíduos 433-474 e 500-535. Variantes patogênicas identificadas no primeiro domínio não afetam o transporte ou a formação da subunidade  $\beta$  (p.Cys442Tyr, p.Cys461Gly e p.Cys468Ser), enquanto as identificadas no segundo domínio apresentam redução significativa, porém ainda há presença dos mutantes no complexo de Golgi (p.Cys505Tyr e p.Cys523Arg). A distinção das proteínas mutantes entre os dois domínios NOTCH também se expressa na atividade residual, utilizando como acceptor o  $\alpha$ -metil D-manosídeo ( $\alpha$ -MM), os mutantes que são normalmente transportados ao complexo de Golgi apresentam atividade igual ao WT, enquanto os mutantes que exibem prejuízo no transporte apresentam em torno de 40% da atividade normal. Contudo, a utilização da enzima lisossômica  $\alpha$ -iduronidase como acceptor demonstrou que todos os mutantes apresentam uma diminuição expressiva da atividade residual (em média, 15%) (Qian et al. 2014; Velho et al. 2015b; van Meel et al. 2016).

Estudos com proteínas onde os domínios NOTCH foram artificialmente deletados demonstraram que a proteína  $\Delta$ NOTCH2 apresentou uma diminuição expressiva da fosforilação das hidrolases lisossômicas  $\beta$ -hexosaminidase,  $\alpha$ -galactosidase A,  $\beta$ -galactosidase e  $\alpha$ - e  $\beta$ -manosidase, o que não é observado em mutantes  $\Delta$ NOTCH1. Ainda, a deleção de qualquer um dos domínios  $\Delta$ NOTCH parece afetar igualmente as enzimas palmitoil tioesterase 1 e o transportador de colesterol NPC2. Lembrando que os domínios apresentam apenas 40% de similaridade e que são altamente conservados em diferentes espécies, esses estudos demonstram que ambos os domínios NOTCH são importantes para o reconhecimento e interação da GlcNAc-1-fosfotransferase com as hidrolases lisossômicas, e que individualmente cada domínio parece ter importância diferente para subpopulações específicas desses substratos (van Meel et al. 2016).

Outro domínio identificado na subunidade  $\alpha$  é a região identificada entre os aminoácidos 694 e 819. Em função da alta homologia desta região com uma porção do gene codificador da DNA metiltransferase (*DNMT1*), sendo essa região denominada de proteína associada a DNA metiltransferase (DMAP), é proposto que esse seja o domínio responsável pela interação proteína-proteína. A função desse domínio no contexto da GlcNAc-1-fosfotransferase começou a ser desvendada através da utilização de uma proteína mutante contendo a enzima Glutathione S-transferase (GST) fusionada com a sequência de aminoácidos do domínio DMAP (GST-DMAP). É sabido que a enzima GST não possui a capacidade de interagir com hidrolases lisossômicas, contudo a proteína GST-DMAP obteve sucesso em imobilizar as enzimas  $\alpha$ -iduronidase e Catepsina D, demonstrando assim que o domínio DMAP possui informações suficientes para garantir a interação com hidrolases lisossômicas (Qian et al. 2013; van Meel et al. 2016).

Até o presente momento duas variantes patogênicas foram identificadas na sequência de aminoácidos que compreende o domínio DMAP, ambas em pacientes diagnosticados com ML II. As variantes p.Lys732Asn e p.Leu785Trp apresentam um comportamento semelhante quando avaliadas funcionalmente, em ambos os casos a proteína mutante é transportada ao complexo de Golgi e há a presença de subunidade  $\beta$ , indicando clivagem por SIP. Quando a atividade residual enzimática foi avaliada utilizando o açúcar  $\alpha$ -MM, os resultados demonstraram que ambos os mutantes apresentam a mesma capacidade de fosforilação em comparação a proteína selvagem. Contudo, quando o acceptor utilizado foram as enzimas lisossômicas  $\alpha$ -iduronidase e Catepsina D, a atividade residual dos mutantes foi

de 15%. Proteínas mutantes  $\Delta$ DMAP também apresentam uma diminuição da quantificação de diferentes hidrolases precipitadas utilizando beads-CI-MPR e na quantificação de fosforilação, isto é, o número de resíduos de M6P inseridos nas mesmas proteínas. Importante ressaltar que o nível de diminuição é hidrolase lisossômica dependente, onde é possível determinar ainda que algumas enzimas não são afetadas (Qian et al. 2013; Qian et al. 2014).

Como pontuado nos últimos parágrafos, há informação suficiente para sustentar a hipótese de que as estruturas necessárias para realizar o reconhecimento e ancoragem das hidrolases lisossômicas se encontram nos domínios NOTCH 1 e 2,  $\gamma$ -binding e DMAP, todos presentes na mesma região da GlcNac-1-fosfotransferase. Os resultados dos estudos funcionais com proteínas mutantes, sejam de variantes patogênicas identificadas em pacientes ou artificiais, demonstram a manutenção das informações que garantem o transporte ao complexo de Golgi, a clivagem pela enzima S1P e a capacidade catalítica da enzima (com pequenas reduções quando utilizado o  $\alpha$ -MM com acceptor). No entanto, a incapacidade das mesmas proteínas mutantes em sustentar a atividade residual quando utilizadas diferentes hidrolases lisossômicas como substrato, e a distinção de atividade residual entre diferentes mutantes e hidrolases específicas, claramente indica a importância desses domínios para o reconhecimento e interação do diverso conjunto de 70 proteínas responsáveis pela degradação de moléculas no lisossomo (van Meel et al. 2016).

Nesse sentido, van Meel e cols (2016) sustentam a hipótese que a GlcNac-1-fosfotransferase de mamíferos evoluiu de um gene ancestral que codificava uma enzima que realizava a transferência de grupamentos fosfatos para açúcares. Uma vez que as sequências de aminoácidos das diferentes hidrolases lisossômicas e a presença de oligossacarídeos em posições específicas não apresentam uma similaridade, seria necessário adquirir estruturas suficientes que garantissem que esse complexo enzimático reconhecesse um grupo de substratos diversos (em torno de 70 hidrolases). A diversidade de substratos reconhecidos pela GlcNac-1-fosfotransferase requer flexibilidade estrutural que comporte o reconhecimento de estruturas proteicas diferentes, que é possível com a presença dos domínios NOTCH, DMAP e a capacidade de interagir com a subunidade  $\gamma$ .

Contudo, essa flexibilidade estrutural não deve significar interagir e modificar outras proteínas que não hidrolases lisossômicas. Nesse sentido, quando se compara a sequência de aminoácidos do precursor  $\alpha\beta$  encontrado em humanos com a do amebóide *D. discoideum*,

uma das únicas diferenças observadas é na região denominada Space-1 (aminoácidos 87 a 322). No amebóide, essa região é substituída por 26 resíduos dos aminoácidos Glicina e Serina. Com o intuito de estudar a implicação dessa diferença, a região Space-1 humana foi modificada com a sequência de aminoácidos encontrada no amebóide. O mutante, denominado de  $\Delta$ Space-1, é transportado ao complexo de Golgi e clivado por S1P, porém em um novo sítio (p.Arg879), e a atividade residual foi de 60% quando utilizado como acceptor o  $\alpha$ -MM ou três hidrolases lisossômicas. Contudo, a atividade de fosforilação desse mutante em proteínas não lisossomais foi aumentada em 1.4 – 2.3 vezes (Lin Liu et al. 2017). Resultados semelhantes foram observados com uma GlcNAc-1-fosfotransferase mutante que, além da modificação na região Space-1, incluiu ainda a deleção de toda a sequência de aminoácidos entre as posições 438-928 (que compreende os domínios NOTCH 1 e 2,  $\gamma$ -binding, DMAP e a região sem similaridade entre os aminoácidos 819-928). A proteína mutante resultante é expressa e transportada ao complexo de Golgi normalmente, porém deixa de ser substrato de clivagem para S1P. Contudo, a atividade enzimática residual foi 21 vezes superior quando utilizado o açúcar  $\alpha$ -MM e entre 56% a 117% quando utilizado diferentes hidrolases lisossômicas ( $\beta$ -hexosaminidase,  $\alpha$ -galactosidase A e  $\beta$ -manosidase). Por último, a superexpressão dessa GlcNAc-1-fosfotransferase mutante em conjunto com plasmídeos das hidrolases lisossômicas  $\alpha$ -manosidase,  $\alpha$ -glicosidase,  $\alpha$ -galactosidase A e glucocerebrosidase, resultaram em um aumento de 2.1- 4.9 vezes mais fosforilação do que a proteína de *GNPTAB* selvagem, o mesmo aumento foi observado em outras proteínas que não hidrolases lisossômicas (Liu et al. 2017).

Outro domínio identificado por similaridade de sequência é o denominado Stealth, que é uma família de proteínas normalmente composta por quatro regiões conservadas denominadas *Conserved regions* (CR1 até CR4). Em bactérias, esses domínios são fundamentais para aderência celular e proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro, uma vez que estão relacionados a síntese da cápsula de polissacarídeos (Sperisen et al. 2005; Muindi et al. 2014). No transcrito precursor  $\alpha/\beta$ , os domínios são encontrados em quatro regiões distintas (CR1 - CR4) (Figura 5).

Tabela 2 – Estudos funcionais com variantes patogênicas do gene *GNPTAB*

Domínio	Alteração Patogênica		Transporte <sup>1</sup>	Atividade enzimática		Referência
	cDNA	Proteína		$\alpha$ -MM <sup>3</sup>	Hidrolas e	
Transmembrana	c.70T>G	p.Phe24Val	+	65%	NA	Lee et al. 2020
	c.77G>A	p.Gly26Asp	+/-	42%	NA	Lee et al. 2020
	c.80T>A	p.Val27Asp	-	<2%	NA	Lee et al. 2020
	c.83T>A	p.Val28Asp	-	<2%	NA	Lee et al. 2020
	c.100G>C	p.Ala34Pro	+/-	25%	NA	Lee et al. 2020
	c.107A>C	p.Glu36Pro	+/-	26%	NA	Lee et al. 2020
Stealth	c.242G>T	p.Trp81Leu	+/-	<2%	NA	Qian et al. 2014
			+/-	NA	NA	(De Pace et al. 2014)
	c.1001G>A	p.Arg334Gln	-	<2%	NA	Qian et al. 2014
	c.1001G>T	p.Arg334Leu	-	<2%	NA	Qian et al. 2014
	Artificial <sup>2</sup>	p.Ile346Ala	+/-	NA	NA	Velho et al. 2015a
	c.1042A>C	p.Ile348Leu	+	82%	100%	Qian et al. 2014
	Artificial <sup>2</sup>	p.Trp357Ala	-	NA	NA	Velho et al. 2015a
	c.1120T>C	p.Phe374Leu	+	<2%	NA	Qian et al. 2014
	Artificial <sup>2</sup>	p.Leu380Ala	+/-	NA	NA	Velho et al. 2015a
	Artificial <sup>2</sup>	p.Glu389Ala	+/-	NA	NA	Velho et al. 2015a
	c.1196C>T	p.Ser399Phe	+/-	8%	NA	Velho et al. 2015a
			+/-	NA	NA	De Pace et al. 2014
	c.1208T>C	p.Ile403Thr	+/-	11%	NA	Qian et al. 2014
			-	4-6%	NA	Qian et al. 2015
	c.1220A>C	p.Asp407Ala	+	8%	NA	Qian et al. 2014
	Artificial <sup>2</sup>	p.Asp408Ala	+	NA	NA	Velho et al. 2015a
	Artificial <sup>2</sup>	p.Tyr421Ala	+	NA	NA	Velho et al. 2015a
	c.2864C>T	p.Ala955Val	+	9%	NA	Qian et al. 2014
	c.2866A>G	p.His956Tyr	+	4%	NA	Qian et al. 2014
	c.2956C>T	p.Arg986Cys	+	<2%	NA	Qian et al. 2014
		+	NA	NA	De Pace et al. 2014	
	c.3002T>C	p.Leu1001Pro	+/-	5%	NA	Qian et al. 2014
	c.3053A>G	p.Asp1018Gly	+/-	<2%	NA	Qian et al. 2014
	c.3458A>G	p.Asn1153Ser	+	<2%	NA	Qian et al. 2014
Notch	c.1325G>A	p.Cys442Tyr	+	94%	18%	Qian et al. 2014
	c.1381T>G	p.Cys461Gly	+	94%	15%	Qian et al. 2014
	c.1402T>A	p.Cys468Ser	+	105%	18%	Qian et al. 2014
	c.1514G>A	p.Cys505Tyr	+/-	42%	36%	Qian et al. 2014
			+/-	4-6%	NA	Velho et al. 2015a
	c.1567T>C	p.Cys523Arg	+/-	29%	18%	Qian et al. 2014
$\gamma$ -binding	c.1723G>A	p.Gly575Arg	+/-	4-6%	NA	Velho et al. 2015a
	c.1760G>C	p.Arg587Pro	+/-	26%	16%	Qian et al. 2014
	c.1774G>A	p.Ala592Thr	+	23%	25%	Qian et al. 2014
	c.1931C>T	p.Thr644Ile	+	50%	NA	Velho et al. 2015a
	c.2777A>C	p.Gln926Pro	+	<2%	NA	Qian et al. 2014
	c.3160C>G	p.Leu1054Val	+	85%	95%	Qian et al. 2014
DMAP	c.2196G>T	p.Lys732Asn	+	100%	12%	Qian et al. 2014
	c.2354T>G	p.Leu785Trp	+	103%	15%	Qian et al. 2014
Space	c.10A>C	p.Lys4Gln	+/-	32%	NA	Van Meel et al. 2014
			NA	NA	38%	Qian et al. 2014
	c.22A>G	p.Arg8Gly	+/-	NA	NA	Liu et al. 2018
			+/-	41%	NA	van Meel et al. 2014
	c.44C>A	p.Ser15Tyr	NA	NA	35%	Qian et al. 2014
	c.545T>A	p.Val182Asp	+/-	8%	NA	Qian et al. 2014
	c.569A>T	p.Asp190Val	+	86%	76%	Qian et al. 2014
	Artificial <sup>2</sup>	p.Arg879Ala	+	35%		Velho et al. 2015a
	Artificial <sup>2</sup>	p.Arg925Ala	+	<2%		Velho et al. 2015a
	c.3707A>T	p.Lys1236Met	+/-	NA	NA	De Pace et al. 2014
		+	77%	81%	Qian et al. 2014	

NA – Não avaliado. <sup>1</sup> Transporte avaliado através da presença de subunidade  $\beta$  ou co-localização da proteína de *GNPTAB* no complexo de Golgi pela técnica de imunofluorescência. <sup>2</sup> Variantes que não foram identificadas em pacientes com ML II/III, mas que foram geradas em laboratório. <sup>3</sup>  $\alpha$ -Metil-Manosídeo.



Até o presente momento, 40% (n=28/66) das variantes do tipo troca de sentido estão localizadas em algum dos quatro CRs, sendo que 19 (68%) destas estão associadas a ML II (Velho et al. 2019). Do total de variantes descritas, 20 foram analisadas funcionalmente. Duas delas, p.Arg334Leu e p.Arg334Gln, apresentaram proteínas mutantes presas no RE e, conseqüentemente, com subunidade  $\beta$  indetectável e atividade residual nula. O mesmo padrão pode ser visto na proteína mutante p.Trp357Ala, que foi artificialmente introduzida em laboratório e não foi identificada em pacientes (porém sem atividade residual avaliada). Esses dados demonstram que variantes patogênicas no domínio Stealth podem gerar proteínas instáveis o suficiente para que o transporte, e todas as possíveis interações proteína-proteína que o envolvem, não aconteça (Qian et al. 2014).

Um segundo grupo de proteínas mutantes apresenta diferentes níveis detectados de subunidade  $\beta$  e co-localização no complexo de Golgi, indicando transporte parcialmente afetado. Estes podem ser divididos entre as variantes que geram atividade residual parcial, como p.Ser399Phe e p.Ile403Thr, ou inferior a 2%, como p.Trp81Leu, p.Leu1001Pro e p.Asp1018Gly. Ainda é possível identificar um terceiro grupo, que são aquelas proteínas mutantes que apresentam co-localização predominantemente no complexo de Golgi e formação normal de subunidade  $\beta$ , indicando um transporte regular entre as organelas, contudo a atividade enzimática é residual, como p.Ile348Leu, p.Asp407Ala e p.Ala955Val, ou nula, como p.Phe374Leu, p.His956Tyr, p.Arg986Cys e p.Asn1153Ser. Em uma análise conjunta, as sete proteínas mutantes que são transportadas ao complexo de Golgi, são clivadas para formação de subunidade  $\beta$ , porém apresentam atividade residual muito baixa ou nula, indicam que os domínios Stealth podem estar diretamente relacionados a um dos processos essenciais para a atividade catalítica da GlcNAc-1-fosfotransferase (Qian et al. 2014; Velho et al. 2015a; Velho et al. 2019).

Para realizar a transferência de um GlcNAc-1-fosfato para o oligossacarídeo presente na hidrolase, além de realizar a transferência propriamente dita, a GlcNAc-1-fosfotransferase necessita interagir com os seguintes substratos: o resíduo de manose presente no oligossacarídeo da hidrolase lisossômica, a própria hidrolase lisossômica e o doador UDP-GlcNAc. Mesmo que haja consenso sobre o envolvimento dos domínios Stealth com a atividade catalítica da GlcNAc-1-fosfotransferase, atualmente não é possível definir em quais

das funções acima citadas os domínios Stealth estão envolvidos (Qian et al. 2014; Velho et al. 2019).

Os genes *GNPTAB* e *GNPTG* são considerados heterogêneos

As bases genéticas das ML II e III foram descobertas no início dos anos 2000. Raas-Rothschild e cols (2000) publicaram as primeiras evidências relacionando variantes genéticas em pacientes acometidos com ML IIIC ao cromossomo 16p, especificamente em uma região conhecida na época como EST T30150. Os autores descreveram variantes nessa região em pacientes de três famílias de origem Drusa e Árabe, provando assim a ligação de variantes na região determinada e a doença ML IIIC. No ano de 2005, duas publicações evidenciaram as primeiras relações entre ML II e ML IIIA e o gene então chamado de *GNPTA*. Com estratégias muito semelhantes ao trabalho do ano de 2000, Paik e cols (2005) demonstraram que pacientes de origem asiática diagnosticados com ML II e IIIA apresentavam variantes em uma região denominada de MGC4170, que estava localizada no cromossomo 12, a mesma região previamente relacionada a essas doenças. No mesmo ano, Tiede e cols (2005) também reportaram as primeiras variantes no mesmo gene, agora em pacientes de origem europeia. Esses três trabalhos são considerados os primeiros que descreveram variantes patogênicas em genes que atualmente são conhecidos como *GNPTAB* e *GNPTG*.

Desde então, uma extensa literatura de descrição de casos de pacientes estabeleceu esses dois genes como os relacionados às ML II e III. O gene *GNPTAB* está localizado no cromossomo 12q23.2 e compreende 5720 nucleotídeos divididos em 21 éxons. Sua transcrição dá origem ao mRNA precursor das subunidades  $\alpha/\beta$  e variantes patogênicas neste gene podem resultar nas doenças ML II e ML III alfa/beta. Por sua vez, o gene *GNPTG* está localizado no cromossomo 16p13.3 e compreende 1975 nucleotídeos divididos em 11 éxons, sua transcrição origina a subunidade  $\gamma$  e variantes patogênicas neste gene causam a doença ML III gama (Raas-Rothschild et al. 2000; Paik et al. 2005; Tiede et al. 2005).

Em recente revisão da literatura das diferentes variantes patogênicas em ambos os genes, foi identificado 75 trabalhos na base de dados PUBMED que descrevem um total de 308 variantes patogênicas observadas em 518 pacientes. A distribuição dos pacientes

engloba todos os continentes (Figura 6), e em sua maioria os dados são referentes a variantes encontradas no gene *GNPTAB* (Velho et al. 2019).

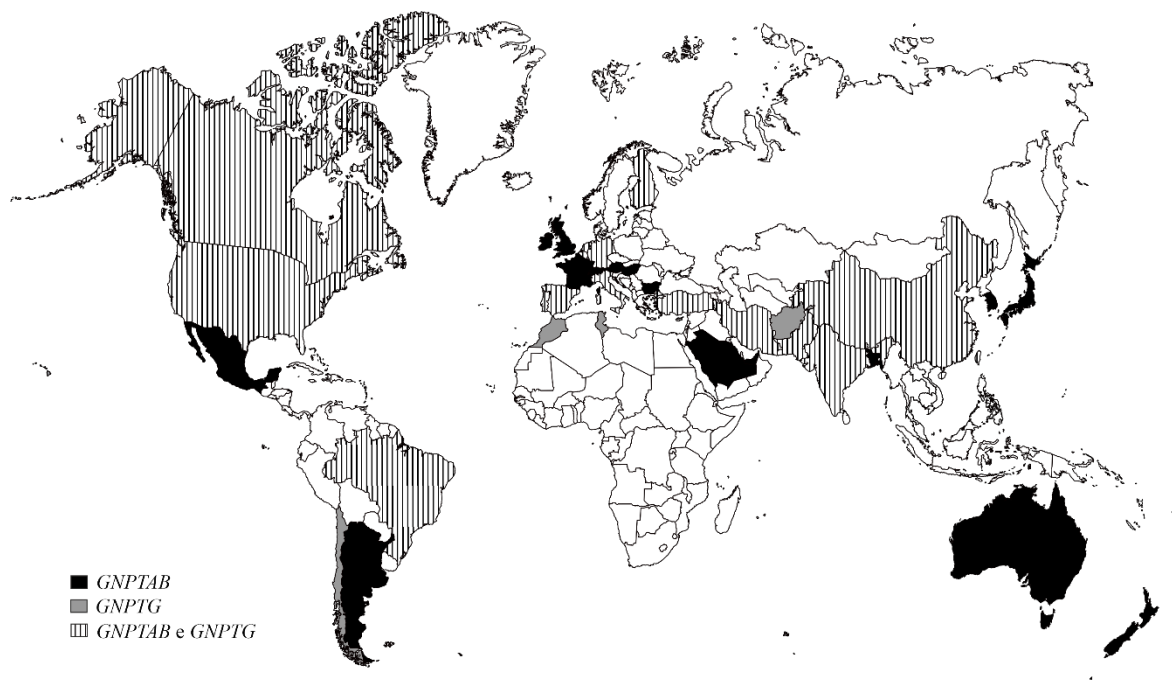


Figura 6 – **Distribuição dos dados genéticos de pacientes descritos com ML II e III.** Dados de distribuição geográfica dos 517 pacientes descritos com ML II/III. Países em preto indicam dados do gene *GNPTAB*, em cinza de *GNPTG* e em listra de ambos os genes (Velho et al. 2019).

Segundo dados da revisão, para o gene *GNPTAB* foram descritas 258 variantes patogênicas, que se apresentam na maioria como do tipo mudança de fase de leitura (39%), troca de sentido (26%) e sem sentido (23%), com apenas 3% das variantes relacionadas a grandes deleções, inserções ou duplicações. Outro aspecto importante das variantes identificadas é que 72% destas são consideradas privadas, ou seja, identificadas apenas em uma família, e que apenas 25 das variantes (10%) foram identificadas em mais de duas famílias. A alteração patogênica c.3503\_3504del é a mais frequentemente encontrada (131 pacientes) e possui distribuição geográfica ampla, mas não é encontrada em populações asiáticas. A segunda alteração mais frequente, a troca de sentido c.3565C>T, foi identificada em 43 indivíduos e apresenta frequência particularmente alta em populações da Ásia, porém foi encontrada também em países da Europa, Oceania, América do Norte e Oriente Médio. Também é possível observar que algumas variantes possuem distribuição geográfica exclusiva, particularmente em populações asiáticas, como é o caso das variantes c.2715+1G>A no Sudeste da Ásia (Paik et al. 2005; Otomo et al. 2009b; Zhan et al. 2011; Ho et al. 2018; Kwak et al. 2018; Wang et al. 2018), a sem sentido c.1090C>T na China (Zhan et al. 2011; Yang et al. 2013; Liu et al. 2016; Wang et al. 2018) e a troca de sentido

c.1120T>C no Japão (Otomo et al. 2009b; Hara et al. 2013; Shibasaki et al. 2016; Wang et al. 2018). Desde a publicação da revisão, três novos trabalhos relatando outros 5 pacientes da China (Pan et al. 2019; Yu et al. 2019) e Paquistão (Khan et al. 2020) descreveram 3 novas variantes, elevando o total para 261 variantes patogênicas identificadas no gene *GNPTAB*.

Em função da alta prevalência de alelos afetados em diferentes populações e de estudos de haplótipos realizados com cromossomos contendo a c.3503\_3504del de diferentes países, a teoria é de uma única origem a 3.000 anos atrás numa região próxima ao Mediterrâneo à leste da Europa, possivelmente no Oriente Médio. Migrações populacionais da região introduziram o alelo na Europa, e que mais recentemente foi disseminado para o novo Mundo (Coutinho et al. 2011). No Brasil, análises mais abrangentes em número de pacientes e de marcadores genéticos também permitiu identificar a presença de um haplótipo predominante, porém com uma diversidade maior (0.839 versus 0.709) de haplótipos que apresentam a alteração patogênica, possivelmente em função de eventos de recombinação gênica (Soares et al. 2020).

Padrão semelhante de variantes patogênicas é observado para o gene *GNPTG*, que apresenta um total de 50 variantes descritas que se dividem majoritariamente em mudanças de fase de leitura (35%) e sem sentido (23%). Além disso, 80% das variantes identificadas são consideradas únicas e apenas nove foram identificadas em duas ou três famílias. Uma particularidade interessante é a presença expressiva de variantes em sítio de *splicing*, que abrangem 21% das variantes descritas (no gene *GNPTAB* são 9%), e que estão presentes em sua maioria no íntron 8 (45%) (Velho et al. 2019).

Os dados de variantes patogênicas para a América Latina são poucos e restritos ao Brasil, onde os primeiros trabalhos que relatam informações sobre as doenças no país são do começo da década de 2010. O trabalho de Cury e cols (2013) descreve informações de diagnóstico genético de 13 pacientes não relacionados e avaliados por sequenciamento de Sanger. Utilizando sangue periférico como amostra, os autores identificaram nove variantes patogênicas diferentes, sendo duas destas descritas pela primeira vez. Dos 24 alelos analisados (um paciente consanguíneo e outro com apenas amostra materna para confirmação), a alteração mais frequentemente encontrada foi a c.3503\_3504del, responsável por 45,8% (11/24) dos alelos. Outros trabalhos nos anos subsequentes descrevem outros dois pacientes (Sperb-Ludwig et al. 2015; Velho et al. 2015a).

Para o gene *GNPTG* há dados disponíveis de três pacientes provenientes de duas famílias diferentes. O primeiro caso é uma paciente, filha de casal não consanguíneo, que apresentou as variantes patogênicas c.244\_247dup e c.328G>T, em heterozigose. Análises de segregação nos pais confirmaram a alteração apenas no pai (c.328G>T). Após sequenciamento de diferentes fontes de DNA e análises de PCR em tempo real do trio (mãe, pai e paciente demonstraram níveis de 88,5%, 54% e 1,6%, respectivamente, do gene *GNPTG*), os autores concluem o caso como uma possível alteração *de novo* (Velho et al. 2014).

O segundo caso é de dois irmãos, filhos de casal não consanguíneo, que apresentaram a alteração do tipo sem sentido c.328G>T (p.Glu110\*), em homozigose. Uma vez que análises de RT-PCR falharam em identificar a alteração patogênica, e que as possibilidades de alteração no número de cópias, mosaïcismo e pseudogene foram excluídas, os autores concluem que a provável explicação para o fenômeno observado é a ocorrência de edição de RNA (Velho et al. 2016b).

As variantes patogênicas e a consequente gravidade do fenótipo

Uma vez que as ML II e III são doenças raras e de difícil diagnóstico, e que as variantes patogênicas são em sua grande maioria consideradas privadas, o estabelecimento da relação genótipo – fenótipo se torna particularmente desafiante. No entanto, diversos estudos realizados nos últimos anos permitiram a identificação de centenas de pacientes e variantes (Bargal et al. 2006; Kudo et al. 2006; Tappino et al. 2009; Otomo et al. 2009b; Encarnação et al. 2009; Cathey et al. 2010; Cury et al. 2013), que estudadas através de técnicas de biologia molecular em modelos celulares tem elucidado os mecanismos do complexo  $\alpha^2\beta^2\gamma^2$  (Qian et al. 2014; Velho et al. 2019).

Dados de análise da atividade residual da GlcNAc-1-fosfotransferase de células de pacientes demonstram que valores inferiores a 10% dos observados em controles estão associados ao fenótipo mais grave, ML II (Steet et al. 2005; Cathey et al. 2010; Leroy et al. 2013). Valores semelhantes são observados em modelos celulares expressando diversas proteínas mutantes de *GNPTAB* (Velho et al. 2019).

A GlcNAc-1-fosfotransferase é uma enzima residente da porção *cis* do complexo de Golgi, onde é clivada pela protease S1P para adquirir a conformação ativa. Logo, todas as

variantes que impossibilitam o transporte da enzima para a organela supracitada estarão relacionadas a uma proteína inativa. Variantes patogênicas que resultam em mudança da fase de leitura invariavelmente afetam o motivo C-terminal <sup>1253</sup>Arg-Ile-Arg<sup>1255</sup>, um dos sinalizadores para o transporte ao complexo de Golgi. Além disso, essas variantes podem gerar códons de parada prematuro, que, em conjunto com as variantes do tipo sem sentido, podem ser alvo da via de decaimento mediado por mutação de códon de parada prematuro (*nonsense mRNA decay* - NMD), ocasionando a degradação do mRNA (Coutinho et al. 2016). Sendo assim, essas classes de variantes são esperadas a resultar em alelos nulos, isto é, em proteínas truncadas que não serão transportadas ao complexo de Golgi e consequentemente apresentarão atividade residual nula. O que se observa em pacientes com genótipos compostos de uma combinação dessas variantes é o fenótipo mais grave de ML II (Otomo et al. 2009b; Cathey et al. 2010; Velho et al. 2019).

As variantes do tipo mudança de *splicing* podem apresentar efeitos diversos, mas que em sua maioria tem como resultado uma modificação do reconhecimento dos diferentes níveis de controle do spliceossoma, que podem acarretar mudanças do sítio canônico de *splicing*. Entre as diversas possibilidades de consequência, estão a geração de moléculas de mRNA com deleções de éxons inteiros, ou de partes desses, ou inserções de partes de íntron, bem como a ativação de éxons crípticos (Abramowicz and Gos 2019). Em geral, essa alteração ocasionará a modificação da fase de leitura e a presença de códons de parada prematura, que por fim apresentam o mesmo efeito das variantes do tipo mudança de fase de leitura e sem sentido. Contudo, pacientes que apresentam esse tipo de alteração estão mais frequentemente representados no grupo de fenótipo mais leve, a ML III alfa/beta (Velho et al. 2019). Uma explicação para essa observação é que o efeito deletério causado pela alteração que gera a mudança de *splicing* não é universal, isto é, o alelo que apresenta a alteração não gerará apenas uma molécula de mRNA. Na verdade, as variantes do tipo mudança de *splicing* são caracterizadas por apresentar um grupo de isoformas de mRNA, que podem inclusive ser compostas pela isoforma selvagem. Esse fato explica a relação dessa classe de alteração com fenótipos mais leves de ML III. Importante ressaltar que uma significativa parte das variantes identificadas possui apenas análises de bioinformática que suportam seu efeito deletério (Abramowicz and Gos 2019; Velho et al. 2019).

Já as variantes da classe troca de sentido estão associadas na sua maioria ao fenótipo mais leve (64%, n=41/64) (Tabela 2). No entanto, 23 variantes estão relacionadas a atividade

enzimática residual abaixo de 10% e foram identificadas em pacientes com o fenótipo mais grave. Essas proteínas podem (1) falhar em ser inseridas no lúmen do RE, ou (2) serem incapazes de deslocamento ao complexo de Golgi, ou quando transportados podem (3) serem incapazes de permanecer nesta organela e ainda (4) serem incapazes de realizar a adição de M6P em hidrolases lisossômicas ou no açúcar  $\alpha$ -MM. Variantes patogênicas dessa classe que impactam o transporte da GlcNAc-1-fosfotransferase ao complexo de Golgi (1 e 2) estão identificadas em pacientes com ML II, pois são associadas à atividade residual nula. Já as proteínas mutantes identificadas no domínio Stealth que são transportadas ao complexo de Golgi apresentam atividade residual variável, desde valores inferiores a 2% e associadas ao fenótipo ML II, quanto valores em torno 5-10% que estão associadas ao fenótipo ML III alfa/beta (Qian et al. 2014; Velho et al. 2019).

As variantes patogênicas que afetam domínios que estão envolvidos no reconhecimento de hidrolases lisossômicas como NOTCH 1 e 2, DMAP e  $\gamma$ -binding, normalmente apresentam atividade residual comparável ao controle quando utilizado o açúcar  $\alpha$ -MM, porém essa atividade é reduzida quando diferentes hidrolases são utilizadas como aceptores, mas ainda suficiente para garantir o fenótipo mais leve ML III alfa/beta (Qian et al. 2013; van Meel et al. 2016; Velho et al. 2019).

As ML II e III são doenças raras

A incidência das ML II/III varia entre os diferentes países para os quais existem dados disponíveis. No Japão a incidência foi de 1: 252.500 (Okada et al. 1985) nascidos vivos, em Portugal de 1:123.500 (Pinto et al. 2004), na Austrália foi 1:325.000 (Poorthuis et al. 1999) e na Holanda de 1:625.500 (Meikle 1999). Na região de Quebec, no Canadá, estima-se uma incidência de 1:6.184 recém-nascidos vivos e frequência de heterozigotos de 1:39 (De Braekeleer M. 1991; Plante et al. 2008), mas cabe ressaltar a presença de efeito fundador na região. No Brasil, a incidência mínima estimada é de 1:2.357.000 nascidos vivos (Alegra et al. 2019).



## A necessidade de um diagnóstico diferencial

O diagnóstico das ML II e III é realizado através da avaliação da sintomatologia apresentada pelos pacientes, como a idade de aparecimento dos sintomas, progressão da doença e gravidade dos sintomas. Este diagnóstico não diferencia as doenças ML III alfa/beta e gama. No Brasil, seguido da suspeita clínica, o diagnóstico das doenças pode ser confirmado através da mensuração da atividade enzimática de diversas hidrolases lisossômicas no plasma e em células (usualmente fibroblastos), que é o diagnóstico bioquímico, ou pela análise dos dois genes envolvidos na doença, que é o diagnóstico genético (Cathey et al. 2008; Braulke et al. 2015; Alegra et al. 2019).

O diagnóstico bioquímico é realizado baseado na fisiopatologia das ML II/III, onde o defeito na síntese de marcadores de M6P nas hidrolases lisossômicas causa o acúmulo destas na rede *trans* do complexo de Golgi e o subsequente envio para o ambiente extracelular. Sendo assim, a mensuração das hidrolases lisossômicas em plasma de pacientes pode apresentar um aumento entre 5 a 25 vezes do normal. Além do plasma, analisado a partir de 5 mL de sangue total, a mensuração das mesmas hidrolases em células como fibroblastos de pacientes (através de biópsia de pele) encontrará uma atividade residual abaixo do normal. Não há consenso sobre quantas e quais hidrolases avaliar, mas em geral é realizada a mensuração de cinco hidrolases. Em conjunto, ambas as avaliações confirmam o diagnóstico de ML II/III, pois não é possível distinguir entre as doenças realizando esse tipo de avaliação. A mensuração das hidrolases em amostras de plasma apenas, caracteriza-se como diagnóstico bioquímico parcial (Raas-Rothschild et al. 2012; Braulke et al. 2015).

O diagnóstico genético é realizado através do sequenciamento dos genes relacionados à doença e é caracterizado pela presença de duas variantes patogênicas, uma vez que se trata de doenças autossômicas recessivas. Uma amostra de 5 mL de sangue total é suficiente para extração de DNA para a análise, que baseada na suspeita clínica pode direcionar por qual gene se iniciará a investigação, onde pacientes com suspeita de ML II podem ser iniciados pelo gene *GNPTAB* e pacientes com ML III pelo gene *GNPTG*. A técnica comumente utilizada é o sequenciamento de Sanger, que apresenta taxa de diagnóstico entre 90 a 95%, mas é possível utilizar as diferentes abordagens do Sequenciamento de Nova Geração (NGS) (Braulke et al. 2015). É importante ressaltar que ambas as técnicas são direcionadas para analisar as regiões codificantes, os éxons, e as junções éxon-íntron e que, portanto, podem

não identificar algumas classes de variantes patogênicas reportadas em ambos os genes, como variantes de mudança de *splicing* e grandes deleções (Velho et al. 2019). Nesse sentido, uma possibilidade a considerar é realizar o sequenciamento do DNA complementar do paciente através da técnica conhecida como RT-PCR, mas que também pode apresentar problemas de sensibilidade (Coutinho et al. 2016).

Nos últimos anos uma série de estudos demonstraram que é possível realizar a avaliação do acúmulo de diferentes subtipos de glicosaminoglicanos (GAGs) através da Espectrometria de Massas em Tandem (MS/MS) em amostras de urina, papel filtro e plasma de pacientes com ML II/III (Tomatsu et al. 2010; Langereis et al. 2015; Ellsworth et al. 2016; Kubaski et al. 2016; Pino et al. 2019; Chien et al. 2020). Mesmo com resultados positivos, o alto custo de implementação da técnica e o baixo número de amostras avaliadas, tornam a utilização dessa estratégia para diagnóstico de ML II/III uma promessa para o futuro.

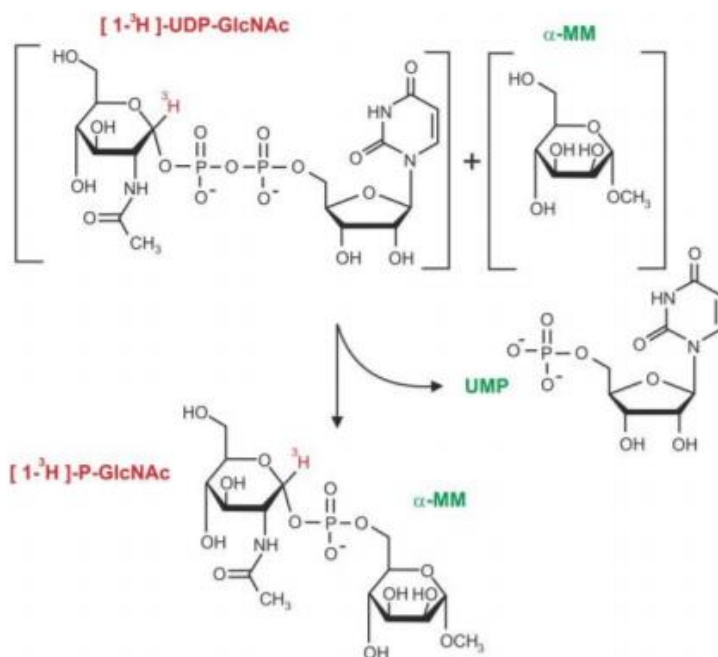


Figura 7 – **Realização da mensuração da atividade da GlcNAc-1-fosfotransferase.** Representação molecular da transferência de uma molécula de N-acetil-glucosamina-1-fosfato do doador difosfato de uridina (UDP)-GlcNAc, modificado com o isótopo do hidrogênio trítium (<sup>3</sup>H), para o aceptor α-metil D-manosídeo (α-MM), com subsequente liberação de uma molécula de Uridina monofosfato (UMP). Adaptado de De Pace (2014).

A utilização de papel filtro (*Dried Blood Spots* – DBS) é uma possibilidade que ganhou destaque em função da facilidade de coleta e transporte da amostra, e pode ser

utilizado para o diagnóstico bioquímico e genético das doenças (Cobos; et al. 2013). Outra possibilidade é realizar a atividade residual da GlcNAc-1-fosfotransferase, a partir de leucócitos ou fibroblastos de pacientes, em substratos sintéticos (normalmente o  $\alpha$ -MM) (Figura 7), porém a necessidade de reagentes radioativos tornam o experimento de alto custo e de difícil logística, e que até então é realizado em poucos centros de pesquisa (Brulke et al. 2015).

Tratamentos: uma série de abordagens *in vitro*

Atualmente inexistente tratamento específico disponível para as ML II e III. A abordagem terapêutica mais utilizada foi o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH). O primeiro relato de caso é de uma paciente com ML II que recebeu a intervenção aos 8 meses de idade, e que apresentou resultados satisfatórios como restabelecimento dos níveis de atividade residual da GlcNAc-1-fosfotransferase e outras hidrolases lisossômicas em leucócitos três meses após o transplante. Contudo, foi observada uma leve diminuição da atividade enzimática de diferentes hidrolases lisossômicas em plasma. Os autores concluem que há evidência clínica de que o TCTH havia alterado a evolução da doença (Kurobane et al. 1986).

Uma revisão da literatura descreve as experiências do transplante de TCTH em 22 pacientes com ML II entre os anos de 1991 e 2011. A mediana de idade ao transplante foi de 9 meses (2 - 23) e de três meses após diagnóstico (2 - 20). O tempo médio de sobrevivência foi de 27.6 meses e no último seguimento a taxa de sobrevivência era de apenas 27%, com uma probabilidade de sobrevivência de 5 anos de 33%. Os autores concluem que inexistem evidências de melhora no desenvolvimento neurológico e, mesmo após alguns anos ao transplante (2 pacientes sobreviveram mais de 10 anos após transplante), a diminuição dos níveis enzimáticos de várias enzimas lisossômicas no plasma se mostrou pequena e insuficiente para a melhora dos sintomas característicos da doença (Lund et al. 2014). Em 2016, um relato de caso de um paciente ML II transplantado aos 26 meses de idade demonstrou uma diminuição de 20-40% da atividade residual de diferentes hidrolases lisossômicas em plasma, mas que mesmo assim continuavam de 2 a 10 vezes aumentadas em relação aos controles. Os autores também concluem que as células transplantadas não são suficientes para normalizar os níveis das diferentes hidrolases em plasma e

consequentemente não apresentam benefício terapêutico e mudança da história natural da doença (Shibazaki et al. 2016). Não há relatos de casos dessa intervenção em pacientes com ML III, possivelmente porque os riscos associados ao transplante não são justificados pelos benefícios apresentados (Naumchik et al. 2020).

Em uma abordagem de prova de conceito, a suplementação *in vitro* de uma fração enriquecida de hidrolases lisossômicas a partir do meio de cultura de células normais demonstrou recuperação de alguns aspectos fisiopatológicos comumente observados em células de pacientes com ML II/III. Foi observado o desaparecimento dos corpos de inclusão do citoplasma, o reestabelecimento da função normal das mitocôndrias, do status da autofagia e aumento da atividade de várias hidrolases lisossômicas, com eficiência enzima específica (Otomo et al. 2011). Em outra abordagem terapêutica *in vitro*, a administração de Genisteína foi utilizada em uma estratégia de terapia de redução de substrato, uma vez que ela está relacionada à diminuição da síntese de GAGs. Células de pacientes tratadas com o composto evidenciaram uma redução significativa de Heparan sulfato de forma dose dependente, porém também foi observada uma redução da proliferação celular (Otomo et al. 2012). Em outra abordagem de prova de conceito, fibroblastos de um modelo animal de ML III gama foram tratados com a enzima recombinante arissulfatase-B, e os resultados demonstraram uma redução de 42% da fração de Heparan sulfato e sulfato de condroitina. Os autores concluem que a hidrolase arissulfatase-B depende da subunidade  $\gamma$  para o direcionamento aos compartimentos lisossomais, e que a reposição enzimática foi efetiva em diminuir em parte o material acumulado (Di Lorenzo et al. 2018).

A terapia gênica foi avaliada em camundongos MLII, em uma estratégia de injeção intravenosa única aos seis meses de vida com vetor do tipo adenovírus (AVV) contendo a sequência de *GNPTAB*<sup>WT</sup>. Os animais tratados não apresentaram diferenças no ganho de peso ou crescimento corporal, contudo foi observado um aumento na densidade mineral óssea e na composição de massa magra após 32 semanas do tratamento, que possivelmente estão relacionados a uma diminuição da expressão de IL-6 em condrócitos articulares de ossos longos. Os autores concluem que a intervenção foi capaz de inibir o fenótipo ósseo observado na história natural desse modelo animal (Ko et al. 2016).

Recentemente, foi descrita uma estratégia terapêutica através da utilização de oligonucleotídeos desenvolvidos para causar a perda do éxon 19 do gene *GNPTAB*, região onde se identifica a pequena deleção c.3503\_3504del. O tratamento *in vitro* com diferentes

oligonucleotídeos direcionados para ambas as junções éxon-íntron, bem como posições na porção codificante, foram capazes de acarretar a retirada do éxon 19, em um padrão dose dependente, da molécula final de mRNA do gene *GNPTB*. Importante ressaltar que a perda desse éxon não originará mudança de fase de leitura, o que não compromete a sequência sinal C-terminal para o transporte da GlcNAc-1-fosfotransferase ao complexo de Golgi. Estudos futuros devem avaliar a capacidade funcional dessa proteína mutante para determinar o potencial efeito terapêutico que essa estratégia poderá trazer aos pacientes com ML II/III portadores dessa alteração patogênica (Matos et al. 2020).

Como apresentado nos últimos parágrafos, existem evidências *in vitro* de uma série de possibilidade terapêuticas em modelos celulares e animais de ML II/III. Contudo, nenhuma das estratégias descritas evoluiu para estudos clínicos até o presente momento. Sendo assim, atualmente se realiza o aconselhamento genético e a intervenção adotada é paliativa (Bräulke et al. 2015).

## Justificativa

As ML II/III são doenças genéticas que afetam diferentes órgãos, que podem apresentar sintomas visíveis ainda no período intrauterino e que, ao longo do desenvolvimento do paciente, evoluem para graves problemas ósseos, cardiorrespiratórios e neurológicos. Esses sintomas implicam em morbimortalidade elevada e forçam a necessidade de cuidados em tempo integral do paciente, que pode afetar a vida profissional e financeira dos familiares, além de frequentes internações hospitalares por problemas relacionados ao defeito bioquímico. Uma vez que essas doenças necessitam de diagnóstico diferencial e que informações sobre as mesmas são concentradas em poucos centros de referências para doenças genéticas, é comum que os pacientes experimentem uma “odisseia diagnóstica”, onde o período entre o aparecimento dos primeiros sintomas e o diagnóstico pode se estender por anos, o que pode proporcionar longos períodos de sofrimento e angústia aos familiares. A incidência para as ML II/III encontrada no Brasil é de 1:2.357.000 nascidos vivos, que é substancialmente inferior ao encontrado em outros países, o que provavelmente indica que essas doenças são subdiagnosticadas.

Desde sua descrição no início da década de 2000, o gene *GNPTAB* tem sido extensivamente pesquisado em pacientes com diagnóstico clínico e bioquímico de ML II/III em diversas populações. Esses esforços resultaram na identificação e descrição de dados moleculares de mais de 450 pacientes em 75 trabalhos diferentes indexados na base de dados PUBMED. Esses dados permitiram evidenciar que a alteração patogênica mais frequentemente encontrada é a c.3503\_3504del, mas que a maior parte das mudanças que causam o fenótipo são restritas às famílias únicas.

Desde as primeiras publicações no começo dessa década, os estudos funcionais para caracterizar as proteínas mutantes identificadas em pacientes com ML II/III foram uma importante ferramenta para ampliar o entendimento sobre a fisiologia intracelular da GlcNAc-1-fosfotransferase. Essa estratégia possibilitou a identificação de que os domínios NOTCH 1 e 2 e o DMAP são responsáveis pelo reconhecimento e interação com as hidrolases lisossômicas, também foram estudos nessa categoria que identificaram a região de reconhecimento e interação da subunidade  $\gamma$  na subunidade  $\alpha$ , que foi chamado de  $\gamma$ -*binding*. Esses avanços no entendimento da GlcNAc-1-fosfotransferase são um resultado direto da utilização da informação gerada através do diagnóstico genético para o

desenvolvimento de modelos celulares que avaliam o efeito fisiopatológico que uma dada modificação no mRNA do gene *GNPTAB* pode ocasionar. Uma das intervenções terapêuticas mais utilizadas para o tratamento de pacientes acometidos por diferentes doenças metabólicas, a terapia de reposição enzimática, é baseada na via de M6P que foi identificada inicialmente estudando linhagens primárias de pacientes com ML II na década de 1980. Além disso, é crescente o número de evidências relacionando variantes em *GNPTAB* e *GNPTG* com a gagueira persistente e que pode, em conjunto com o fato de também ser identificado variantes no gene *NAGPA* (que codifica a enzima descobridora), indicar um envolvimento da via de M6P com o fenótipo patológico supracitado, através de um mecanismo ainda não resolvido. Pesquisas por marcadores genéticos relacionados a um possível efeito protetor à infecção viral por Ebola, em decorrência da crise de saúde gerada pelo surto deste vírus no continente africano no ano de 2016, identificou o gene *GNPTAB* como possível marcador de resistência a infecção. Muito provavelmente, variantes que ocasionem ausência de atividade da GlcNAc-1-fosfotransferase inibem a infecção viral, o que foi posteriormente demonstrado pelo fato de células de pacientes com ML II apresentarem resistência a infecção, indicando que o mecanismo de entrada do vírus em células eucariotas é dependente do sistema endolisossomal.

A realização da presente tese é um passo adiante na linha de pesquisa sobre as ML II e III no Brasil. Nosso grupo desenvolve pesquisas com essas doenças a mais de 10 anos e contribuiu cientificamente para o aprimoramento do conhecimento em aspectos clínicos, bioquímicos, moleculares e de possíveis tratamentos. À parte das questões científicas, o grupo também apresenta um braço de extensão para com a sociedade, uma vez que as informações moleculares geradas através da pesquisa de variantes patogênicas dos genes envolvidos nas ML II/III retorna para os pacientes e suas famílias, o que é extremamente importante pois possibilita a realização do aconselhamento genético.

## Objetivos

### Gerais

- Caracterizar os mecanismos fisiopatológicos de variantes patogênicas de *GNPTAB*;
- Caracterizar pacientes brasileiros com ML II e III alfa/beta em relação a variantes patogênicas em *GNPTAB*.

### Específicos

- Caracterizar o impacto funcional das variantes p.Asp76Gly, p.Ser385Leu, p.Glu389Lys, p.Asp408Asn, p.His956Tyr e p.Arg986Cys de *GNPTAB*, identificadas em pacientes com ML II/III;
- Caracterizar o perfil de variantes patogênicas identificadas no gene *GNPTAB* em pacientes brasileiros com diagnóstico clínico e bioquímico de ML II/III, e sua distribuição nas regiões brasileiras;
- Desenvolver um protocolo de diagnóstico genético para o gene *GNPTAB* de pacientes com diagnóstico clínico e bioquímico de ML II/III.



**Capítulo 1** – Combined in vitro and in silico analyses of missense mutations in *GNPTAB* provide new insights into the molecular bases of mucopolipidosis II and III alpha/beta


Citação:

Danyukova, Tatyana, **Nataniel F. Ludwig**, Renata Voltolini Velho, Frederike L. Harms, Nilay Güneş, Henning Tidow, Ida V. Schwartz, Beyhan Tüysüz, and Sandra Pohl. 2019. “Combined In-vitro and In-silico Analyses of Missense Mutations in *GNPTAB* Provide New Insights into the Molecular Bases of Mucopolipidosis II and III Alpha/Beta.” *Human Mutation* 41:133– 139.

Acesso versão digital disponível no QR Code



# Combined in vitro and in silico analyses of missense mutations in *GNPTAB* provide new insights into the molecular bases of mucopolipidosis II and III alpha/beta

Tatyana Danyukova<sup>1\*</sup> | Nataniel F. Ludwig<sup>2,3\*</sup> | Renata V. Velho<sup>1</sup> |  
Frederike L. Harms<sup>4</sup> | Nilay Güneş<sup>5</sup> | Henning Tidow<sup>6</sup> |  
Ida V. Schwartz<sup>2,3</sup> | Beyhan Tüysüz<sup>5</sup> | Sandra Pohl<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Department of Osteology and Biomechanics, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

<sup>2</sup>Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>Postgraduation Program in Genetics and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup>Institute of Human Genetics, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

<sup>5</sup>Department of Pediatric Genetics, Istanbul University Cerrahpasa, Medicine School, Istanbul, Turkey

<sup>6</sup>The Hamburg Centre for Ultrafast Imaging and Department of Chemistry, Institute for Biochemistry and Molecular Biology, University of Hamburg, Hamburg, Germany

#### Correspondence

Sandra Pohl, Department of Osteology and Biomechanics, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany.  
Email: s.pohl@uke.de

#### Funding information

Deutsche Forschungsgemeinschaft, Grant/Award Numbers: KU 1240/10-1, PO 1539/1-1, SFB877-B3; Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)

#### Abstract

Mucopolipidosis (ML) II and III alpha/beta are inherited lysosomal storage disorders caused by mutations in *GNPTAB* encoding the  $\alpha/\beta$ -precursor of GlcNAc-1-phosphotransferase. This enzyme catalyzes the initial step in the modification of more than 70 lysosomal enzymes with mannose 6-phosphate residues to ensure their intracellular targeting to lysosomes. The so-called stealth domains in the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunit of GlcNAc-1-phosphotransferase were thought to be involved in substrate recognition and/or catalysis. Here, we performed in silico alignment analysis of stealth domain-containing phosphotransferases and showed that the amino acid residues Glu389, Asp408, His956, and Arg986 are highly conserved between different phosphotransferases. Interestingly, mutations in these residues were identified in patients with MLII and MLIII alpha/beta. To further support the in silico findings, we also provide experimental data demonstrating that these four amino acid residues are strictly required for GlcNAc-1-phosphotransferase activity and thus may be directly involved in the enzymatic catalysis.

#### KEYWORDS

catalytic activity, GlcNAc - 1 - phosphotransferase, *GNPTAB*, lysosomal storage disorder, site-1 protease, stealth domains

Mucopolipidosis (ML) type II (MIM# 252500) and type III alpha/beta (MIM# 252600) are autosomal recessive lysosomal storage disorders of childhood (Cathey et al., 2008; Cathey et al., 2010). Both diseases are caused by mutations in the *GNPTAB* gene encoding the

$\alpha/\beta$  - precursor of N - acetylglucosamine (GlcNAc) - 1 - phosphotransferase (EC 2.7.8.17; Tiede et al., 2005). This enzyme complex is required for the formation of mannose 6 - phosphate (M6P) residues on lysosomal enzymes, which is essential for their intracellular trafficking to lysosomes (Braulke & Bonifacio, 2009). Cells from patients with MLII and MLIII alpha/beta are biochemically characterized by

\*Tatyana Danyukova and Nataniel F. Ludwig contributed equally to this study.

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

© 2019 The Authors. Human Mutation published by Wiley Periodicals, Inc

Human Mutation. 2019;1–7.

wileyonlinelibrary.com/journal/humu | 1

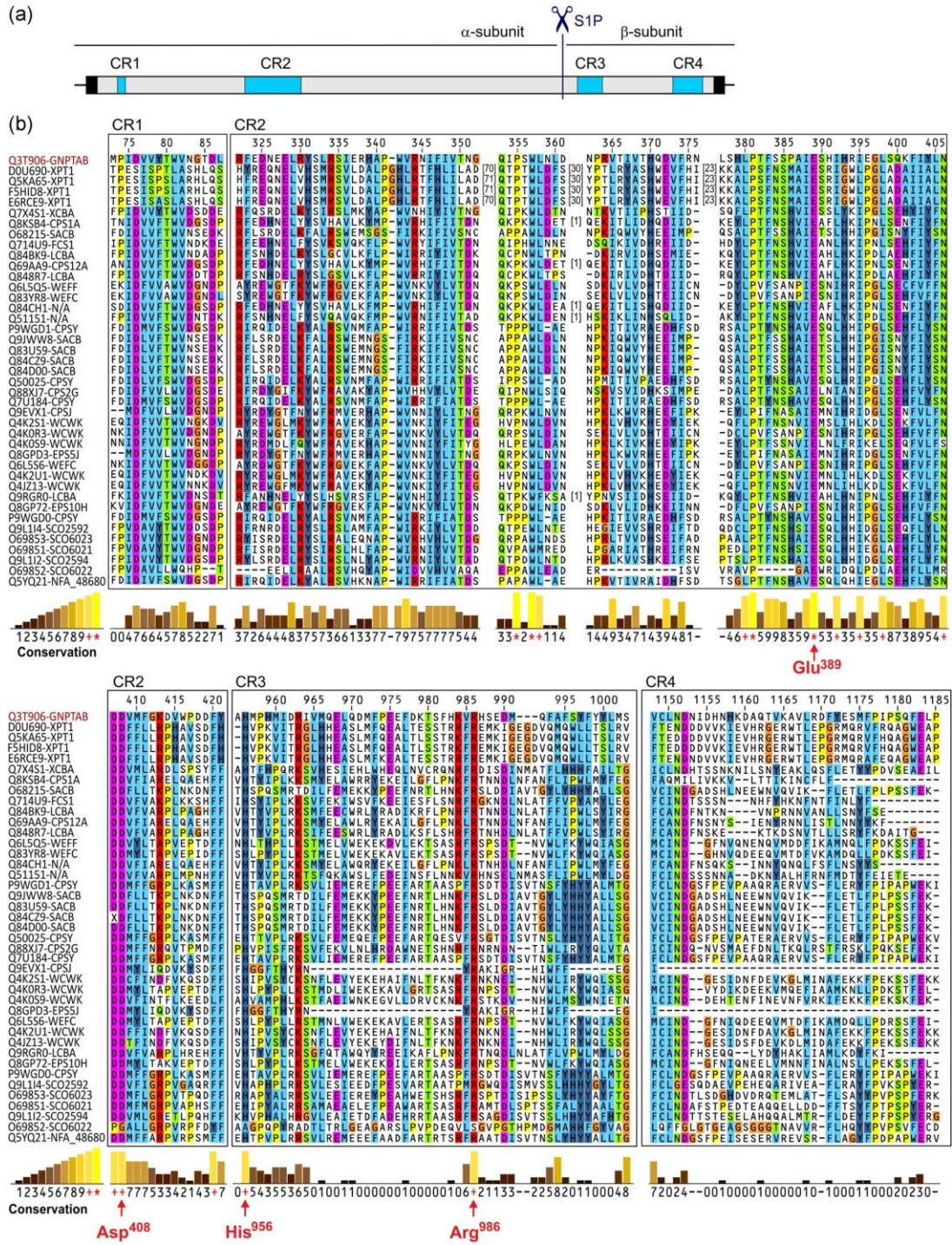


FIGURE 1 Continued.

missorting and hypersecretion of lysosomal enzymes into the extracellular space. The subsequent intracellular deficiencies of these lysosomal enzymes result in the accumulation of nondegraded material in dysfunctional lysosomes, which strongly impairs cellular function and homeostasis (Kollmann et al., 2010). Clinical features of MLII-affected individuals include facial dysmorphism, growth retardation, severe skeletal abnormalities, progressive psychomotor retardation, organomegaly, and cardiorespiratory insufficiency leading to death in early childhood. MLIII alpha/beta is an attenuated form of the disease, with later onset and slower progression of the clinical course, which enables survival into adulthood. So far, 258 mutations in the GNPTAB gene have been identified in individuals with MLII and MLIII alpha/beta (Velho et al., 2019). Frameshift and nonsense mutations on both alleles are associated with absent or strongly reduced GlcNAc-1-phosphotransferase activity and result generally in the severe MLII disease. Conversely, missense GNPTAB mutations are mainly associated with residual GlcNAc-1-phosphotransferase activity and result in the MLIII alpha/beta disease with less severe progression (Cathey et al., 2010). Nevertheless, approximately 40% of all identified GNPTAB missense mutations were found in severely affected patients with MLII (Velho et al., 2019).

The GlcNAc-1-phosphotransferase is a hexameric complex consisting of two  $\alpha$ -, two  $\beta$ -, and two  $\gamma$ -subunits (Bao, Elmendorf, Booth, Drake, & Canfield, 1996). The  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits that are synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) as common  $\alpha/\beta$ -precursor membrane protein assemble with the soluble  $\gamma$ -subunits to an inactive complex. Cytosolic sorting motifs of the  $\alpha/\beta$ -precursor mediate its subsequent transport from the ER to the Golgi apparatus (Franke, Braulke, & Storch, 2013). In the Golgi apparatus, the  $\alpha/\beta$ -precursor is proteolytically cleaved between Lys<sup>928</sup> and Asp<sup>929</sup> by site-1 protease (S1P) into the enzymatically active  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits (Figure 1a; Marschner, Kollmann, Schweizer, Braulke, & Pohl, 2011). We and others have previously shown that binding of the  $\gamma$ -subunit to the  $\alpha$ -subunit enhances the GlcNAc-1-phosphotransferase activity for M6P modification of specific lysosomal enzymes (De Pace et al., 2015; Di Lorenzo et al., 2018; Qian et al., 2010).

For catalytic reaction, the GlcNAc-1-phosphotransferase complex has to exhibit binding sites for the substrates UDP-GlcNAc (phosphate donor) and lysosomal enzymes (phosphate acceptors). Following the transfer of GlcNAc-1-phosphate from the UDP-GlcNAc to the high-mannose-type oligosaccharides on lysosomal enzymes, an  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase catalyzes the hydrolysis of the GlcNAc residues, thus exposing the M6P signal

(Pohl, Marschner, Storch, & Braulke, 2009; Reitman, Varki, & Kornfeld, 1981).

The binding site for lysosomal enzymes was found to be located in the luminal Notch repeat-like domains and DNA methyltransferase-associated protein domain of the  $\alpha$ -subunit (Qian et al., 2015; Qian, Flanagan-Steet, van Meel, Steet, & Kornfeld, 2013; van Meel et al., 2016). The  $\alpha$ - and the  $\beta$ -subunit both contain two so-called stealth conserved regions: CR1 and CR2 in the  $\alpha$ -subunit and CR3 and CR4 in the  $\beta$ -subunit (Figure 1a). Stealth domains were found in a number of bacterial hexose-1-phosphotransferases involved in the biosynthesis of  $\alpha$ -1,4-linked GlcNAc-1-phosphate in capsule polysaccharides (Muindi et al., 2014; Sperisen, Schmid, Bucher, & Zilian, 2005; Tzeng, Noble, & Stephens, 2003), suggesting that the stealth domains harbor the UDP-GlcNAc binding site. Interestingly, amino acid substitutions in the stealth domains of GlcNAc-1-phosphotransferase represent the majority of all missense mutations in patients with MLII and MLIII alpha/beta (Velho et al., 2019). Functional analyses of selected GNPTAB missense mutations in the stealth domains revealed reduced or absent GlcNAc-1-phosphotransferase activity, which was not caused by impaired ER-Golgi transport and/or proteolytic activation of the  $\alpha/\beta$ -precursor (De Pace et al., 2014; Ludwig et al., 2017; Qian et al., 2015; Velho et al., 2015).

To analyze the role of the stealth conserved regions for catalytic activity of GlcNAc-1-phosphotransferase in more detail, first we selected 40 members of the phosphotransferase family from yeast and bacteria, which comprise at least one stealth conserved region (Figure 1b; Table S1), and performed alignment of their amino acid sequences against each of the known stealth conserved regions within the GlcNAc-1-phosphotransferase  $\alpha/\beta$ -precursor. We identified a number of amino acid residues that are fully or highly conserved between the given phosphotransferases, including Pro<sup>355</sup>, Trp<sup>357</sup>, Leu<sup>358</sup>, Leu<sup>380</sup>, Pro<sup>381</sup>, Glu<sup>389</sup>, Ile<sup>392</sup>/Leu<sup>395</sup>/Leu<sup>398</sup>, Ile/Leu<sup>398</sup>, the Asn<sup>406</sup>-Asp<sup>407</sup>Asp<sup>408</sup> motif, and Phe<sup>420</sup> in the CR2 domain as well as His<sup>956</sup> and Arg<sup>986</sup> in the CR3 domain (Figure 1b, indicated by red asterisks or plus signs below the alignment). Whereas the Trp<sup>357</sup>, Leu<sup>358</sup>, Leu<sup>380</sup>, Ile<sup>392</sup>, Ile<sup>395</sup>, Leu<sup>398</sup>, and Phe<sup>420</sup> residues in the CR2 domain may be crucial for intermolecular and/or intramolecular hydrophobic interactions of GlcNAc-1-phosphotransferase, the conformation of Pro<sup>355</sup> and Pro<sup>381</sup> may stabilize the molecular structure of the enzyme and, in particular, of the CR2 domain (Dill, 1990). Most importantly, among conserved residues within the stealth domains, missense mutations leading to amino acid substitutions of Glu<sup>389</sup>, Asp<sup>408</sup>, His<sup>956</sup>, and Arg<sup>986</sup> have been identified in individuals affected by MLII and MLIII alpha/beta,

**FIGURE 1** Multiple sequence alignment of stealth domain-containing phosphotransferases. (a) Schematic representation of the GNPTAB-encoded  $\alpha/\beta$ -precursor. The luminal domain flanked by the C- and N-terminal domains (black boxes) comprises four stealth conserved regions, CR1 and CR2 in the  $\alpha$ -subunit and CR3 and CR4 in the  $\beta$ -subunit. The cleavage site of site-1 protease (S1P), which generates the mature  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunit, is indicated. (b) Multiple sequence alignments of the four stealth conserved regions CR1 (amino acids 73–87), CR2 (amino acids 322–421), CR3 (amino acids 955–1003), CR4 (1148–1185) of the  $\alpha/\beta$ -precursor (GNPTAB) of GlcNAc-1-phosphotransferase and a set of 40 selected phosphotransferases are shown. For each sequence, the UniProt accession number and the gene name are given. The alignment was performed using the Clustal alignment program and visualized with the Jalview graphical tool. Each residue is assigned a color according to the default Clustal alignment criteria. The conservation rate is shown for each residue, and the fully conserved (\*) and highly conserved (+) residues are indicated. The numbers of the amino acid residues omitted are indicated in square brackets. N/A: gene not available

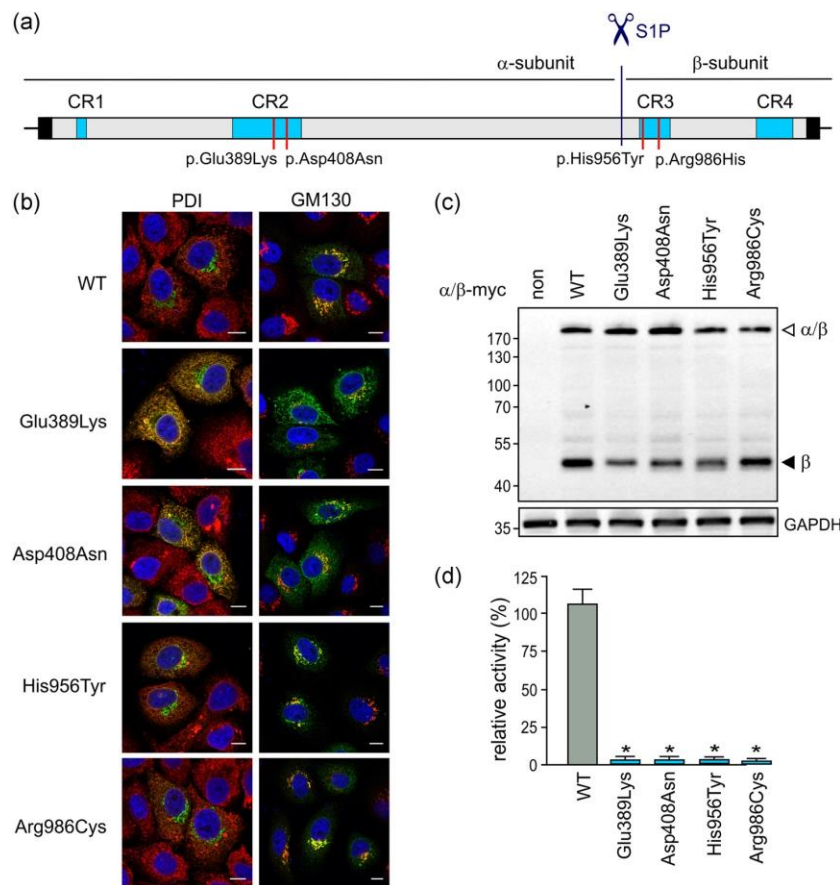


FIGURE 2 Functional analysis of GlcNAc-1-phosphotransferase carrying GNPTAB missense mutations in the stealth domains. (a) Schematic representation of the GNPTAB-encoded  $\alpha/\beta$ -precursor (similar to Figure 1a). The locations of the missense mutations in the stealth domains CR2 and CR3 studied here are marked in red. (b) HeLa cells overexpressing wild-type (WT) or mutant p.Glu389Lys, p.Asp408Asn, p.His956Tyr, and p.Arg986Cys  $\alpha/\beta$ -precursors were fixed and stained with monoclonal antibodies against the  $\alpha$ -subunit (green), the cis-Golgi marker protein GM130 (red) or the ER marker protein PDI (red). Nuclei were visualized by 4',6-diamidino-2-phenylindole staining (blue). Yellow indicates colocalization. Scale bar: 10  $\mu$ m. (c) Extracts of HEK-293 cells overexpressing WT or the indicated mutant  $\alpha/\beta$ -precursors were analyzed by anti-myc western blot detecting  $\alpha/\beta$ -precursors ( $\alpha/\beta$ ) and  $\beta$ -subunits ( $\beta$ ). GAPDH and extracts of nontransfected cells were used as loading and negative control, respectively. The positions of molecular mass marker proteins in kDa are indicated. (d) GlcNAc-1-phosphotransferase activity in extracts of HEK-293 cells overexpressing WT or indicated mutant  $\alpha/\beta$ -precursors was measured using UDP-[ $^3$ H]GlcNAc as phosphate donor and  $\alpha$ -methylmannoside as phosphate acceptor for 60 min at 37°C. The activity of WT overexpressing cells was set to 100%. Data are average values of three independent experiments, and error bars represent SD. \*p < .05. PDI, protein disulfide isomerase

that is, p.Glu389Lys (Velho et al., 2019), p.Asp408Asn (Wang et al., 2018), p.His956Tyr (Otomo et al., 2009), p.His956Arg (Cathey et al., 2010), p.Arg986Cys (Cobos, Steglich, Santer, Lukacs, & Gal, 2015; Coutinho et al., 2012), p.Arg986Gly (Velho et al., 2019), and p.Arg986His (Mistri et al., 2018). The clinical description and the molecular analysis of the patient with severe MLIH harboring the homozygous mutation p.Glu389Lys (Velho et al., 2019) have become available and are presented here for the first time (Supporting Information). In addition, all used in silico pathogenicity prediction programs, including CADD, REVEL, and M-CAP (Ioannidis et al., 2016; Jagadeesh et al., 2016; Kircher et al., 2014), predict each of the abovementioned variants to have a deleterious effect (Table S2). The data suggest an essential role

of these amino acids for the function of GlcNAc-1-phosphotransferase.

Amino acid substitutions in the  $\alpha/\beta$ -precursor may impair the transport of the newly synthesized  $\alpha/\beta$ -precursor protein from the ER to the Golgi apparatus, the proteolytic activation by S1P, or the substrate binding and subsequent catalytic reaction of GlcNAc-1-phosphotransferase. Therefore, to assess molecular consequences of GNPTAB missense mutations, a comprehensive functional analysis of the mutant enzyme is necessary. Whereas the missense mutations p.His956Tyr and p.Arg986Cys have been analyzed in previous studies (De Pace et al., 2014; Qian et al., 2015; Velho et al., 2019), functional analyses of the recently

identified mutations p.Glu389Lys and p.Asp408Asn have been performed for the first time in this study. To adequately support the hypothesis that we raised based on the in silico sequence alignment, the in vitro data obtained for all the four missense mutations are shown side by side for better presentation (Figure 2). Briefly (for details, see the online Supporting Information), the missense mutations were individually introduced into the wild-type (WT) complementary DNA of a human  $\alpha/\beta$ -precursor construct by site-directed mutagenesis (Figure 2a). For the analysis of the subcellular localization of the mutants, we performed immunofluorescence microscopy of transfected HeLa cells using a generated monoclonal antibody against the  $\alpha$ -subunit (De Pace et al., 2014) and organelle-specific marker proteins. In agreement with previously published data, the WT  $\alpha/\beta$ -precursor as well as the p.His956Tyr and p.Arg986Cys mutants were found to colocalize with the cis-Golgi marker protein GM130 (Figure 2b; De Pace et al., 2014; Qian et al., 2015). Similarly, the hitherto noncharacterized p.Glu389Lys and p.Asp408Asn mutants can also exit the ER and reach the cis-Golgi apparatus (Figure 2b). Of note, a portion of both p.Glu389Lys and p.Asp408Asn mutant proteins was localized in the ER, as revealed by costaining with the ER marker protein disulfide isomerase (Figure 2b). In line with the localization of the mutants in the cis-Golgi apparatus, 190-kDa  $\alpha/\beta$ -precursors and 45-kDa  $\beta$ -subunits were detectable in HEK-293 cell extracts overexpressing the WT or the mutant proteins (Figure 2c), demonstrating proper cleavage by S1P required for GlcNAc-1-phosphotransferase activity. Finally, the in vitro GlcNAc-1-phosphotransferase activity was measured in extracts of HEK-293 cells overexpressing the WT or the mutant  $\alpha/\beta$ precursors using [<sup>3</sup>H]UDP-GlcNAc and  $\alpha$ -methylmannoside as phosphate donor and acceptor, respectively (Qian et al., 2015; Velho et al., 2015). All the mutants exhibited less than 5% of WT GlcNAc-1-phosphotransferase activity (Figure 2d). In summary, these data clearly demonstrate that amino acid substitutions of the conserved Glu<sup>389</sup>, Asp<sup>408</sup>, His<sup>956</sup>, and Arg<sup>986</sup> residues do not abolish the intracellular transport to the Golgi apparatus and the subsequent S1P-mediated cleavage of the  $\alpha/\beta$ -precursors, but they do lead to a drastic reduction of the GlcNAc-1-phosphotransferase activity.

Based on the previously obtained and newly generated data, we hypothesize that the conserved Glu<sup>389</sup>, Asp<sup>408</sup>, His<sup>956</sup>, and Arg<sup>986</sup> residues, which are located in the stealth domains CR2 and CR3 of GlcNAc-1-phosphotransferase and are related to MLII and MLIII alpha/beta, play a pivotal role in the UDP-GlcNAc binding and/or may be directly involved in the GlcNAc-1-phosphotransferase-mediated catalysis. It has previously been published that the mutant GlcNAc-1-phosphotransferase  $\alpha/\beta$ precursor that does not undergo cleavage by S1P is inactive (Marschner et al., 2011), indicating that both  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits mediate catalytic function of the active complex. Intriguingly, the identified conserved residues in GlcNAc-1-phosphotransferase are located on the opposite sides of the S1P cleavage site; Glu<sup>389</sup> and Asp<sup>408</sup> reside in the CR2 domain of the  $\alpha$ -subunit whereas His<sup>956</sup> and Arg<sup>986</sup> are found in the CR3 domain of the  $\beta$ -subunit (Figure 2a). It is thus tempting to speculate that following S1P cleavage of the GlcNAc-1-phosphotransferase  $\alpha/\beta$ -precursor and assembly of the active complex, these four residues may appear proximate enough to drive catalysis. According to the EzCatDB database

(<http://ezcatdb.cbrc.jp>), residues that are most frequently found to be catalytic in transferases responsible for the transfer of nucleotidyl and phosphorous-containing groups include arginine, lysine, aspartic acid and, to a lesser extent, histidine and serine. In addition, aspartic and glutamic acid residues may also play a role in binding divalent ions, such as Mg<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>, which are strictly required for GlcNAc-1-phosphotransferase activity (Bao et al., 1996). Although the conserved residues Glu<sup>389</sup>, Asp<sup>408</sup>, His<sup>956</sup>, and Arg<sup>986</sup> are likely directly involved in GlcNAc-1-phosphotransferase catalysis, the exact mechanism of the catalytic reaction mediated by GlcNAc-1-phosphotransferase remains unknown due to lack of data on the tertiary structure of the enzyme. Therefore, further in-depth investigation of the enzyme catalysis demands structural analysis of either the whole GlcNAc-1-phosphotransferase protein complex or other stealth domaincontaining phosphotransferases, as knowledge of the structure and biochemistry of these enzymes will help us to better understand the pathogenesis of MLII and MLIII.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the patient and her parents for their support in this study. The authors would also like to thank Inka Jantke, Johannes Brand, and Elif Yilmaz for excellent technical assistance, Kerstin Kutsche for financial support as well as the Microscopy Imaging Facility and the Isotope Lab Facility of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf for technical support. This study was funded by Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation, SFB877-B3, PO 1539/1-1, KU 1240/10-1) and the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

#### CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflict of interests.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

All mentioned mutations are included in the Leiden Open Variant Database (Fokkema et al., 2011): <https://databases.lovd.nl/shared/configuration/GNPTAB>. All raw data are available upon request.

#### ETHICS STATEMENT

All procedures carried out with human subjects were in compliance with the Helsinki Declaration. The clinical data presented in this study were retrieved from the routine clinical care facilities of

Cerrahpasa School of Medicine, Istanbul, Turkey. Written informed consent was obtained from the parents of the affected child.

ORCID

Sandra Pohl  <http://orcid.org/0000-0001-7409-7042>

## REFERENCES

- Bao, M., Elmendorf, B. J., Booth, J. L., Drake, R. R., & Canfield, W. M. (1996). Bovine UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal-enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase: II. Enzymatic characterization and identification of the catalytic subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 271(49), 31446–31451.
- Braulke, T., & Bonifacio, J. S. (2009). Sorting of lysosomal proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(4), 605–614.
- Cathey, S. S., Kudo, M., Tiede, S., Raas-Rothschild, A., Braulke, T., Beck, M., ... McKusick, V. A. (2008). Molecular order in mucopolipidosis II and III nomenclature. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 146A(4), 512–513.
- Cathey, S. S., Leroy, J. G., Wood, T., Eaves, K., Simensen, R. J., Kudo, M., ... Friez, M. J. (2010). Phenotype and genotype in mucopolipidoses II and III alpha/beta: A study of 61 probands. *Journal of Medical Genetics*, 47(1), 38–48.
- Coutinho, M. F., Santos, L. S., Girisha, K. M., Satyamoorthy, K., Lacerda, L., Prata, M. J., & Alves, S. (2012). Mucopolipidosis type II  $\alpha/\beta$  with a homozygous missense mutation in the GNPTAB gene. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 158A(5), 1225–1228.
- Cobos, P. N., Steglich, C., Santer, R., Lukacs, Z., & Gal, A. (2015). Dried blood spots allow targeted screening to diagnose mucopolysaccharidosis and mucopolipidosis. *JIMD Reports*, 15, 123–132.
- De Pace, R., Coutinho, M. F., Koch-Nolte, F., Haag, F., Prata, M. J., Alves, S., ... Pohl, S. (2014). Mucopolipidosis II-related mutations inhibit the exit from the endoplasmic reticulum and proteolytic cleavage of GlcNAc1-phosphotransferase precursor protein (GNPTAB). *Human Mutation*, 35(3), 368–376.
- De Pace, R., Velho, R. V., Encarnaçao, M., Marschner, K., Braulke, T., & Pohl, S. (2015). Subunit interactions of the disease-related hexameric GlcNAc-1-phosphotransferase complex. *Human Molecular Genetics*, 24(23), 6826–6835.
- Di Lorenzo, G., Velho, R. V., Winter, D., Thelen, M., Ahmadi, S., Schweizer, M., ... Pohl, S. (2018). Lysosomal proteome and secretome analysis identifies missorted enzymes and their non-degraded substrates in mucopolipidosis III mouse cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, 17(8), 1612–1626.
- Dill, K. A. (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, 29(31), 7133–7155.
- Fokkema, I. F. A. C., Taschner, P. E. M., Schaafsma, G. C. P., Celli, J., Laros, J. F. J., & den Dunnen, J. T. (2011). LOVD v.2.0: The next generation in gene variant databases. *Human Mutation*, 32(5), 557–563. Retrieved from <https://databases.lovd.nl/shared/configuration/GNPTAB>
- Franke, M., Braulke, T., & Storch, S. (2013). Transport of the GlcNAc-1-phosphotransferase  $\alpha/\beta$ -subunit precursor protein to the Golgi apparatus requires a combinatorial sorting motif. *Journal of Biological Chemistry*, 288(2), 1238–1249.
- Ioannidis, N. M., Rothstein, J. H., Pejaver, V., Middelton, S., McDonnell, S. K., Baheti, S., ... Sieh, W. (2016). REVEL: An ensemble method for predicting the pathogenicity of rare missense variants. *The American Journal of Human Genetics*, 99(4), 877–885.
- Jagadeesh, K. A., Wenger, A. M., Berger, M. J., Guturu, H., Stenson, P. D., Cooper, D. N., ... Bejerano, G. (2016). M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity. *Nature Genetics*, 48(12), 1581–1586.
- Kircher, M., Witten, D. M., Jain, P., O’Roak, B. J., Cooper, G. M., & Shendure, J. (2014). A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nature Genetics*, 46(3), 310–315.
- Kollmann, K., Pohl, S., Marschner, K., Encarnaçao, M., Sakwa, I., Tiede, S., ... Braulke, T. (2010). Mannose phosphorylation in health and disease. *European Journal of Cell Biology*, 89(1), 117–123.
- Ludwig, N. F., Velho, R. V., Sperb-Ludwig, F., Acosta, A. X., Ribeiro, E. M., Kim, C. A., ... Schwartz, I. V. D. (2017). GNPTAB missense mutations cause loss of GlcNAc-1-phosphotransferase activity in mucopolipidosis type II through distinct mechanisms. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 92, 90–94.
- Marschner, K., Kollmann, K., Schweizer, M., Braulke, T., & Pohl, S. (2011). A key enzyme in the biogenesis of lysosomes is a protease that regulates cholesterol metabolism. *Science*, 333(6038), 87–90.
- Mistri, M. A., Dalal, A., Nath, P., Nampoothiri, S., Mehta, S., Singh, A., ... Sheth, J. (2018). Identification of novel and known mutation in 19 patients with mucopolipidosis type II and III from India and validation of novel method of screening for mucopolipidosis-II and III screening. *Molecular Genetics and Metabolism*, 123(2), S96.
- Muindi, K. M., McCarthy, P. C., Wang, T., Vionnet, J., Battistel, M., Jankowska, E., & Vann, W. F. (2014). Characterization of the meningococcal serogroup X capsule N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. *Glycobiology*, 24(2), 139–149.
- Otomo, T., Muramatsu, T., Yorifuji, T., Okuyama, T., Nakabayashi, H., Fukao, T., ... Sakai, N. (2009). Mucopolipidosis II and III alpha/beta: Mutation analysis of 40 Japanese patients showed genotype-phenotype correlation. *Journal of Human Genetics*, 54(3), 145–151.
- Pohl, S., Marschner, K., Storch, S., & Braulke, T. (2009). Glycosylation and phosphorylation-dependent intracellular transport of lysosomal hydrolases. *Biological Chemistry*, 390(7), 521–527.
- Qian, Y., Lee, I., Lee, W. S., Qian, M., Kudo, M., Canfield, W. M., ... Kornfeld, S. (2010). Functions of the  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  subunits of UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 285(5), 3360–3370.
- Qian, Y., Flanagan-Steet, H., van Meel, E., Steet, R., & Kornfeld, S. A. (2013). The DMAP interaction domain of UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase is a substrate recognition module. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(25), 10246–10251.
- Qian, Y., van Meel, E., Flanagan-Steet, H., Yox, A., Steet, R., & Kornfeld, S. (2015). Analysis of mucopolipidosis II/III GNPTAB missense mutations identifies domains of UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme GlcNAc-1-phosphotransferase involved in catalytic function and lysosomal enzyme recognition. *Journal of Biological Chemistry*, 290(5), 3045–3056.
- Reitman, M. L., Varki, A., & Kornfeld, S. (1981). Fibroblasts from patients with I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy are deficient in uridine 5'-diphosphate-N-acetylglucosamine: Glycoprotein N-acetylglucosaminylphosphotransferase activity. *Journal of Clinical Investigation*, 67(5), 1574–1579.
- Sperisen, P., Schmid, C. D., Bucher, P., & Zilian, O. (2005). Stealth proteins: In silico identification of a novel protein family rendering bacterial pathogens invisible to host immune defense. *PLoS Computational Biology*, 1(6), e63.
- Tiede, S., Storch, S., Lübke, T., Henrissat, B., Bargal, R., Raas-Rothschild, A., & Braulke, T. (2005). Mucopolipidosis II is caused by mutations in GNPTA encoding the  $\alpha/\beta$  GlcNAc-1-phosphotransferase. *Nature Medicine*, 11(10), 1109–1112.
- Tzeng, Y.-L., Noble, C., & Stephens, D. S. (2003). Genetic basis for biosynthesis of the (1 $\rightarrow$ 4)-linked N-acetyl-D-glucosamine 1-phosphate capsule of *Neisseria meningitidis* serogroup X. *Infection and Immunity*, 71(12), 6712–6720.
- van Meel, E., Lee, W. S., Liu, L., Qian, Y., Doray, B., & Kornfeld, S. (2016). Multiple domains of GlcNAc-1-phosphotransferase mediate recognition of lysosomal enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 291(15), 8295–8307.

- Velho, R. V., De Pace, R., Klünder, S., Sperb-Ludwig, F., Lourenco, C. M., Schwartz, I. V. D., ... Pohl, S. (2015). Analyses of disease-related GNPTAB mutations define a novel GlcNAc-1-phosphotransferase interaction domain and an alternative site-1 protease cleavage site. *Human Molecular Genetics*, 24(12), 3497–3505.
- Velho, R. V., Harms, F. L., Danyukova, T., Ludwig, N. F., Friez, M. J., Cathey, S. S., ... Pohl, S. (2019). The lysosomal storage disorders mucopolipidosis type II, type III alpha/beta and type III gamma: Update on GNPTAB and GNPTG mutations. *Human Mutation*, 40(7), 842–864.
- Wang, Y., Ye, J., Qiu, W. J., Han, L. S., Gao, X. L., Liang, L., ... Zhang, H. W. (2018). Identification of predominant GNPTAB gene mutations in Eastern Chinese patients with mucopolipidosis II/III and a prenatal diagnosis of mucopolipidosis II. *Acta Pharmacologica Sinica*, 40, 279–287.
- <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0023-9>

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Danyukova T, Ludwig NF, Velho RV, et al. Combined in vitro and in silico analyses of missense mutations in GNPTAB provide new insights into the molecular bases of mucopolipidosis II and III alpha/beta. *Human Mutation*. 2019;1–7. <https://doi.org/10.1002/humu.23928>



**Capítulo 2** – *GNPTAB* missense mutations cause loss of GlcNAc-1-phosphotransferase activity in mucopolidosis type II through distinct mechanisms

Citação:

**Ludwig, Nataniel Floriano**, Renata Voltolini Velho, Fernanda Sperb-Ludwig, Angelina Xavier Acosta, Erlane Marques Ribeiro, Chong A. Kim, Dafne Dain Gandelman Horovitz, Raquel Boy, Maria Juliana Rodovalho-Doriqui, Charles Marques Lourenço, Emerson Santana Santos, Thomas Braulke, Sandra Pohl, and Ida Vanessa D. Schwartz. 2017. “*GNPTAB* Missense Mutations Cause Loss of GlcNAc-1-Phosphotransferase Activity in Mucopolidosis Type II through Distinct Mechanisms.” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 92:90–94.

Acesso versão digital disponível no QR Code





Contents lists available at ScienceDirect

# International Journal of Biochemistry and Cell Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biociel](http://www.elsevier.com/locate/biociel)

Short communication

## GNPTAB missense mutations cause loss of GlcNAc-1-phosphotransferase activity in mucopolipidosis type II through distinct mechanisms



Nataníel Floriano Ludwig<sup>a,b,c,1</sup>, Renata Voltolini Velho<sup>d,1</sup>, Fernanda Sperb-Ludwig<sup>a,b,c</sup>, Angelina Xavier Acosta<sup>e</sup>, Erlane Marques Ribeiro<sup>f</sup>, Chong A. Kim<sup>g</sup>, Dafne Dain Gandelman Horowitz<sup>h</sup>, Raquel Boy<sup>i</sup>, Maria Juliana Rodovalho-Doriqui<sup>j</sup>, Charles Marques Lourenço<sup>k</sup>, Emerson Santana Santos<sup>l</sup>, Thomas Bräulke<sup>d</sup>, Sandra Pohl<sup>d,\*,\*,2</sup>, Ida Vanessa D. Schwartz<sup>b,c,m,\*,2</sup>

<sup>a</sup> Center of Gene Therapy, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil<sup>b</sup> BRAIN Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil<sup>c</sup> Post Graduate Program in Genetics and Molecular Biology of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil<sup>d</sup> Section Biochemistry, Children's Hospital, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany<sup>e</sup> Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil<sup>f</sup> Faculdade de Medicina do Centro Universitário Christus, Fortaleza, Brazil<sup>g</sup> Genetics Unit, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil<sup>h</sup> National Institute for Women's, Children's and Adolescents' Health Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil<sup>i</sup> Pediatrics Department, Hospital Universitário Pedro Ernesto, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil<sup>j</sup> Juvêncio Mattos Children's Hospital, São Luís, Maranhão, Brazil<sup>k</sup> Ribeirão Preto Clinics Hospital, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil<sup>l</sup> Universidade Federal de Sergipe, Lagarto, Brazil<sup>m</sup> Medical Genetics Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Lysosomal storage disorder  
Mannose 6-phosphate  
Genotype-phenotype relation  
Missense mutations  
Site-1 protease

## ABSTRACT

Mucopolipidoses (ML) II and III alpha/beta are lysosomal storage diseases caused by pathogenic mutations in *GNPTAB* encoding the  $\alpha/\beta$ -subunit precursor of GlcNAc-1-phosphotransferase. To determine genotype-phenotype correlation and functional analysis of mutant GlcNAc-1-phosphotransferase, 13 Brazilian patients clinically and biochemically diagnosed for MLI or III alpha/beta were studied. By sequencing of genomic *GNPTAB* of the MLI and MLI alpha/beta patients we identified six novel mutations: p.D76G, p.S385L, p.Q278Kfs\*3, p.H588Qfs\*27, p.N642Lfs\*10 and p.Y1111\*. Expression analysis by western blotting and immunofluorescence microscopy revealed that the mutant  $\alpha/\beta$ -subunit precursor p.D76G is retained in the endoplasmic reticulum whereas the mutant p.S385L is correctly transported to the *cis*-Golgi apparatus and proteolytically processed. Both mutations lead to complete loss of GlcNAc-1-phosphotransferase activity, consistent with the severe clinical MLI phenotype of the patients. Our study expands the genotypic spectrum of MLI and provides novel insights into structural requirements to ensure GlcNAc-1-phosphotransferase activity.

## 1. Introduction

Lysosomes are responsible for the degradation of several types of macromolecules by more than 70 different lysosomal enzymes. The correct receptor-mediated transport of newly synthesized lysosomal

enzymes to lysosomes depends on mannose 6-phosphate (M6P) residues which are generated in the Golgi apparatus by two enzymes. First, N-acetylglucosamine (GlcNAc)-1-phosphotransferase catalyzes the transfer of GlcNAc-1-phosphate to selected mannose residues on lysosomal enzymes. In a second step, the masking GlcNAc is removed by an

**Abbreviations:** ER, endoplasmic reticulum; HEK, human embryonic kidney; M6P, mannose 6-phosphate; ML, mucopolipidosis; GlcNAc, N-acetylglucosamine; PNGase F, peptide-N-glycosidase F; PDI, protein disulfide isomerase; SIP, site-1 protease; WT, wild-type

\* Corresponding author at: Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, 90035–003 Porto Alegre, Brazil.

\*\* Corresponding author at: Section Biochemistry, Children's Hospital, University Medical Center Hamburg–Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany.

E-mail addresses: [s.pohl@uke.de](mailto:s.pohl@uke.de) (S. Pohl), [ischwartz@hcpa.edu.br](mailto:ischwartz@hcpa.edu.br) (I.V.D. Schwartz).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this study.

<sup>2</sup> Corresponding authors contributed equally to this study.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biociel.2017.09.006>

Received 25 August 2017; Accepted 12 September 2017

Available online 14 September 2017

1357-2725/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

$\alpha$ -N-acetylglucosaminidase exposing the M6P residues (Pohl et al., 2009). The GlcNAc-1-phosphotransferase is a hexameric complex consisting of two  $\alpha$ -, two  $\beta$ - and two  $\gamma$ -subunits (Bao et al., 1996). The  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits are synthesized as a common membrane-bound  $\alpha/\beta$ -subunit precursor protein of 1256 amino acids encoded by the *GNPTAB* gene located on chromosome 12q23.3 (Kudo et al., 2005; Tiede et al., 2005). The soluble  $\gamma$ -subunits are composed by 305 amino acids and is encoded by the *GNPTG* gene located on chromosome 16p13.3 (Raas-Rothschild et al., 2000). After synthesis of the  $\alpha/\beta$ -subunit precursors and  $\gamma$ -subunits their assembly takes place in the endoplasmic reticulum (ER) in parallel with the homodimerization of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -subunits involving the cysteine residues C70 and C245, respectively (Encarnação et al., 2011; De Pace et al., 2015). The inactive GlcNAc-1-phosphotransferase complex is transported to the *cis*-Golgi apparatus mediated by a combinatorial cytoplasmic sorting motif composed of an N-terminal dileucine signal (LL) and a C-terminal dibasic motif (RIR) of the  $\alpha/\beta$ -subunit precursor protein (Franke et al., 2013). Upon arrival in the *cis*-Golgi apparatus, the  $\alpha/\beta$ -subunit precursor is proteolytically cleaved between amino acids K928 and D929 into the mature  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits by the site-1 protease (S1P), which is essential for activation of the GlcNAc-1-phosphotransferase (Marschner et al., 2011).

Pathogenic alterations in *GNPTAB* associated with a complete loss or reduction of GlcNAc-1-phosphotransferase activity cause the autosomal recessive lysosomal storage disorders mucopolidiosis II (MLII; MIM #252500) and MLIII alpha/beta (MIM #252600), respectively (Cathey et al., 2008). In MLII and MLIII alpha/beta patients no or reduced amounts of M6P residues are present on lysosomal enzymes, respectively, leading to their hypersecretion to the extracellular compartment. As a consequence of lysosomal enzyme missorting and intracellular deficiency, non-degraded material accumulates in dysfunctional lysosomes disturbing the function of various cell types and tissues (Braulke et al., 2013). MLII is a severe and progressive disease with death occurring usually in the first decade of life. Patients are characterized by developmental delay, psychomotor retardation, skeletal abnormalities, short stature, coarse facial features, organomegaly and cardiorespiratory problems. MLIII alpha/beta patients mostly carry missense mutations that are not related to complete loss of GlcNAc-1-phosphotransferase activity. Their late onset clinical symptoms result in a less severe and progressive course than in MLII, which enables survival into adulthood (Braulke et al., 2013). To date 142 pathogenic mutations in *GNPTAB* that cause MLII and MLIII alpha/beta are listed in The Human Gene Mutation Database (Stenson et al., 2017). Almost all MLII patients carry nonsense, frameshift or splicing alterations in *GNPTAB*. Here, we expand the spectrum of MLII-causing mutations by the identification of six novel pathogenic *GNPTAB* alterations in Brazilian MLII patients. Moreover, the molecular and biochemical analysis of mutant  $\alpha/\beta$ -subunit precursors reveal that the luminal missense mutations p.D76G and p.S385L result in complete loss of GlcNAc-1-phosphotransferase activity by different mechanisms responsible for the severe course of the disease.

## 2. Methods

### 2.1. Molecular analysis of the patients

Thirteen unrelated Brazilian patients clinically diagnosed for MLII or MLIII alpha/beta were genetically analyzed in this study (Table 1). The rate of parental consanguinity was 3/13. Two patients already reported in a previous study (Cury et al., 2013) were included due to their final diagnosis during the present study (Patients 3 and 6, Table 1).

Genomic DNA was extracted from blood samples using Easy-DNA purification kit (Thermo Fisher Scientific). *GNPTAB* gene amplification was performed as previously described (Cury et al., 2013). Samples were submitted to automated DNA sequencing in two independent experiments performed on an ABI Prism 3500 Genetic Analyzer

(Applied Biosystems). The *GNPTAB* gene sequence used as reference was GenBank accession no. NM\_024312.4. Mutation nomenclature follows the HSVG rules. The novel missense mutations were investigated in 200 controls alleles from random samples of blood bank donors by DNA sequencing (c.227A > G) or by restriction enzyme analysis (c.1154C > T).

### 2.2. Generation of mutant *GNPTAB* cDNA constructs

The pathogenic *GNPTAB* mutations c.227A > G (p.D76G) and c.1154C > T (p.S385L) were inserted into the wild-type *GNPTAB* full-length cDNA construct (Marschner et al., 2011) by site-directed mutagenesis using mutagenic primers (p.D76G for-CCCATGCCGATTGGCG-TTGTTTACACC, rev-GG TGTAACAACGCAATCGGCATGGG; p.S385L for-CTTGCCTACCTTTAGTTTACCT GCTATTGAAAGTC, rev-GACTTTC-AATAGCAGGTAACCTAAAGGTAGGCAAG) and Phusion<sup>®</sup> polymerase (Thermo Fisher Scientific). Mutagenic primers were designed using the web-based program PrimerX ([www.bioinformatics.org/primerx](http://www.bioinformatics.org/primerx)). The generation of the *GNPTAB* mutant c.3503\_3504delTC (p.L1168Qfs\*5) was described previously (De Pace et al., 2014). The plasmid DNAs were commercially sequenced to confirm proper introduction of the mutations (SeqLab, Germany).

### 2.3. Cell culture and transient cDNA transfection

Human embryonic kidney (HEK)-293 and HeLa cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, GlutaMAX<sup>™</sup> and penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Cells grown on 6-cm plates or on glass cover slips were transiently transfected with wild-type or mutant *GNPTAB* cDNAs using JetPEI<sup>®</sup> (Peqlab) reagent according to the manufacturer instructions and used for further analyses 24 h after transfection.

### 2.4. Biochemical analysis

Preparation of transfected HEK-293 cell extracts, enzymatic deglycosylation of proteins, SDS-PAGE followed by western blot analysis and confocal immunofluorescence microscopy of transfected HeLa cells were performed as described (De Pace et al., 2014). GlcNAc-1-phosphotransferase activity in transfected HEK-293 cell extracts using UDP-[<sup>3</sup>H]GlcNAc and  $\alpha$ -methylmannoside as substrates was measured as reported recently (Velho et al., 2015). Results are expressed as means  $\pm$  SD. Differences between mean values are determined using the Student's *t*-test. \*P values < 0.001 were considered significant.

## 3. Results

The clinical diagnosis of all MLII and III alpha/beta patients studied was biochemically confirmed by measurement of several lysosomal enzymes activities in plasma or dried blood demonstrating a 5- to 20-fold increase from normal mean (data not shown). Of note, MLII is distinguished from MLIII alpha/beta on the basis of the clinical severity and time of first symptoms and not on the basis of lysosomal enzyme activities (Braulke et al., 2013).

For genetic diagnostic confirmation, we sequenced the *GNPTAB* gene in all affected patients and identified 12 pathogenic *GNPTAB* mutations in both homozygous and heterozygous states including five frameshift mutations (p.Q278Kfs\*3, p.H588Qfs\*27, p.N642Lfs\*10, p.N750Kfs\*8 and p.L1168Qfs\*5), two nonsense mutations (p.Q278\* and p.Y1111\*) and five missense mutations (p.D76G, p.W81L, p.S385L, p.I403T and p.C505Y) (Table 1). The most common mutation in this study was p.L1168Qfs\*5 identified in 38% of alleles. Among the five patients with a less progressive course of the MLIII alpha/beta disease compound heterozygous *GNPTAB* mutations have been identified in whom one mutant allele carry p.N750Kfs\*8, p.Q278\* or the most common alteration p.L1168Qfs\*5. Although these frameshift and

**Table 1**  
Pathogenic *GNPTAB* mutations identified in 13 Brazilian MLII and MLIII alpha/beta patients.

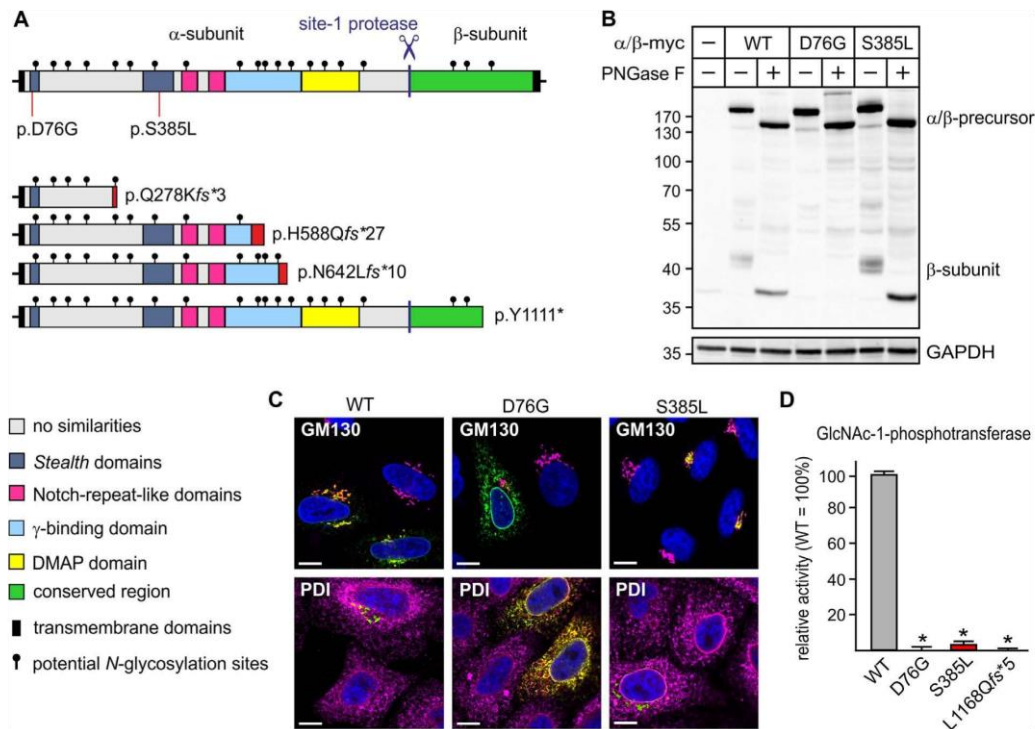
Patient	Phenotype (Sex)	Age in years at diagnosis (at death)	State	Genotype (allele 1/allele 2)	
				cDNA	Protein
1	MLIII (F)	21.3 (alive)	Bahia	c.3503_3504delTC/c.1208T > C	p.L1168Qfs*5/p.I403T
2	MLIII (M)	34.3 (alive)	Bahia	c.3503_3504delTC/c.1514G > A	p.L1168Qfs*5/p.C505Y
3 <sup>a</sup>	MLIII (F)	2.4 (alive)	São Paulo	c.242G > T/c.2249dup	p.W81L/p.N750Kfs*8
4	MLIII (F)	12.8 (alive)	São Paulo	c.1208T > C/c.832C > T	p.I403T/p.Q278*
5	MLIII (M)	15.0 (alive)	Piauí	c.3503_3504delTC/c.1208T > C	p.L1168Qfs*5/p.I403T
6 <sup>b</sup>	MLII (F)	2.0 (4.7)	Rio de Janeiro	c.3503_3504delTC/c.1154C > T	p.L1168Qfs*5/p.S385L
7 <sup>c</sup>	MLII (M)	1.8 (6.0)	Rio de Janeiro	c.3503_3504delTC/c.3503_3504delTC	p.L1168Qfs*5/p.L1168Qfs*5
8 <sup>c</sup>	MLII (M)	6.1 (alive)	Piauí	c.3503_3504delTC/c.3503_3504delTC	p.L1168Qfs*5/p.L1168Qfs*5
9	MLII (M)	1.5 (alive)	São Paulo	c.3503_3504delTC/c.2249dup	p.L1168Qfs*5/p.N750Kfs*8
10	MLII (M)	1.7 (alive)	Rio Grande do Sul	c.3503_3504delTC/c.831delT	p.L1168Qfs*5/p.Q278Kfs*3
11	MLII (M)	1.3 (alive)	Sergipe	c.1763dup/c.3333T > G	p.H588Qfs*27/p.Y1111*
12	MLII (M)	0.4 (1.6)	São Paulo	c.242G > T/c.1924_1927delAATT	p.W81L/p.N642Lfs*10
13 <sup>c</sup>	MLII (M)	6.5 (alive)	Maranhão	c.227A > G/c.227A > G	p.D76G/p.D76G

Mutations being described for the first time in the present study are presented in bold.

<sup>a</sup> described by Cury et al., 2013 as patient 5 with an identified alteration on one allele; at present the patient is 11 years old.

<sup>b</sup> described by Cury et al., 2013 as patient 4 with an identified alteration on one allele.

<sup>c</sup> Consanguineous parents; at present the patient is 8.7 years old.



**Fig. 1.** Expression and functional analysis of mutant  $\alpha/\beta$ -subunit precursor protein. (A) Schematic presentation of the domain organization of the full-length wild-type and novel MLII-associated mutant  $\alpha/\beta$ -subunit precursor proteins of the GlcNAc-1-phosphotransferase. The position of the site-1 protease cleavage site between amino acid K928 and D929 (in blue) is indicated. Additional amino acids in frameshift mutants are indicated in red. (B) Extracts of HEK-293 cells overexpressing wild-type (WT) or the indicated mutant  $\alpha/\beta$ -subunit precursor constructs were incubated for 1 h in the presence (+) or absence (-) of PNGase F followed by SDS-PAGE (10% acrylamide) under reducing conditions and anti-myc western blot analysis detecting  $\alpha/\beta$ -subunit precursor and  $\beta$ -subunits. GAPDH and extracts of non-transfected cells were used as loading and negative control, respectively. The positions of molecular mass marker proteins (in kDa) are indicated. (C) HeLa cells overexpressing WT or indicated mutant  $\alpha/\beta$ -subunit precursor constructs. Prior fixation, cells were treated with 100  $\mu$ g/ml cycloheximide for 40 min to block further protein translation and allow protein export from the ER, followed by staining with monoclonal antibodies against the  $\alpha$ -subunit (green), the *cis*-Golgi marker protein GM130 (magenta) or the ER marker protein PDI (magenta). Nuclei were visualized by DAPI staining (blue). Yellow indicates colocalization. Scale bar: 5  $\mu$ m. (D) GlcNAc-1-phosphotransferase activity in extracts (100  $\mu$ g protein) of HEK-293 cells overexpressing WT or indicated mutant  $\alpha/\beta$ -subunit constructs was measured using UDP-[<sup>3</sup>H]GlcNAc as phosphate donor and  $\alpha$ -methylmannoside as phosphate acceptor for 60 min at 37 °C. The activity of WT overexpressing cells was subtracted by the endogenous GlcNAc-1-phosphotransferase activity of non-transfected cells and set to 100%. Data are average values of three independent experiments, and error bars represent SD. \*P < 0.001. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

nonsense mutations in homozygosity lead to the severe course of MLII disease, the missense mutations on the second allele (p.I403T, p.C505Y and p.W81L) might allow the attenuated MLIII alpha/beta form. In the severely affected MLII patients analyzed here, eight pathogenic mutations were found, from which six are novel (p.D76G, p.S385L, p.Q278Kfs\*3, p.H588Qfs\*27, p.N642Lfs\*10 and p.Y1111\*) (Table 1, Fig. 1A).

To analyze the functional consequence of the two novel missense mutations p.D76G and p.S385L, we individually introduced both mutations into the wild-type (WT) cDNA of human *GNPTAB*-myc constructs. In HEK-293 cell extracts overexpressing the WT protein a 190 kDa  $\alpha/\beta$ -subunit precursor and 45 kDa  $\beta$ -subunit were detectable, which were not present in extracts of non-transfected control cells (Fig. 1B, lane 1 and 2). After treatment of cell extracts with peptide-N-glycosidase F (PNGase F), hydrolyzing all N-linked oligosaccharides, the molecular masses of the  $\alpha/\beta$ -subunit precursor and  $\beta$ -subunit shifted to approximately 160 and 38 kDa, respectively (Fig. 1B, lane 3). In cell extracts overexpressing the mutant p.D76G, only the  $\alpha/\beta$ -subunit precursor protein but no cleaved  $\beta$ -subunit were observed (Fig. 1B, lanes 4 and 5). The mutant p.S385L was cleaved as shown by the appearance of  $\beta$ -subunits (Fig. 1B, lanes 6 and 7). For the analysis of the subcellular localization of GlcNAc-1-phosphotransferase mutants, we performed double immunofluorescence microscopy of transfected HeLa cells using a monoclonal antibody against the  $\alpha$ -subunit (De Pace et al., 2014) and organelle-specific marker proteins. The WT  $\alpha/\beta$ -subunit precursor protein was found to co-localize with the *cis*-Golgi marker protein GM130 but not with the ER marker protein disulfide isomerase (PDI) demonstrating the correct trafficking of GlcNAc-1-phosphotransferase to the *cis*-Golgi apparatus (Fig. 1C). The mutant  $\alpha/\beta$ -subunit precursor p.D76G completely co-localized with PDI, whereas the mutant p.S385L was correctly targeted to the Golgi apparatus showing complete co-localization with GM130 (Fig. 1C). Finally, we measured the GlcNAc-1-phosphotransferase activity in HEK-293 cells overexpressing WT and mutant forms. The mutants p.D76G and p.S385L exhibited less than 2% of WT GlcNAc-1-phosphotransferase activity, which was comparable to the activity of the p.L1168Qfs\*5 mutant used as negative control (Fig. 1D).

#### 4. Discussion

The present study genetically confirmed the diagnosis of 11 not yet described patients with MLII and MLIII alpha/beta from seven different states of Brazil exhibiting 12 pathogenic mutations in the *GNPTAB* gene. Among these, nine mutations appear to be associated with a severe MLII phenotype. The majority of these pathogenic alterations represent several frameshift and one nonsense mutation resulting in the synthesis of C-terminally truncated  $\alpha/\beta$ -subunit precursor forms which lack the second transmembrane domain and the C-terminal di-basic ER export motif, <sup>1253</sup>RIR<sup>1255</sup>, located in the cytoplasmic domain (Franke et al., 2013). The four novel truncated  $\alpha/\beta$ -subunit precursor proteins described here and identified in patients 10, 11 and 12 (p.Q278Kfs\*3, p.H588Qfs\*27, p.Y1111\* and p.N642Lfs\*10, respectively) fulfill the structural criteria for severely affected MLII classification. Surprisingly, two novel missense mutations, p.S385L and p.D76G, found in patient 6 and 13, respectively, are also associated with a severe MLII phenotype. These mutations were selected for a detailed biochemical analysis, because missense mutations have been described to cause a milder phenotype and later onset of the disease.

The homozygous missense mutation p.D76G leads to a catalytic inactive GlcNAc-1-phosphotransferase due to the failure of the mutant  $\alpha/\beta$ -subunit precursor to exit the ER and subsequent inability to be cleaved by S1P. Similar properties have been described for patient mutations p.W81L, p.R334Q, p.R334L, p.S399F and p.I403T, and the randomly generated p.W357A mutation (De Pace et al., 2014; Qian et al., 2015; Velho et al., 2015). These residues are clustered in or nearby to the highly conserved stealth domains 1 (D76 and W81) and 2

(R334, W357, S399 and I403) of the  $\alpha$ -subunit and seem to play an important role for the ER exit of the  $\alpha/\beta$ -subunit precursor. Most likely, these residues are part of an interaction site for a yet unknown protein in the lumen of the ER which may function as subunit or chaperone to promote sorting to ER exit sites, or incorporation into transport vesicles. Few of these ER escort proteins have already been identified (Lange et al., 2006; Liu et al., 2008; Paulusma et al., 2008). The second novel missense mutation, p.S385L, has been identified in heterozygosity with the most common frameshift mutation p.L1168Qfs\*5 in MLII patient 6. Although the p.S385L mutation neither interferes with the ER-Golgi transport of the  $\alpha/\beta$ -subunit precursor nor with the proteolytic cleavage, the GlcNAc-1-phosphotransferase is enzymatically inactive. Two other missense mutations located in the stealth domain 2, p.F374L and p.D407A, behave similarly (Qian et al., 2015) and suggest that these three residues participate in the catalytic function of GlcNAc-1-phosphotransferase.

Taken together, the analysis of the novel *GNPTAB* missense mutations presented here provide new insights into functions of modular domains in the  $\alpha$ -subunit, and in particular through which mechanisms altered amino acids affect the GlcNAc-1-phosphotransferase activity. Moreover, the expression analysis of *GNPTAB* mutations increases our understanding on genotype-phenotype correlations, facilitates MLII/MLIII alpha/beta classification, and predictions on the clinical course of the diseases.

#### Contributions

NFL, RVV, FSL, SP and IVDS designed experiments. NFL and RVV carried out experiments. AA, ER, CAK, DDGH, RB, MJRD, ESS and CML provided samples and patient's information. TB, SP and IVDS supervised and supported the study. NFL, RVV, TB, SP and IVDS wrote the manuscript and all authors contributed to manuscript editing.

#### Acknowledgements

The present study was financed by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES), the Fund for the Incentive of Research of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), and the Deutsche Forschungsgemeinschaft SFB877-B3 to RVV, SP and TB.

The authors thank the families for participating and supporting this study. We are grateful to the Microscopy Imaging Facility and Isotope Lab Facility of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf for support.

#### References

- Bao, M., Booth, J.L., Elmendorf, B.J., Canfield, W.M., 1996. Bovine UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal-enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase I. purification and subunit structure. *J. Biol. Chem.* 271, 31437–31445.
- Braulke, T., Raas-Rothschild, A., Kornfeld, S., 2013. I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy: disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localization. In: Valle, D., Vogelstein, B., Kinzler, K., Antonarakis, S., Ballabio, A., Scriver, C., Sly, W., Bunz, F., Gibson, K., Mitchell, G. (Eds.), *The Online Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases*. McGraw-Hill, NY.
- Cathey, S.S., Kudo, M., Tiede, S., Raas-Rothschild, A., Braulke, T., Beck, M., Taylor, H.A., Canfield, W.M., Leroy, J.G., Neufeld, E.F., McKusick, V.A., 2008. Molecular order in mucopolipidosis II and III nomenclature. *Am. J. Med. Genet. A* 146A, 512–513.
- Cury, G.K., Matte, U., Artigal, O., Alegria, T., Velho, R.V., Sperb, F., Burin, M.G., Ribeiro, E.M., Lourenco, C.M., Kim, C.A., Valadares, E.R., Galera, M.F., Acosta, A.X., Schwartz, I.V., 2013. Mucopolipidosis II and III alpha/beta in Brazil: analysis of the *GNPTAB* gene. *Gene* 524, 59–64.
- De Pace, R., Coutinho, M.F., Koch-Nolte, F., Haag, F., Prata, M.J., Alves, S., Braulke, T., Pohl, S., 2014. Mucopolipidosis II-related mutations inhibit the exit from the endoplasmic reticulum and proteolytic cleavage of GlcNAc-1-phosphotransferase precursor protein *GNPTAB*. *Hum. Mutat.* 35, 368–376.
- De Pace, R., Velho, R.V., Encarnacao, M., Marschner, K., Braulke, T., Pohl, S., 2015. Subunit interactions of the disease-related hexameric GlcNAc-1-phosphotransferase complex. *Hum. Mol. Genet.* 24, 6826–6835.
- Encarnação, M., Kollmann, K., Trusch, M., Braulke, T., Pohl, S., 2011. Post-translational

- modifications of the gamma-subunit affect intracellular trafficking and complex assembly of GlcNAc-1-phosphotransferase. *J. Biol. Chem.* 286, 5311–5318.
- Franke, M., Braulke, T., Storch, S., 2013. Transport of the GlcNAc-1-phosphotransferase alpha/beta-subunit precursor protein to the Golgi apparatus requires a combinatorial sorting motif. *J. Biol. Chem.* 288, 1238–1249.
- Kudo, M., Bao, M., D'Souza, A., Ying, F., Pan, H., Roe, B.A., Canfield, W.M., 2005. The alpha- and beta-subunits of the human UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase [corrected] are encoded by a single cDNA. *J. Biol. Chem.* 280, 36141–36149.
- Lange, P.F., Wartosch, L., Jentsch, T.J., Fuhrmann, J.C., 2006. CIC-7 requires Ostm1 as a beta-subunit to support bone resorption and lysosomal function. *Nature* 440, 220–223.
- Liu, Y., Vidensky, S., Ruggiero, A.M., Maier, S., Sitte, H.H., Rothstein, J.D., 2008. Reticulon RTN2 B regulates trafficking and function of neuronal glutamate transporter EAAC1. *J. Biol. Chem.* 283, 6561–6571.
- Marschner, K., Kollmann, K., Schweizer, M., Braulke, T., Pohl, S., 2011. A key enzyme in the biogenesis of lysosomes is a protease that regulates cholesterol metabolism. *Science* 333, 87–90.
- Paulusma, C.C., Folmer, D.E., Ho-Mok, K.S., de Waart, D.R., Hilarius, P.M., Verhoeven, A.J., Oude Elferink, R.P., 2008. ATP8B1 requires an accessory protein for endoplasmic reticulum exit and plasma membrane lipid flippase activity. *Hepatology* 47, 268–278.
- Pohl, S., Marschner, K., Storch, S., Braulke, T., 2009. Glycosylation- and phosphorylation-dependent intracellular transport of lysosomal hydrolases. *Biol. Chem.* 390, 521–527.
- Qian, Y., van Meel, E., Flanagan-Steet, H., Yox, A., Steet, R., Kornfeld, S., 2015. Analysis of mucopolipidosis II/III GNPTAB missense mutations identifies domains of UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme GlcNAc-1-phosphotransferase involved in catalytic function and lysosomal enzyme recognition. *J. Biol. Chem.* 290, 3045–3056.
- Raas-Rothschild, A., Cormier-Daire, V., Bao, M., Genin, E., Salomon, R., Brewer, K., Zeigler, M., Mandel, H., Toth, S., Roe, B., Munnich, A., Canfield, W.M., 2000. Molecular basis of variant pseudo-hurler polydystrophy (mucopolipidosis IIIC). *J. Clin. Invest.* 105, 673–681.
- Stenson, P.D., Mort, M., Ball, E.V., Evans, K., Hayden, M., Heywood, S., Hussain, M., Phillips, A.D., Cooper, D.N., 2017. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum. Genet.* 136, 665–677.
- Tiede, S., Storch, S., Lübke, T., Henrissat, B., Bargal, R., Raas-Rothschild, A., Braulke, T., 2005. Mucopolipidosis II is caused by mutations in GNPTA encoding the alpha/beta GlcNAc-1-phosphotransferase. *Nat. Med.* 11, 1109–1112.
- Velho, R.V., De Pace, R., Klünder, S., Sperb-Ludwig, F., Lourenco, C.M., Schwartz, I.V., 2015. Braulke T, Pohl S. Analyses of disease-related GNPTAB mutations define a novel GlcNAc-1-phosphotransferase interaction domain and an alternative site-1 protease cleavage site. *Hum. Mol. Genet.* 24, 3497–3505.

**Capítulo 3** – A multi-technique approach to genetic diagnosis: a case report of a ML III alpha/beta patient in Brazil

Artigo em preparo para ser submetido a *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, no formato *Brief Report*.

1 **A multi-technique approach to genetic diagnosis: a case report of an ML III**  
2 **alpha/beta patient in Brazil**

3 Ludwig, NF<sup>1,2</sup>; Sperb-Ludwig, F<sup>1,2,\*</sup>; Schwartz, IVD<sup>1,2,3</sup>

4

5 1- BRAIN Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

6 2- Post Graduate Program in Genetics and Molecular Biology of Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
7 Porto Alegre, Brazil

8 3- Medical Genetics Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

9

10 \* Corresponding Author

11 Fernanda Sperb-Ludwig, PhD

12 Hospital de Clínicas de Porto Alegre

13 Rua Ramiro Barcelos, 2350 – Porto Alegre – RS – Brasil – 90035-903

14 E-mail: fsperb@hcpa.edu.br

15 Tel: +55-51-33598309, Fax: +55-51-33598010



## 1 **1. Introduction**

2 Mucopolidosis (ML) II and III are autosomal recessive disorders due to the  
3 deficiency of the enzyme GlcNAc-1-phosphotransferase, which participate in the  
4 generation of manose-6-phosphate residues that are important for delivery of lysosomal  
5 enzymes to lysosomal compartments. The GlcNAc-1-phosphotransferase are codified by  
6 two different genes, the *GNPTAB*, an 85 kb long and structured in 21 exons located in the  
7 chromosome 12q23.2, and the *GNPTG* which comprised 10 exons located in the  
8 chromosome 16p13.3. Pathogenic variations in the first gene can result in the ML II and III  
9 alpha/beta, whereas in the *GNPTG* gene leads to ML III gamma (Raas-Rothschild et al.  
10 2000; Tiede et al. 2005; Cathey et al. 2010).

11 Since the mild phenotype ML III gamma usually is misdiagnosed, genetic  
12 information of ML II/III patients were richer for *GNPTAB* gene. Up to date, more than 250  
13 pathogenic alterations have been described in patient's cohort of different countries, and  
14 these data indicated that frameshift and missense variants were the most common (39 and  
15 26%, respectively). Even that all types of variations were found, gross deletions and  
16 duplications, del-ins and rearrangements were uncommon and accounts for 3% of  
17 pathogenic variations described so far (Velho et al. 2019). The most common technology  
18 applied for genetic diagnosis are Sanger sequencing, which achieves success rate of ~95%,  
19 but in some cases the next generating sequencing was successfully implemented  
20 (Fernández-Marmiesse et al. 2014; Sperb-Ludwig et al. 2015). Aside of the high rates of  
21 success, there is cases in the literature with just one pathogenic variation identified  
22 (Tappino et al. 2009; Encarnação et al. 2009; Cury et al. 2013), which possibly represent  
23 types of genetic lesions that PCR based techniques have less sensitivity, such as allelic  
24 dropout or copy number variations (gross deletions or duplications), or difficult to amplify  
25 of rich GC content regions, as untranslated region of exon 1 of the *GNPTAB* gene (~70%)  
26 (Braulke et al. 2015; Velho et al. 2019).

27 In 2019, our group described an ML III patient (P18) who was investigated by  
28 Sanger sequencing of exons/exon-introns boundaries of *GNPTAB* and *GNPTG* genes  
29 (Alegra et al. 2019). The results showed no variations in the *GNPTG* gene and identified  
30 the c.242G>T (p.Trp81Leu) pathogenic variation in heterozygosity in the *GNPTAB* gene.  
31 No other pathogenic variant was identified. DNA analysis of both parents (Sanger  
32 sequencing) confirmed the father as being a carrier of the c.242G>T variation, and no

1 variation was found in the mother. We describe herein the additional genetic investigation  
2 performed in this patient, which allowed us for the identification of the second pathogenic  
3 allele.

## 4 5 **2. Methodology**

### 6 **2.1 Genetics analysis**

7 DNA from the patient and his parents were extracted from peripheral blood with  
8 Easy-DNA purification kit (Thermo Fisher Scientific), following manufactures'  
9 instructions. *GNPTAB* and *GNPTG* genes were amplified as previously described (Cury et  
10 al. 2013 and Velho et al. 2014, respectively), and DNA samples were submitted to  
11 automated sequencing in ABI-PRISM 3500 for Sanger method. Confirmation of  
12 pathogenic variations was defined after two independent replicates, sequenced with  
13 forward and reverse primers. For the sequencing of gDNA exon 1, we used one set of  
14 traditional sequencing primers that anneal in the 5' UTR and intron 1 regions  
15 (Supplementary Table 1 – set 1 and Figure 1C – yellow boxes) and a second set of primers  
16 to avoid the 5'UTR region and amplify a long region of intron 1 (Supplementary Table 1 –  
17 set 2 and Figure 1C – red boxes).

18 For next-generation sequencing (NGS) was used a panel with the Ion 314™ chip  
19 v2 (Thermo Fisher Scientific) and sequenced in the Ion PGM Hi-Q sequencing kit (Thermo  
20 Fisher Scientific). The panel of primers used by NGS are different for eight exons (1, 2, 8,  
21 11, 12, 13, 20 e 21) of *GNPTAB* gene in comparison to primers used in the Sanger  
22 sequencing.

23 RNA of the patient was extracted with PAXgene blood RNA kit (Qiagen) and  
24 cDNA was generated with High Capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo Fisher  
25 Scientific), following manufactures' instructions. The sequence of primers used to amplify  
26 *GNPTAB* cDNA exons 1-6 are described in Supplementary Table 1, set 3.

## 27 28 **3. Results**

29 The previously genotype identified in the patient was the c.242G>T, in  
30 heterozygosity. To exclude both possibilities of allelic dropout or mosaicism, we  
31 performed next-generation sequencing (NGS) of the same patient DNA sample with the  
32 Ion PGM Platform (Thermo Fisher), the results showed a mean coverage of 463x and 321x

1 for *GNPTAB* and *GNPTG* genes, confirmed previous results (Table 1) but were unable to  
2 conclude the diagnosis. The results of NGS highlighted some inconsistencies in  
3 comparison to Sanger sequencing, as the polymorphisms c.18A>G on exon 1 and  
4 c.323+20del on intron 3 (corresponding amplicons coverage was 21x and 719x,  
5 respectively).

6 With a new blood collection, we performed RNA extraction followed by reverse  
7 transcription and Sanger sequencing of complementary DNA (cDNA) of *GNPTAB* gene.  
8 The results confirmed the r.242G>T and identified a new pathogenic variation, the  
9 conversion r.86\_116conNM\_024312.5:19\_49 (Figure 1). On the affected allele there is the  
10 conversion of the exon 1 nucleotides r.19\_49 to the position r.86\_116 of the same exon,  
11 which is expected to change the reading frame of the last 11 amino acids of exon 1,  
12 although it does not create a premature stop codon or change the length pattern of  
13 *GNPTAB* mRNA.

14 The Sanger sequencing applied to patient gDNA sample with a new set of primers  
15 to sequence from exon 1 until 400 nucleotides downstream on intron 1 (Supplementary  
16 Table 1 and Figure 1C – red boxes), identified the polymorphisms variations  
17 c.117+215C>T and c.117+229C>T, in heterozygous, and no other alterations (Table 1).

18

#### 19 **4. Discussion**

20 Here, we described a complex diagnosis of a male ML III alpha/beta patient, in  
21 which, despite the clinical and biochemical diagnosis, standard genetic analysis of patient  
22 gDNA with Sanger sequencing and NGS of the two genes were able to identify just the  
23 c.242G>T pathogenic alteration, which characterizes an incomplete molecular diagnosis.  
24 After new blood sample collection and RNA analysis with RT-PCR, we were able to  
25 identify the new r.86\_116conNM\_024312.5:19\_49 pathogenic alteration in exon 1 of  
26 *GNPTAB*, therefore confirming the molecular diagnosis of ML III alpha/beta.

27 The work described here highlights the importance of mRNA samples analysis to  
28 conclude the molecular diagnosis. The cDNA, generated from mRNA, can easily be  
29 sequenced through Sanger sequencing, a technique known as RT-PCR, which has been  
30 used in molecular diagnosis of ML II/III in Brazil (Cury et al. 2013) and for different word  
31 wild laboratory's (Bargal et al. 2006; Kudo et al. 2006; Encarnação et al. 2009; Coutinho et  
32 al. 2012). For many of these studies, the RT-PCR technique was used mostly to confirm

1 the pathogenicity of predicted *splicing* alterations. The analysis described here show that  
2 the size of exon 1 on mRNA patient is normal (117 nucleotides), indicating that the site of  
3 normal *splicing* was recognized by the spliceosome, which is corroborated by the  
4 maintenance of critical nucleotides at 3' and 5' splice sites of exon and intron 1  
5 boundaries, respectively.

6 Our framework for molecular diagnosis of ML II/III patients utilizes mostly Sanger  
7 sequencing and this strategy has successfully diagnosed 90 - 95% of patients, which are in  
8 agreement with published work (Braulke et al. 2015). However, there are some cases  
9 where the Sanger sequencing and NGS are unable to identify the two pathogenic  
10 alterations responsible to cause the disorders, most likely because the technique based on  
11 PCR has limitations as allelic drop-out due to single nucleotide variants or large deletions  
12 (Coutinho et al. 2012; Coutinho et al. 2016). Another limitation for these techniques is the  
13 problems with amplification of high GC content regions, which can explain the low  
14 coverage of the amplicon of *GNPTAB* exon 1 in the NGS panel. In the case report  
15 described here, we analyze 600 nucleotides of exon 1 and surrounding regions in the  
16 patient gDNA using three different sets of primers which allowed the identification of  
17 single nucleotide variations in heterozygous, excluding the possibility of large deletions  
18 and decreasing the potential of allelic dropout related to SNV in the region analyzed.

19

## 20 **5. Conclusion**

21 In conclusion, the work described here highlights the Sanger and NGS limitations to  
22 identified pathogenic variations in a high polymorphic gene as *GNPTAB*, and indicate the  
23 importance to include techniques to analyze RNA in the framework of the genetic  
24 diagnosis to guarantee the genetic counseling for ML II and III patients.

25

26 **Acknowledgments:** The present study was financed by the Brazilian National Council for  
27 Scientific and Technological Development (CNPq) and the Fund for the Incentive of  
28 Research of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

## 1 **References**

- 2
- 3 Alegra T, Sperb-Ludwig F, Guarany NR, Ribeiro EM, Lourenço CM, Kim CA, Valadares ER,  
4 Galera MF, Acosta AX, Horovitz DDG et al. (2019) Clinical Characterization of Mucopolidoses II  
5 and III: A Multicenter Study. *J Pediatr Genet* 198–204. doi: 10.1055/s-0039-1697605
- 6 Bargal R, Zeigler M, Abu-Libdeh B, Zuri V, Mandel H, Ben Neriah Z, Stewart F, Elcioglu N,  
7 Hindi T, Merrer ML et al. (2006) When Mucopolidosis III meets Mucopolidosis II: GNPTA gene  
8 mutations in 24 patients. *Mol Genet Metab* 88:359–363. doi: 10.1016/j.ymgme.2006.03.003
- 9 Braulke T, Raas-Rothschild A and Kornfeld S (2015) I - Cell Disease and Pseudo - Hurler  
10 Polydystrophy : Disorders of Lysosomal Enzyme Phosphorylation and Localization. *The Online*  
11 *Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. pp 1–31
- 12 Cathey S, Leroy JG, Wood T, Eaves K, Simensen RJ, Kudo M, Stevenson RE and Friez MJ (2010)  
13 Phenotype and Genotype in Mucopolidoses II and III alpha/beta: A Study of 61 Probands. 47:38–  
14 48. doi: 10.1136/jmg.2009.067736.Phenotype
- 15 Coutinho MF, da Silva Santos L, Lacerda L, Quental S, Wibrand F, Lund AM, Johansen KB, Prata  
16 MJ and Alves S (2012) Alu-Alu Recombination Underlying the First Large Genomic Deletion in  
17 GlcNAc-Phosphotransferase Alpha/Beta (GNPTAB) Gene in a MLII Alpha/Beta Patient. *JIMD*  
18 *Rep* 4:117–24. doi: 10.1007/8904\_2011\_83
- 19 Coutinho MF, Encarnação M, Laranjeira F, Lacerda L, Prata MJ and Alves S (2016) Solving a case  
20 of allelic dropout in the GNPTAB gene: implications in the molecular diagnosis of mucopolidosis  
21 type III alpha/beta. *J Pediatr Endocrinol Metab* 29:1225–1228. doi: 10.1515/jpem-2016-0173
- 22 Cury GK, Matte U, Artigalás O, Alegra T, Velho R V, Sperb F, Burin MG, Ribeiro EM, Lourenço  
23 CM, Kim C a et al. (2013) Mucopolidosis II and III alpha/beta in Brazil: analysis of the GNPTAB  
24 gene. *Gene* 524:59–64. doi: 10.1016/j.gene.2013.03.105
- 25 Encarnação M, Lacerda L, Costa R, Prata MJ, Coutinho MF, Ribeiro H, Lopes L, Pineda M,  
26 Ignatius J, Galvez H et al. (2009) Molecular analysis of the GNPTAB and GNPTG genes in 13  
27 patients with mucopolidosis type II or type III - identification of eight novel mutations. *Clin Genet*  
28 76:76–84. doi: 10.1111/j.1399-0004.2009.01185.x
- 29 Fernández-Marmiesse A, Morey M, Pineda M, Eiris J, Couce ML, Castro-Gago M, Fraga JM,  
30 Lacerda L, Gouveia S, Pérez-Poyato MS et al. (2014) Assessment of a targeted resequencing assay  
31 as a support tool in the diagnosis of lysosomal storage disorders. *Orphanet J Rare Dis* 9:59. doi:  
32 10.1186/1750-1172-9-59
- 33 Kudo M, Brem MS and Canfield WM (2006) Mucopolidosis II (I-cell disease) and mucopolidosis  
34 IIIA (classical pseudo-hurler polydystrophy) are caused by mutations in the GlcNAc-  
35 phosphotransferase alpha / beta -subunits precursor gene. *Am J Hum Genet* 78:451–63. doi:

1 10.1086/500849  
2 Raas-Rothschild A, Cormier-Daire V, Bao M, Genin E, Salomon R, Brewer K, Zeigler M, Mandel  
3 H, Toth S, Roe B et al. (2000) Molecular basis of variant pseudo-hurler polydystrophy  
4 (mucopolipidosis IIIC). *J Clin Invest* 105:673–81. doi: 10.1172/JCI5826  
5 Sperb-Ludwig F, Alegria T, Velho RV, Ludwig N, Kim C a., Kok F, Kitajima JP, van Meel E,  
6 Kornfeld S, Burin MG et al. (2015) Exome sequencing for mucopolipidosis III: Detection of a novel  
7 GNPTAB gene mutation in a patient with a very mild phenotype. *Mol Genet Metab Reports* 2:34–  
8 37. doi: 10.1016/j.ymgmr.2014.12.001  
9 Tappino B, Chuzhanova N, Regis S, Dardis A, Corsolini F, Stroppiano M, Tonoli E, Beccari T,  
10 Rosano C, Mucha J et al. (2009) Molecular characterization of 22 novel UDP-N-  
11 acetylglucosamine-1-phosphate transferase -  $\alpha$  and  $\beta$ -subunit (GNPTAB) gene mutations causing  
12 mucopolipidosis types II $\alpha/\beta$  and III $\alpha/\beta$  in 46 patients. *Hum Mutat* 30:956–973. doi:  
13 10.1002/humu.21099  
14 Tiede S, Storch S, Lübke T, Henrissat B, Bargal R, Raas-Rothschild A and Braulke T (2005)  
15 Mucopolipidosis II is caused by mutations in GNPTA encoding the alpha/beta GlcNAc-1-  
16 phosphotransferase. *Nat Med* 11:1109–12. doi: 10.1038/nm1305  
17 Velho RV, Harms FL, Danyukova T, Ludwig NF, Friez MJ, Cathey SS, Filocamo M, Tappino B,  
18 Güneş N, Tüysüz B et al. (2019) The lysosomal storage disorders mucopolipidosis type II, type III  
19 alpha/beta and type III gamma: Update on GNPTAB and GNPTG mutations. *Hum Mutat* 40:842–  
20 864. doi: 10.1002/humu.23748

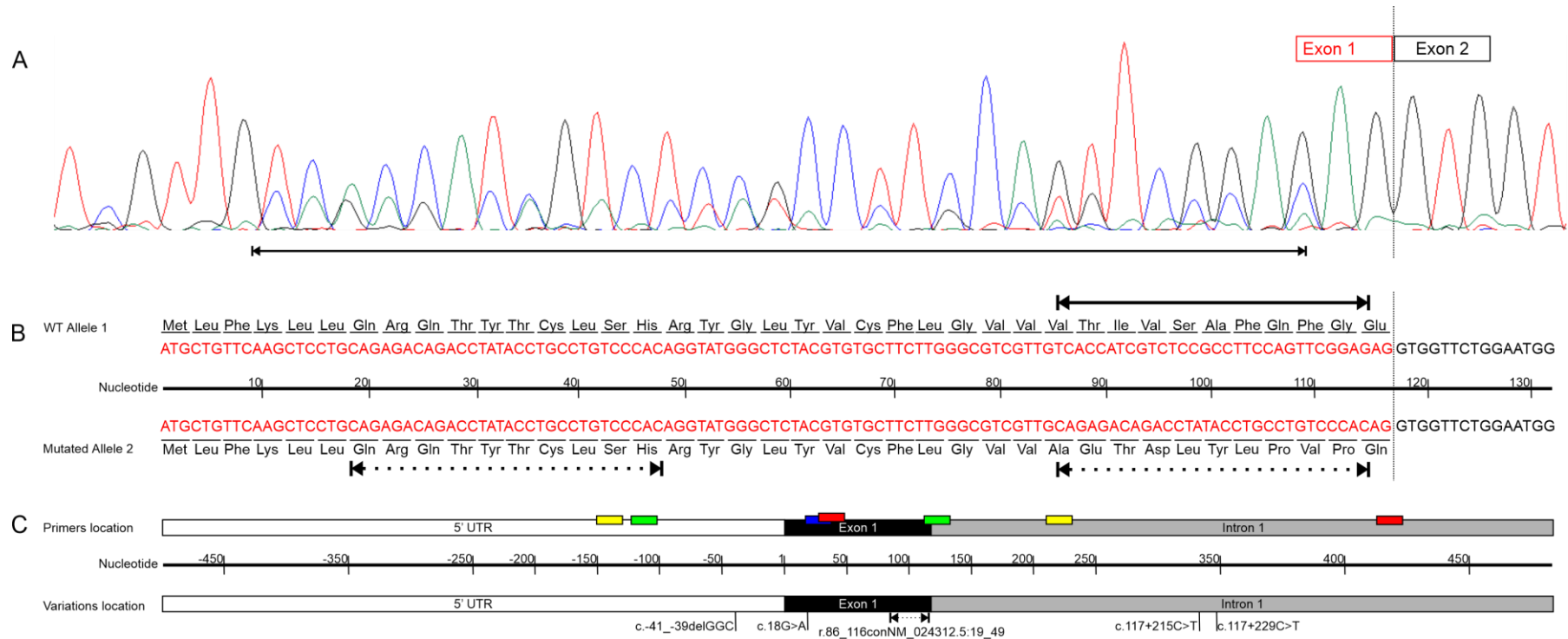
1 Figures and Tables

2

3 Table 1 - Patient molecular analysis results from three different techniques.

Region	Variation	Sanger	NGS	RT-PCR	Reference SNP
<b>5'UTR</b>	c.-41_-39delGGC	-/-	-/-	NA	rs76300806
<b>Exon 1</b>	c.18G>A	+/-	+/+	NA	rs4764655
<b>Exon 1</b>	r.86_116conNM_024312.5:19_49	-/-	-/-	+/-	-
<b>Intron 1</b>	c.117+215C>T	+/-	NA	NA	rs7980363
<b>Intron 1</b>	c.117+229C>T	+/-	NA	NA	rs4764825
<b>Exon 3</b>	c.242G>T	+/-	+/-	+/-	rs281864953
<b>Intron 3</b>	c.323+20delT	+/-	?	NA	rs546617430
<b>Intron 4</b>	c.365+145C>T	-/-	-/-	NA	rs2108694
<b>Intron 10</b>	c.1285-166G>A	-/-	NA	NA	rs7963747
<b>Exon 13</b>	c.1932A>G	-/-	-/-	-/-	rs10778148
<b>Intron 15</b>	c.3135+5T>C	-/-	-/-	NA	rs759935
<b>3'UTR</b>	c.3771+43C>T	+/-	+/-	NA	rs79089208

4 NA = not accessed. The signal “-“ represent presence and “+” absent of the specified variation.



1  
 2 Figure 1 – The new r.86\_116conNM\_024312.5:19\_49 pathogenic variation identified in the ML III alpha/beta patient. **A** The Sanger  
 3 sequencing of the patient cDNA sample showing the exon 1 and 2 boundaries and the out of frame 30 base pairs region (black arrow). **B**  
 4 The scheme of both patient alleles. The pathogenic variation region is shown in the wild type allele (black arrow) and the altered allele  
 5 (black dotted arrow), which showed the conversion of nucleotides r.86\_116 and insertion in this position of the nucleotide sequence  
 6 r.19\_49 (black dotted arrows) of the same exon. **C** The gDNA exon 1 region and the first 6 exons of the patient mRNA are demonstrated.  
 7 The variations identified in the molecular diagnosis and the primers used are presented in rectangle boxes: yellow, primer set 1; red, primer  
 8 set 2; blue, primer set 3; green, primer set 4 (also in Supplementary Table 1).



1 Supplementary material

2

3 **Supplementary Table 1 – Information of primers set used.**

Name	Technique	Biological Target	Exon	Forward	Reverse
1	Sanger	gDNA	1	cgtcgctgcgccggagctgcaatg	ggcaaaacccgctcttaataatg
2	Sanger	gDNA	1	cctatacctgcctgtcccaca	gactccagaccaactg
3	NGS	gDNA	1	ggaggtgtgacctgcgc	ccgtactcacctctcc
4	RT-PCR	cDNA	1 - 5	gcagagacagacctatacctg	ggcatctcaacatccttagta

4

**Capítulo 4** – A decade of molecular diagnosis of Mucopolidosis II and III in Brazil: a pooled analysis of 33 patients

Artigo em preparo.

1 A decade of molecular diagnosis of Mucopolipidosis II and III in Brazil: a pooled analysis of  
2 33 patients

3 Ludwig NF<sup>1,2</sup>, Sperb-Ludwig F<sup>1,2\*</sup>, Random D<sup>1,2</sup>, Bernardi P, Giugliani LR, Araújo C,  
4 Santana L, Schwartz IVD<sup>1,2,3</sup>

5 <sup>1</sup>- BRAIN Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

6 <sup>2</sup>- Post Graduate Program in Genetics and Molecular Biology of Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
7 Porto Alegre, Brazil

8 <sup>3</sup>- Medical Genetics Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

9

10

11

12

13 \* Corresponding Author

14 Fernanda Sperb-Ludwig, PhD

15 Hospital de Clínicas de Porto Alegre

16 Rua Ramiro Barcelos, 2350 – Porto Alegre – RS – Brasil – 90035-903

17 E-mail: fsperb@hcpa.edu.br

18 Tel: +55-51-33598309, Fax: +55-51-33598010

## 1 Introduction

2           The Mucopolidosis (ML) type II, III alpha/beta, and III gamma are autosomal  
3 recessive disorders caused by a defect in the pathway of targeting lysosomal enzymes to  
4 lysosome through the mannose-6-phosphate (M6P) signal. Lysosomal enzymes synthesized  
5 in the Endoplasmic Reticulum were transported to the Golgi complex, where an enzymatical  
6 two-step process generates the M6P signal that guarantees the recognition of lysosomal  
7 enzymes by M6P receptors in the trans-Golgi network and subsequent delivery to lysosomal  
8 compartments (Braulke et al. 2015).

9           The GlcNAc-1-phosphotransferase, responsible for the first step in the M6P pathway,  
10 is a cis-Golgi transmembrane resident and hexameric complex formed by  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -  
11 subunits ( $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ), codified by two genes. The *GNPTG* gene is located on chromosome  
12 16p13.3, has 11 exons, and codified the soluble  $\gamma$ -subunit. The *GNPTAB* gene is located on  
13 chromosome 12q23.3, expands to 21 exons that encode a transmembrane precursor protein  
14 of 1256 amino acids that is activated by Golgi-resident S1P protease proteolytic in the  $\alpha$ -  
15 and  $\beta$ -subunits (Raas-Rothschild et al. 2000; Tiede et al. 2005).

16           Pathogenic variations in *GNPTAB* can be related to the severe ML II disease  
17 (MIM#252500), which patients may present symptoms at born, progress fast and death  
18 occurs in the first's years of life. However, variations in this gene can be associated with ML  
19 III alpha/beta (MIM#252600), which shows mild symptoms normally not present at birth,  
20 progression is slower and life expectance is unclear but longer than ML II. ML III gamma  
21 (MIM #252605) is caused only by pathogenic variations in the *GNPTG* gene and presented  
22 as the milder disease, with joints and bone symptoms and normal life expectancy (Cathey et  
23 al. 2008; Braulke et al. 2015; Alegria et al. 2019).

24           The functional characterization of pathogenic variations in the *GNPTAB* gene over  
25 the last years demonstrated that levels of 10% of GlcNAc-1-phosphotransferase residual  
26 activity appear to protect against the severe phenotype ML II (Velho et al. 2019). The  
27 spectrum of pathogenic variations described so far highlight the wide distribution of the  
28 c.3503\_3504del in different patients' populations, mainly to the possibility of a single event  
29 in the Mediterranean region of Europe and then spread to others European colonized  
30 countries, but not Japan and South Korea (Paik et al. 2005; Otomo et al. 2009; Coutinho et  
31 al. 2011; Soares et al. 2020). A recent review of genetic data shows that 258 pathogenic  
32 variations in *GNPTAB* gene have been described in 459 patients, and in opposite to

1 c.3503\_3504del, 72% were related to individual families and just 10% found in more than  
2 two families, which demonstrated the high heterogeneity of this gene (Velho et al. 2019).

3 The data for incidence is scarce, however, are described the estimated incidence of  
4 1:123.500 in Portugal, 1:650.000 in the Netherlands, and an estimated global incidence of  
5 2.5 to 10 cases per 1.000.000 live births. However, in Quebec, Canada, the high incidence  
6 of 1:6.184 of ML II was further explained by a founder effect connected to six founders of  
7 the local population, this is the only population with high rates of ML II/III described so far  
8 (Pinto et al. 2004; Plante et al. 2008; Raas-Rothschild et al. 2012). In this work, we described  
9 new clinical and genetic information of four ML II/III alpha/beta patients and review the  
10 distribution and frequencies of pathogenic variations identified in the last ten years in Brazil.

## 11 12 **Material and Methods**

### 13 **Patients**

14 The patients' genotype included in this study are described in detail in previous works  
15 published by the group (Cury et al. 2013; Sperb-Ludwig et al. 2015; Velho et al. 2015;  
16 Ludwig et al. 2017; Alegra et al. 2019) or under publication (Di Lorenzo et al and Ludwig  
17 et al 2020) and four patients are described here for the first time. Sanger sequencing was  
18 used to genetic diagnosis, the patients P1 to P26 have the entire gene analyzed (21 exons),  
19 and P27 to P32 were analyzed until concluding diagnosis (variable amounts of exons). The  
20 consanguinity rate was 18,7% (n= 6/32), totalizing 58 alleles in this study.

21 Biochemical and molecular diagnoses were performed at the Medical Genetics  
22 Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA). The SGM-HCPA is the  
23 reference center for the diagnosis of lysosomal diseases in the country and the only research  
24 laboratory that performs genotyping of the *GNPTAB* and *GNPTG* genes (this analysis is not  
25 available in the health system). Since 2010, the SGM-HCPA performs research with ML II  
26 and III in clinical, biochemical, and genetic data of patients diagnosed with the disease in  
27 the country (approved in the local ethical committee).

28 The patients' genotype data included in this study are described in detail in previous  
29 works published by the group (Cury et al. 2013; Sperb-Ludwig et al. 2015; Velho et al. 2015;  
30 Ludwig et al. 2017; Alegra et al. 2019) or under publication (Di Lorenzo et al and Ludwig  
31 et al 2020) and four patients are described here for the first time. Sanger sequencing was  
32 used to genetic diagnosis, the patients P1 to P26 have the entire gene analyzed (21 exons),

1 and P27 to 32 were analyzed until concluding diagnosis (variable amounts of exons). The  
2 consanguinity rate was 18,7% (n= 6/32), totalizing 58 alleles in this study.

### 3 4 **Molecular diagnosis of patients P28 to P33**

5 Molecular diagnosis was performed as previously described (Cury et al. 2013). In  
6 brief, genomic DNA was extracted from blood samples using the Easy-DNA purification kit  
7 (Thermo Fisher Scientific). *GNPTAB* gene amplification was performed by standard PCR  
8 and samples were submitted to automated DNA sequencing on an ABI Prism 3500 Genetic  
9 Analyzer (Applied Biosystems). Sanger sequencing results analysis was performed using the  
10 reference sequence NM\_024312.4 and pathogenic nomenclature follows the  
11 recommendations of Human Genome Variation Society. Positive samples were twice  
12 independently sequenced with forward and reverse primers.

### 13 14 **Development and validation of molecular diagnosis protocol**

15 To perform molecular diagnosis faster and more costly-effective, we use  
16 retrospective genetic data of 26 patients (Table 1 – P1 to 26) to define a rational sequential  
17 order of exon sequencing, where the firsts exons to be analyzed were the ones with more  
18 affected alleles. These 26 patients have the entire coding *GNPTAB* gene sequenced. Next, as  
19 a prospective cohort, we use the second group of patients (Table 2, P27 to 32) to validate the  
20 protocol, these exons in these patients were analyzed just until concluding the diagnosis.

21 For specific patients, the molecular diagnosis through Sanger sequencing was not  
22 sufficient to conclude the molecular diagnosis, therefore patients' samples were submitted  
23 to further analysis that concludes it (P26, pathogenic variation  
24 r.86\_116conNM\_024312.5:19\_49 - RT-PCR analysis, described in detail on Ludwig et al  
25 2020). For generation and analysis of the protocol, the pathogenic variations identified  
26 through other techniques rather than Sanger were not considered.

## 27 28 **Results**

### 29 **The new patients**

30 Here, we describe genetic information of four new ML II/III patients. P29 and P30  
31 were clinically diagnosed with ML III alpha/beta, the first patient present the missense  
32 c.1196C>T (p.Ser399Phe), in homozygous, and the second is compound heterozygous for

1 the small deletion c.3503\_3504del and the missense c.1208T>C; P31 is an ML II patient  
2 homozygous to the well-known c.3503\_3504del. P32 is an ML II patient diagnosed with two  
3 variations identified for the first time, c.2034dupT (p.Phe678Phefs\*1) and c.2720\_2721del  
4 (p.Glu907Glyfs\*11) (Table 1). Both variations were not identified in genetic databases  
5 (gnomAD and 1000genomes) and frameshift variations were expected to cause the disease  
6 with severe phenotype, which agrees with the clinical diagnosis. Using ACMG  
7 recommendations for the classification of variants, both were considered pathogenic.

### 9 **The characterization of the total cohort of Brazilian patients**

10 Of the 32 patients included in this report, eighteen (56,2%) were clinically diagnosed  
11 with ML II and the genetic diagnosis rate with Sanger and with Sanger and others techniques  
12 are 90,6% (n=29/32) and 93,7% (n=30/32), respectively. In the total cohort, we identified 24  
13 unique pathogenic variations that vary from missense (n= 10; 41,7%), frameshift (n= 10;  
14 41,7%), nonsense (n= 2; 8,3%), conversion (n=1; 4,2%) and splicing variation (n= 1; 4,2%)  
15 (Figure 1 and Table 1). The pathogenic variation that account for the higher number of  
16 affected alleles is the small deletion in exon 19, c.3503\_3504del (n= 19; 32,7%), followed  
17 by the missense c.1208T>C (n= 6; 10,3%), the frameshift c.2249dup (n=4; 6,8%), the  
18 missense c.242G>T and c.1196C>T (n=3; 5,1%) and the missense c.1514G>A (n=2; 3,4%).  
19 The others pathogenic variations were identified in one allele.

20 Most of the pathogenic variations identified were associated with the severe form of  
21 the disease ML II (n=15/24; 62,5%), which all frameshift as well the nonsense c.3333T>G  
22 and the splicing c.2808A>G variations are included. The nonsense variations c.832C>T and  
23 c.1759C>T are expected to generate a premature stop codon in the amino acids 278 and 587,  
24 respectively, and to be associated with ML II. However, P19 and P5 are compound  
25 heterozygous to the missense c.1208T>C and c.1514G>A, respectively, which can explain  
26 the mild ML III alpha/beta phenotype observed. The data indicate that the presence of  
27 missense variations is associated with both phenotypes, the mild phenotype ML III  
28 alpha/beta (n=5/9; 55,5%), and the severe ML II (n=3/9; 33,3%). The missense c.242G>T is  
29 the only variation found in ML II P14 and P18, and III alpha/beta P26, in compound  
30 heterozygous with c.2249dup, c.1924\_1927del, and r.86\_116delins86+19\_49, respectively.

31 The distribution of the pathogenic variations shows that some alleles were specific  
32 to regions of the country (Figure 2), for instance, the missense variation c.1196C>T accounts

1 for three alleles found just in the South region of the country, specifically in the SC state  
2 (P29 is homozygous with consanguineous parents). The four alleles of the small duplication  
3 c.2249dup were identified in SP state, localized in the Southeast region, where P27 was born  
4 from non-consanguineous parents and diagnosed as homozygous for this variation. In this  
5 same region, the missense c.242G>T were identified in three alleles from three different  
6 patients, although in two different states (SP and MG).

7 The two pathogenic variations that account for the higher number of affected alleles  
8 presented a broader distribution in the country. The worldwide identified c.3503\_3504del  
9 were found in all regions, except in the North. In the Northeast and Midwest regions of the  
10 country the variation account for 50% (n= 9/18) and 66,7% (n= 4/6) of alleles, respectively.  
11 In the Northeast region of the country, there is a high frequency of the missense c.1208T>C  
12 (n=3/6), however, this pathogenic variation had been identified too in the Southeast and  
13 Midwest. Also, the compound heterozygous genotype the c.3503\_3504del/c.1208T>C were  
14 found in four patients, and three of these patients were from the Northeast region (P8, 23 and  
15 24).

16 Using gnomAD (version 2.1.1) database to search for alleles frequencies of the six  
17 pathogenic variations identified in more than one allele in the Brazilian ML II/III patients,  
18 we found that the c.3503\_3504del were identified in all except in the Ashkenazi Jewish and  
19 East Asian populations. The higher frequencies were observed in the South Asian and non-  
20 Finish European, followed by the Latinos and Others (S Table 1). The others pathogenic  
21 variations were mainly identified in the non-Finnish European, the more frequent are the  
22 c.1196C>T, with five alleles (one from South Asia and four from non-Finnish Europeans),  
23 the c.1514G>A with 3 alleles (Other non-Finnish European), the c.2249dup with 2 alleles  
24 (North-western Europeans) and the c.1208T>C identified once (Other non-Finnish  
25 European) (S Table 1 and 2). The missense c.242G>T was not identified in the gnomAD  
26 database. In the ABraOM database, a 609 cohort of elderly Brazilian people, only one allele  
27 of the c.3503\_3504del (0.000821) was observed.

28

### 29 **A protocol for *GNPTAB* genetic diagnosis**

30 Since the *GNPTAB* gene coding sequence presented as 85.461 base pairs long  
31 divided through 21 exons, we used retrospective genetic data from 27 patients to evaluate  
32 the exons with higher frequencies of pathogenic variations. We identify pathogenic



1 variations in 10 exons (Table 2) and with the specific frequencies of variations by exon we  
2 proposed Protocol 1 (Figure 3).

3         Following the protocol, we perform the molecular diagnosis of patients P27 to 32,  
4 where we analyze the patient DNA until identifying the two pathogenic variations expected.  
5 We conclude the diagnosis of all six patients in the first 4 steps, with the mean number of  
6 exons analyzed of 4.6, which vary from one exon (P31, homozygous for variation in exon  
7 19) to nine exons (P28 and 32, which have been analyzed until step 4).

## 9 **Discussion**

10         Here we described genetic and clinical information of four new patients diagnosed  
11 with ML II and III alpha/beta in Brazil, with the protocol newly established. This new  
12 information, pooled with more 28 patient's data previously published by our group, enables  
13 the analysis of frequencies and distribution of pathogenic variations in the country. The  
14 grouped analysis allows us to design and validate the protocol that will conclude the  
15 molecular diagnosis efficiently, which is a powerful tool to deliver the information for  
16 genetic counseling of affected families in a country with limited resources.

17         The analyses confirm the expected high frequency of the worldwide spread  
18 c.3503\_3054del variation in the Brazilian population, which accounts for 33,3% of affected  
19 alleles and are found in all regions of the country. This is confirmed by healthy individual  
20 control databases that present high frequencies of this variant in different genetic  
21 backgrounds, although absent in the East Asian populations as in patients populations  
22 previously described (Paik et al. 2005; Otomo et al. 2009). The detected greater proportions  
23 of this variation in the Northeast region of the country agrees with recent data from  
24 haplotypes analysis, which demonstrate the presence of six different haplotypes containing  
25 the variation in this region of Brazil. This sustain the hypothesis that different migration  
26 events of European populations, that correspond for the majority of Brazilian genetic  
27 background (Rodrigues de Moura et al. 2015), introduce the variant, which diversified  
28 through mutational and recombinant events (Soares et al. 2020).

29         In contrast to most pathogenic variations identified in the *GNPTAB* gene in different  
30 patients' populations, a subset of variations identified in Brazil presented with a high  
31 frequency. The missense c.1208T>C was the second most identified variation and account  
32 for 10,3% of affected alleles (n=6/58), was found in the Southeast, Midwest, and Northeast

1 of the country. Despite the low frequency in the gnomAD database (S Table 1 and 2), the  
2 variation was identified in three patients from European populations, from Portugal  
3 (Encarnação et al. 2009), Italy (Tappino et al. 2009), and Spain/Portugal (Fern andez-  
4 Marmiesse et al. 2014). Even that these countries were important contributors to Brazilian  
5 genetic background, the frequency of this variation in patient populations from Europe and  
6 genetic healthy database is insufficient to explain the high proportion in Brazilian patients.

7 Further, the small duplication c.2249dup was identified in four alleles in Brazil  
8 (6,8%) and one patient from Finland (Encarnação et al. 2009), a well know country with a  
9 distinct genetic background (Lim et al. 2014). However, the variation was found just in  
10 North-western Europeans in the gnomAD. The missense c.1196C>T was identified in three  
11 alleles in the Brazilian population, and in the gnomAD database was found in five alleles  
12 (South Asia and non-Finnish Europeans), indicating a broad distribution. In previously  
13 published patients, the variation was identified in Portugal (n=3) (Encarnação et al. 2009;  
14 Coutinho et al. 2016), France (n=1) (Bargal et al. 2006), Belgium/Romania (n=1) (Gheldof  
15 et al. 2019) and in USA (different origins, n=3) (Cathey et al. 2010).

16 Interesting to note that the four alleles of the c.2249dup and the three alleles of  
17 c.1196C>T were identified, in each case, specifically in patients from the same state; the first  
18 variation in three non-consanguineous patients from SP, and the second in three patients, one  
19 consanguineous, from SC. Clusters of isolated populations with a high prevalence of  
20 autosomal recessive disorders, most likely attributed to the elevated rates of consanguinity,  
21 have been identified in the Northeast and Southeast regions of Brazil (Castilla and Schuler-  
22 Faccini 2014; Cardoso et al. 2019). Since the number of auto-reported consanguinity is low  
23 in the Brazilian ML II/III alpha/beta patients, whether the high rates of affected alleles  
24 identified in these areas could be related to, or even constitute another, one of these clusters  
25 will need further studies to address this question.

26 The molecular diagnosis of ML II/III alpha/beta diseases are time and resource-  
27 consuming tasks, which involves sequencing two genes that are highly heterogeneous  
28 regarding pathogenic variations, therefore presenting a considerable amount of private  
29 variations (in Brazil, n=18/24, 75%) (Velho et al. 2019). Besides, the rate of successful  
30 molecular diagnosis with Sanger sequencing achieves ~95% worldwide (Br aulke et al.  
31 2015), but recent works demonstrate the necessity of utilizing a complementary approach to  
32 conclude special cases (Coutinho et al. 2016). To improve the efficiency of the molecular

1 diagnosis in Brazil, we implemented a simple protocol to perform the investigation of the  
2 *GNPTAB* gene that prioritizes exons with more variations, and our results with six new  
3 samples shown that the conclusion of the patient molecular diagnosis requires fewer exons  
4 to be sequenced.

5 In conclusion, our effort to study the genetic characteristics of the Brazilian ML II/III  
6 alpha/beta patients in the last decade provide data to achieve an overview of *GNPTAB*  
7 pathogenic variations frequencies and specific distributions. These efforts highlight distinct  
8 and private frequencies in different states of the country, which support the hypothesis of  
9 founder effect or high rates of consanguinity, or a combination of both, that will need more  
10 studies to be addressed, and reveal the importance of molecular studies to provide cost-  
11 effective and accurate information for patients genetic counseling.

12

13 **Acknowledgments:** The present study was financed by the Brazilian National Council for  
14 Scientific and Technological Development (CNPq) and the Fund for the Incentive of Research  
15 of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

16

## 1 **References**

- 2
- 3 Alegria T, Sperb-Ludwig F, Guarany NR, Ribeiro EM, Lourenço CM, Kim CA, Valadares ER, Galera MF,  
4 Acosta AX, Horovitz DDG et al. (2019) Clinical Characterization of Mucopolidoses II and III: A Multicenter  
5 Study. *J Pediatr Genet* 198–204. doi: 10.1055/s-0039-1697605
- 6 Bargal R, Zeigler M, Abu-Libdeh B, Zuri V, Mandel H, Ben Neriah Z, Stewart F, Elcioglu N, Hindi T, Merrer  
7 ML et al. (2006) When Mucopolidosis III meets Mucopolidosis II: GNPTA gene mutations in 24 patients. *Mol*  
8 *Genet Metab* 88:359–363. doi: 10.1016/j.ymgme.2006.03.003
- 9 Braulke T, Raas-Rothschild A and Kornfeld S (2015) I - Cell Disease and Pseudo - Hurler Polydystrophy :  
10 Disorders of Lysosomal Enzyme Phosphorylation and Localization. *The Online Metabolic & Molecular Bases*  
11 *of Inherited Disease*. pp 1–31
- 12 Cardoso GC, de Oliveira MZ, Paixão-Côrtes VR, Castilla EE and Schuler-Faccini L (2019) Clusters of genetic  
13 diseases in Brazil. *J Community Genet* 10:121–128. doi: 10.1007/s12687-018-0369-1
- 14 Castilla EE and Schuler-Faccini L (2014) From rumors to genetic isolates. *Genet Mol Biol* 37:186–193. doi:  
15 10.1590/S1415-47572014000200005
- 16 Cathey S, Kudo M, Tiede S, Raas-Rothschild A, Braulke T, Beck M, Taylor HA, Canfield WM, Leroy JG,  
17 Neufeld EF et al. (2008) Molecular Order in Mucopolidosis II and III Nomenclature. *Am J Med Genet A*  
18 143A:2106–2112. doi: 10.1002/ajmg.a
- 19 Cathey S, Leroy JG, Wood T, Eaves K, Simensen RJ, Kudo M, Stevenson RE and Friez MJ (2010) Phenotype  
20 and Genotype in Mucopolidoses II and III alpha/beta: A Study of 61 Probands. 47:38–48. doi:  
21 10.1136/jmg.2009.067736.Phenotype
- 22 Coutinho M, Encarnação M, Gomes R, da Silva Santos L, Martins S, Sirois-Gagnon D, Bargal R, Filocamo M,  
23 Raas-Rothschild A, Tappino B et al. (2011) Origin and spread of a common deletion causing mucopolidosis  
24 type II: insights from patterns of haplotypic diversity. *Clin Genet* 80:273–80. doi: 10.1111/j.1399-  
25 0004.2010.01539.x
- 26 Coutinho MF, Encarnação M, Laranjeira F, Lacerda L, Prata MJ and Alves S (2016) Solving a case of allelic  
27 dropout in the GNPTAB gene: implications in the molecular diagnosis of mucopolidosis type III alpha/beta. *J*  
28 *Pediatr Endocrinol Metab* 29:1225–1228. doi: 10.1515/jpem-2016-0173
- 29 Cury GK, Matte U, Artigalás O, Alegria T, Velho R V, Sperb F, Burin MG, Ribeiro EM, Lourenço CM, Kim  
30 C a et al. (2013) Mucopolidosis II and III alpha/beta in Brazil: analysis of the GNPTAB gene. *Gene* 524:59–  
31 64. doi: 10.1016/j.gene.2013.03.105
- 32 Encarnação M, Lacerda L, Costa R, Prata MJ, Coutinho MF, Ribeiro H, Lopes L, Pineda M, Ignatius J, Galvez  
33 H et al. (2009) Molecular analysis of the GNPTAB and GNPTG genes in 13 patients with mucopolidosis type  
34 II or type III - identification of eight novel mutations. *Clin Genet* 76:76–84. doi: 10.1111/j.1399-  
35 0004.2009.01185.x
- 36 Fernández-Marmiesse A, Morey M, Pineda M, Eiris J, Couce ML, Castro-Gago M, Fraga JM, Lacerda L,  
37 Gouveia S, Pérez-Poyato MS et al. (2014) Assessment of a targeted resequencing assay as a support tool in the  
38 diagnosis of lysosomal storage disorders. *Orphanet J Rare Dis* 9:59. doi: 10.1186/1750-1172-9-59
- 39 Gheldof A, Seneca S, Stouffs K, Lissens W, Jansen A, Laeremans H, Verloo P, Schoonjans AS, Meuwissen

1 M, Barca D et al. (2019) Clinical implementation of gene panel testing for lysosomal storage diseases. *Mol*  
2 *Genet Genomic Med* 7:1–11. doi: 10.1002/mgg3.527

3 Lim ET, Würtz P, Havulinna AS, Palta P, Tukiainen T, Rehnström K, Esko T, Mägi R, Inouye M, Lappalainen  
4 T et al. (2014) Distribution and Medical Impact of Loss-of-Function Variants in the Finnish Founder  
5 Population. *PLoS Genet*. doi: 10.1371/journal.pgen.1004494

6 Ludwig NF, Voltolini Velho R, Sperb-ludwig F, Xavier Acosta A, Kim CA, Ribeiro EM, Gandelman DDH,  
7 Boy R, Rodovalho MJ-D, Marques Lourenço C et al. (2017) GNPTAB missense mutations cause loss of  
8 GlcNAc-phosphotransferase activity in mucopolipidosis tipe II through distinct mechanisms.pdf. *Int J Biochem*  
9 *Cell Biol* 92:90–94.

10 Otomo T, Muramatsu T, Yorifuji T, Okuyama T, Nakabayashi H, Fukao T, Ohura T, Yoshino M, Tanaka A,  
11 Okamoto N et al. (2009) Mucopolipidosis II and III alpha/beta: mutation analysis of 40 Japanese patients showed  
12 genotype-phenotype correlation. *J Hum Genet* 54:145–51. doi: 10.1038/jhg.2009.3

13 Paik KH, Song SM, Ki CS, Yu HW, Kim JS, Min KH, Chang SH, Yoo EJ, Lee IJ, Kwan EK et al. (2005)  
14 Identification of mutations in the GNPTA (MGC4170) gene coding for GlcNAc-phosphotransferase  $\alpha/\beta$   
15 subunits in Korean patients with mucopolipidosis type II or type IIIA. *Hum Mutat* 26:308–314. doi:  
16 10.1002/humu.20205

17 Pinto R, Caseiro C, Lemos M, Lopes L, Fontes A, Ribeiro H, Pinto E, Silva E, Rocha S, Marcão A et al. (2004)  
18 Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet* 12:87–92. doi:  
19 10.1038/sj.ejhg.5201044

20 Plante M, Claveau S, Lepage P, Lavoie E, Brunet S, Roquis D, Morin C, Vézina H and Laprise C (2008)  
21 Mucopolipidosis II: a single causal mutation in the N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase gene (GNPTAB)  
22 in a French Canadian founder population. *Clin Genet* 73:236–44. doi: 10.1111/j.1399-0004.2007.00954.x

23 Raas-Rothschild A, Cormier-Daire V, Bao M, Genin E, Salomon R, Brewer K, Zeigler M, Mandel H, Toth S,  
24 Roe B et al. (2000) Molecular basis of variant pseudo-hurler polydystrophy (mucopolipidosis IIIC). *J Clin Invest*  
25 105:673–81. doi: 10.1172/JCI5826

26 Raas-Rothschild A, Pohl S and Braulke T (2012) Lysosomal storage disorders: A Practical Guide. *Br J*  
27 *Haematol*. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.05293.x

28 Rodrigues de Moura R, Coelho AVC, de Queiroz Balbino V, Crovella S and Brandão LAC (2015) Meta-  
29 analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin America countries. *Am J Hum Biol*  
30 27:674–680. doi: 10.1002/ajhb.22714

31 Soares MB, Turchetto-Zolet AC, Schwartz IVD and Sperb-Ludwig F (2020) Haplotype analysis and origin of  
32 the most common pathogenic mutation causing Mucopolipidosis II and III alpha/beta in Brazilian patients. *Gene*  
33 *Reports* 19:100645. doi: 10.1016/j.genrep.2020.100645

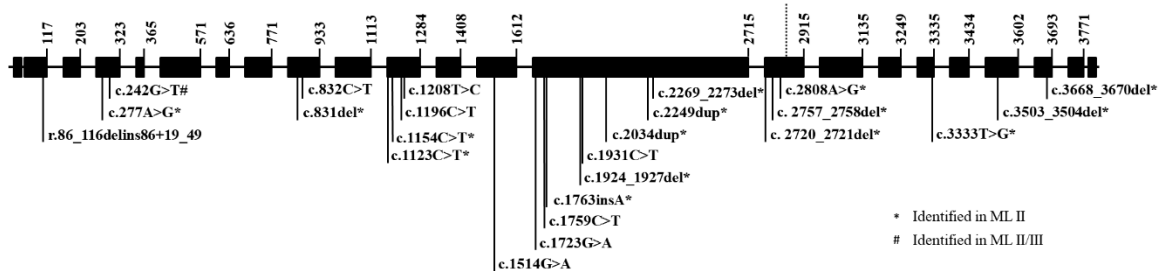
34 Sperb-Ludwig F, Alegria T, Velho RV, Ludwig N, Kim C a., Kok F, Kitajima JP, van Meel E, Kornfeld S,  
35 Burin MG et al. (2015) Exome sequencing for mucopolipidosis III: Detection of a novel GNPTAB gene mutation  
36 in a patient with a very mild phenotype. *Mol Genet Metab Reports* 2:34–37. doi: 10.1016/j.ymgmr.2014.12.001

37 Tappino B, Chuzhanova N, Regis S, Dardis A, Corsolini F, Stroppiano M, Tonoli E, Beccari T, Rosano C,  
38 Mucha J et al. (2009) Molecular characterization of 22 novel UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphate  
39 transferase -  $\alpha$  and  $\beta$ -subunit (GNPTAB) gene mutations causing mucopolipidosis types II $\alpha/\beta$  and III $\alpha/\beta$  in 46

1 patients. *Hum Mutat* 30:956–973. doi: 10.1002/humu.21099  
2 Tiede S, Storch S, Lübke T, Henrissat B, Bargal R, Raas-Rothschild A and Braulke T (2005) Mucopolipidosis II  
3 is caused by mutations in GNPTA encoding the alpha/beta GlcNAc-1-phosphotransferase. *Nat Med* 11:1109–  
4 12. doi: 10.1038/nm1305  
5 Velho RV, De Pace R, Sarah Klünder, Ludwig FS-, Lourenço CM, Schwartz I V.D., Braulke T and Pohl S  
6 (2015) Analyses of disease-related GNPTAB mutations define a novel GlcNAc-1- phosphotransferase  
7 interaction domain and an alternative site-1 protease cleavage site. 1–34.  
8 Velho RV, Harms FL, Danyukova T, Ludwig NF, Friez MJ, Cathey SS, Filocamo M, Tappino B, Güneş N,  
9 Tüysüz B et al. (2019) The lysosomal storage disorders mucopolipidosis type II, type III alpha/beta and type III  
10 gamma: Update on GNPTAB and GNPTG mutations. *Hum Mutat* 40:842– 864. doi: 10.1002/humu.23748

1 **Figures and Tables**

2



3

4

5

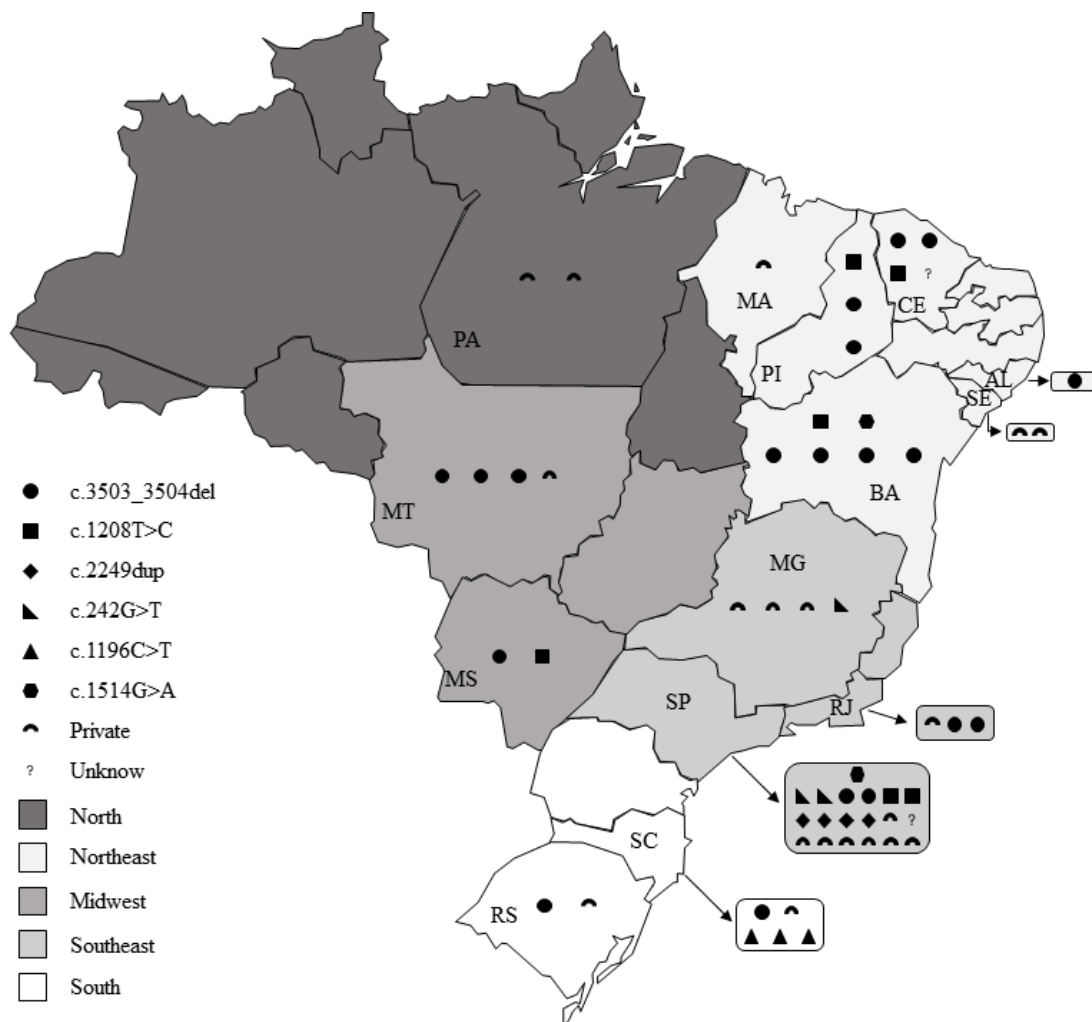
6

7

8

9

Figure 1 – **Pathogenic variations in a cohort of Brazilian patients with ML II and III alpha/beta.** Black boxes represent exons of the *GNPTAB* gene in proportional size, and the numbers on the top of the boxes represent the last nucleotide of that exon. The pathogenic variations identified in ML II or ML II and III alpha/beta patients are represented with \* and #, respectively. The dotted line represents the S1P cleavage site.



10

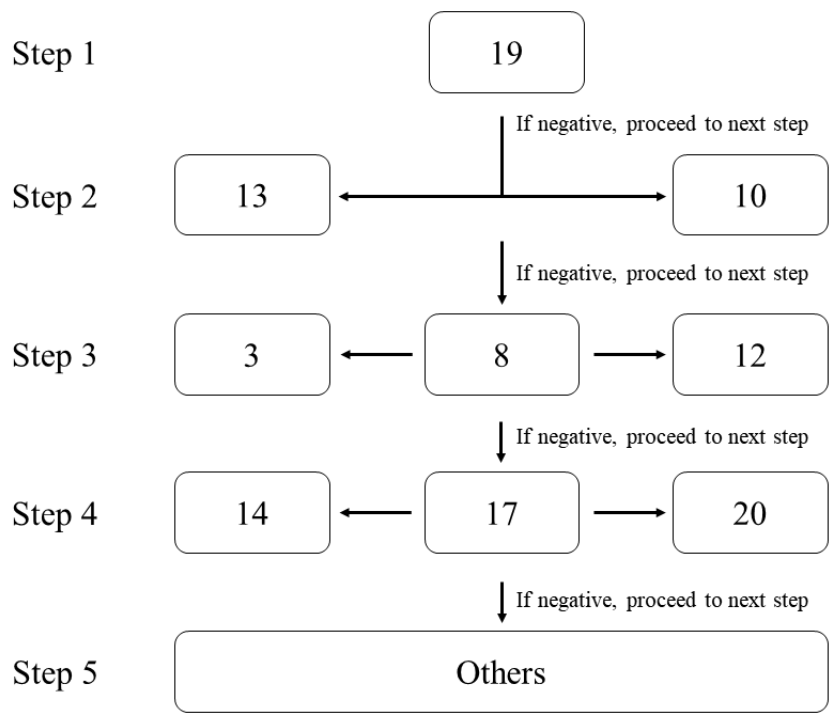
11

12

13

14

Figure 2 – **The distribution of pathogenic variations identified in the Brazilian ML II and III alpha/beta patients.** The five regions of the country are shown with different colors, the two letters code identified the state. Private pathogenic variations are the variations identified once in the population.



1  
 2 **Figure 3 – The sequential protocol for molecular diagnosis of ML II and III alpha/beta**  
 3 **patients for diagnose Brazilian patients.**



1 Table 1 – The Clinical, geographical and genetic information of the 33 Brazilian patients included in this work

Patient ID	Phenotype	Consanguinity	Region of Origin	Genotype (cDNA) Allele 1/ Allele2	Exon	Reference
1	II	No	Northeast	c.3503_3504del/c.3503_3504del	19/19	Cury et al. 2013
2	II	No	Midwest	c.3503_3504del/c.3503_3504del	19/19	Cury et al. 2013
3	II	No	Midwest	c.2808A>G/c.3503_3504del	14/19	Cury et al. 2013
4	II	Yes	Northeast	c.3503_3504del/c.3503_3504del	19/19	Cury et al. 2013
5	III	No	Southeast	c.1514G>A/c.1759C>T	12/13.1	Cury et al. 2013
6	II	No	Southeast	c.2269_2273del/c.2269_2273del	13.2/13.2	Cury et al. 2013
7	III	No	South	c.1196C>T/c.3503_3504del	10/19	Cury et al. 2013
8	III	No	Northeast	c.1208T>C/c.3503_3504del	19/10	Cury et al. 2013
9	III	No	Northeast	c.3503_3504del/?	19/?	Cury et al. 2013
10	II	No	Southeast	c.1123C>T/?	10/?	Cury et al. 2013
11	III	No	Southeast	c.1931C>T/c.3668_3670del	13.1/20	Velho et al. 2015
12	III	No	Southeast	c.1208T>C/c.1723G>A	10/13.1	Sperb-Ludwig et al. 2015
13	II	Yes	Southeast	c.3503_3504del/c.3503_3504del	19/19	Ludwig et al. 2017
14	II	No	Southeast	c.242G>T/c.2249dup	3/13.2	Ludwig et al. 2017
15	II	No	Southeast	c.1154C>T/c.3503_3504del	19/10	Ludwig et al. 2017
16	II	No	Southeast	c.2249dup/c.3503_3504del	19/13.2	Ludwig et al. 2017
17	II	No	South	c.831del/c.3503_3504del	19/8	Ludwig et al. 2017
18	II	No	Southeast	c.242G>T/c.1924_1927del	3/13.1	Ludwig et al. 2017
19	III	No	Southeast	c.1208T>C/c.832C>T	10/8	Ludwig et al. 2017
20	II	Yes	Northeast	c.3503_3504del/c.3503_3504del	19/19	Ludwig et al. 2017
21	II	No	Northeast	c.1763insA/c.3333T>G	13.1/17	Ludwig et al. 2017
22	III	No	Northeast	c.1514G>A/c.3503_3504del	19/12	Ludwig et al. 2017
23	III	No	Northeast	c.1208T>C/c.3503_3504del	19/10	Ludwig et al. 2017
24	III	No	Northeast	c.1208T>C/c.3503_3504del	19/10	Ludwig et al. 2017
25	II	Yes	Northeast	c.227A>G/c.227A>G	3/3	Ludwig et al. 2017
26	III	No	Southeast	r.86_116conNM_024312.5:19_49 <sup>1</sup> /c.242G>T	1 <sup>2</sup> /3	Alegra et al. 2019
27	II	No	Southeast	c.2249dup/c.2249dup	13/13	Di Lorenzo et al 2020
28	III	No	South	c.1196C>T/c.2757_2758del	10/14	Di Lorenzo et al 2020
29	III	Yes	South	c.1196C>T/c.1196C>T	10/10	This study
30	III	No	Midwest	c.1208T>C/c.3503_3504del	19/10	This study
31	II	Yes	Southeast	c.3503_3504del/c.3503_3504del	19/19	This study
32	II	No	North	<b>c.2034dup/c.2720_2721del</b>	13/14	This study

2 <sup>1</sup> This pathogenic variation was identified using RT-PCR. Pathogenic variations being described for the first time are presented in bold.

1 **Supplementary material**

2  
3 **S Table 1 – Allelic frequencies in healthy individuals’ database of pathogenic variations identified in more de one allele in Brazil**

Pathogenic variation		Population								
		South Asian	European (non-Finnish)	Other	Latino	African	European (Finnish)	Ashkenazi Jewish	East Asian	Total
c.3503_3504del	Allele count	23	83	4	19	5	5	0	0	139
	Allele number	30614	129086	7216	35422	24968	25114	10370	19954	282744
	Allele frequency	0.000751	0.000643	0.000554	0.000536	0.0002	0.000199	0	0	0.000492
c.2249dup	Allele count	0	2	0	0	0	0	0	0	2
	Allele number	30082	112630	6048	34006	16186	21554	9930	18280	248716
	Allele frequency	0	0.00001776	0	0	0	0	0	0	0.000008041
c.1514G>A	Allele count	0	3	0	0	0	0	0	0	3
	Allele number	30616	113734	6132	34590	16256	21648	10076	18394	251446
	Allele frequency	0	0.00002638	0	0	0	0	0	0	0.00001193
c.1208T>C	Allele count	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	Allele number	30616	113680	6134	34588	16256	21644	10080	18394	251392
	Allele frequency	0	0.000008797	0	0	0	0	0	0	0.000003978
c.1196C>T	Allele count	1	4	0	0	0	0	0	0	5
	Allele number	30616	129126	7224	35434	24970	25122	10364	19954	282810
	Allele frequency	0.00003266	0.00003098	0	0	0	0	0	0	0.00001768

4 Data from gnomAD v2.1.1.

1 S Table 2 – Frequencies of pathogenic variations in sub-populations of Non-Finnish  
 2 Europeans

Pathogenic variation	Sub-Population							
	Overall	Southern European	North-western European	Swedish	Other non-Finnish European	Estonian	Bulgarian	
c.3503_3504del	Allele count	83	9	36	16	20	2	0
	Allele number	129086	11600	50758	26132	33102	4826	2668
	Allele frequency	0.000643	0.000776	0.000709	0.000612	0.000604	0.000414	0
c.2249dup	Allele count	2	0	2	0	0	0	0
	Allele number	112630	11426	41672	26058	30572	240	2662
	Allele frequency	0.00001776	0	0.00004799	0	0	0	0
c.1514G>A	Allele count	3	0	0	0	3	0	0
	Allele number	113734	11500	42208	26134	30982	242	2668
	Allele frequency	0.00002638	0	0	0	0.00009683	0	0
c.1208T>C	Allele count	1	0	0	0	1	0	0
	Allele number	113680	11498	42186	26130	30954	242	2670
	Allele frequency	0.000008797	0	0	0	0.00003231	0	0
c.1196C>T	Allele count	4	0	2	0	1	1	0
	Allele number	129126	11604	50778	26132	33108	4834	2670
	Allele frequency	0.00003098	0	0.00003939	0	0.0000302	0.000207	0

3 Data from gnomAD v2.1.1.

## Discussão

### *O sítio catalítico da GlcNAc-1-fosfotransferase*

A identificação de proteínas mutantes da GlcNAc-1-fosfotransferase que são transcritas, transportadas e clivadas pela S1P de maneira semelhante a proteína selvagem em pacientes, levantou a hipótese de que esses resíduos estão diretamente envolvidos na ação de transferir a molécula GlcNAc-1-fosfato, do doador UDP-GlcNAc, para a manose presente na hidrolase lisossômica (Qian et al. 2014). É necessário pontuar que esses aminoácidos são essencialmente identificados em regiões denominadas como domínios Stealth (CR1-CR4), que são uma família de proteínas encontradas em diferentes enzimas da classe fosfotransferase e particularmente estudadas em bactérias.

Do ponto de vista bioquímico, a ação da GlcNAc-1-fosfotransferase é, em outras palavras, catalisar a transferência de elétrons entre os átomos presentes no GlcNAc-1-fosfato e no resíduo de manose. Sendo assim, os aminoácidos que realizam essa transferência possivelmente são classificados como hidrofílicos, pois estão presentes no exterior da proteína, o que facilitaria a interação com as moléculas supracitadas, e porque estes apresentam átomos eletricamente carregados que facilitam a transferência de elétrons (Dill 1990). Nesse sentido, nossa análise de alinhamento de sequência de diferentes enzimas, de diferentes organismos, que realizam a transferência de moléculas de fosfato e que apresentam domínios Stealth, identificou um conjunto de aminoácidos que são conservados ao longo de todas as sequências analisadas. Dentre estes, identificamos os resíduos hidrofílicos p.Glu389, p.Asp408, p.His956 e p.Arg986 que podem estar envolvidos na ação catalítica da GlcNAc-1-fosfotransferase, uma vez que a modificação desses resíduos não acarreta prejuízos no transporte, clivagem e localização da proteína mutante. Contudo, é observada uma diminuição expressiva ou total da atividade residual da enzima e que, subsequentemente, está relacionada ao fenótipo patológico das ML II/III. Existem proteínas mutantes identificadas que apresentam padrão fisiopatológicos semelhantes, mas que não foram identificadas em nossas análises de alinhamento, como é o caso da p.Ser385Leu, identificada em um paciente brasileiro com ML II.

É importante ressaltar que, mesmo que nossos dados aumentem as evidências de que os domínios Stealth são responsáveis por realizar a atividade catalítica da GlcNAc-1-

fosfotransferase, nossa abordagem é indireta e especulativa, uma vez que não foi analisado se esses aminoácidos são importantes para a transferência de elétrons ou a interação-ligação com a molécula de UDP-GlcNAc. Ainda, experimentos para resolver a estrutura quaternária da GlcNAc-1-fosfotransferase dependerão de técnicas dispendiosas como cristalografia ou ressonância magnética nuclear, ou uma combinação de ambas. Nesse sentido, um trabalho recente resolveu a estrutura quaternária da enzima Descobridora, demonstrando que quatro aminoácidos são responsáveis por interagir com o substrato GlcNAc e três com o fosfato, e dois destes realizam a hidrólise que separa ambos os substratos (Gorelik and Illes 2020).

#### *As variantes do tipo troca de sentido retiradas no RE*

Um incremento substancial sobre o entendimento da GlcNAc-1-fosfotransferase foi observado quando modelos celulares superexpressando variantes do tipo troca de sentido identificadas em pacientes foram iniciados. Essa estratégia se demonstrou particularmente efetiva, uma vez que permitiu identificar a função dos domínios NOTCH 1 e 2, DMAP e Stealth, além de identificar a região de interação entre a subunidade  $\alpha$  e  $\gamma$  (Qian et al. 2014; van Meel et al. 2016; Velho et al. 2016a).

Dentre as mais de 38 variantes já estudadas com essa estratégia, as proteínas mutantes p.Arg334Gln, p.Ser399Phe, p.Ile403Thr, localizadas na subunidade  $\alpha$ , e p.Leu1001Pro e p.Asp1018Gly, localizadas na subunidade  $\beta$ , apresentam a característica em comum de prejuízo na capacidade de transporte do RE ao complexo de Golgi, etapa indispensável para garantir um complexo enzimático ativo. Além destas, a alteração p.Asp76Gly, identificada em um paciente brasileiro (resultados, capítulo 2), e as p. Ile346Ala, p.Trp357Ala, p.Leu380Ala, p.Glu389Ala e p.Asp408Ala (todas inseridas artificialmente em laboratório(Velho et al. 2015b)), também apresentam características semelhantes. É importante ressaltar que os motivos sinais N- e C-terminais <sup>5</sup>Leu-Leu<sup>6</sup> e <sup>1253</sup>Arg-Ile-Arg<sup>1255</sup>, respectivamente, não são afetados por esses mutantes, pois eles são identificados na porção luminal do precursor  $\alpha\beta$ . Outras características que precisam ser ressaltadas são os fatos de que esses mutantes não apresentam uma diminuição da expressão proteica nem uma diminuição do peso molecular (que pudesse indicar ausência de modificação pós-traducional, como é observado nas proteínas mutantes p.Val27Asp e p.Val28Asp (Lee et al. 2020) do precursor  $\alpha\beta$  quando comparado ao selvagem. Esses fatos juntos parecem indicar

que essas proteínas mutantes são transcritas, inseridas no lúmen do RE e recebem modificações como N-glicosilação, contudo, são incapazes de serem transportadas ao complexo de Golgi.

Aliado às informações citadas anteriormente, dados de estabilidade foram descritos para a proteína mutante p.Ser399Phe e podem ajudar no entendimento do prejuízo no transportado observado. Utilizando uma estratégia de pulso-perseguição (van Meel et al. 2014) (do inglês *pulse-chase*) com meio de cultura contendo os aminoácidos modificados metionina/cisteína<sup>35S</sup>, foi demonstrado que a proteína mutante não apresenta diferença perceptível em experimentos de *blotting*. Vale destacar que não foram realizadas análises de densitometria do precursor  $\alpha\beta$  quando comparado ao selvagem, e que ambos são praticamente indetectáveis após 8 horas. Esse fato pode indicar que a incapacidade de transporte ao complexo de Golgi da proteína mutante p.Ser399Phe não é devido à rápida degradação desta no RE.

Outra informação importante de ressaltar é a capacidade da GlcNAc-1-fosfotransferase de interagir diretamente com proteínas componentes do sistema COPII (Franke et al. 2013) e COPI (Liu et al. 2018) no RE e complexo de Golgi, respectivamente. Como as proteínas mutantes que permanecem retidas no RE estão distantes dos sinais, em princípio únicos e suficientes, responsáveis pelo transporte do precursor  $\alpha\beta$  ao complexo de Golgi, são necessários outros estudos que avaliem a possibilidade de (1) incapacidade desses mutantes em interagir com o sistema COPII ou (2) a existência de outras proteínas ainda não descritas que são necessárias ao transporte, e que a interação com estas é prejudicada nessas proteínas mutantes.

### *Diagnóstico das ML II/III*

As ML II/III são doenças genéticas raras e que necessitam de diagnóstico elaborado que dependem de uma equipe multidisciplinar. O gene *GNPTAB* é considerado heterogêneo em função da grande quantidade de variantes patogênicas descritas e da grande representatividade de variantes privadas (Velho et al. 2019). No Brasil, foram identificadas 24 variantes diferentes, sendo 75% privadas e apenas 6 variantes encontradas em mais de um paciente. O éxon 19 apresenta a maior quantidade de alelos afetados, em função da pequena deleção c.3503\_3504del, seguido do éxon mais extenso, 13, com 8 variantes

diferentes. O éxon 10 é o terceiro mais frequentemente alterado, muito em função da alta prevalência da alteração de troca de sentido c.1208T>C (n=6 alelos). Sendo assim, a implementação do protocolo para pesquisa por variantes patogênicas no gene *GNPTAB* em seis pacientes brasileiros permitiu finalizar o diagnóstico genético analisando uma quantidade inferior de éxons, o que em outras palavras significa dizer que foi necessário uma quantidade menor de reações de PCR, purificações e sequenciamentos para identificar as duas variantes patogênicas esperadas a causar as doenças. Todos os seis pacientes diagnosticados seguindo o protocolo apresentaram variantes em éxons previamente já alterados, tornando essa estratégia eficiente e interessante. Como altas percentagens de variantes privadas são encontradas no gene *GNPTAB* (72% e 75% no mundo e Brasil, respectivamente), é esperada a identificação de novas variantes e que, uma parte destas, serão encontradas em éxons ainda não alterados. Sendo assim, eventualmente o diagnóstico genético poderá necessitar de uma análise mais abrangente de éxons, mas no geral é esperado que o protocolo proporcione a identificação de ambas as variantes patogênicas com uma diminuição de tempo e recursos financeiros.

O sequenciamento de Sanger é capaz de realizar o diagnóstico genético de 90-95% dos pacientes (Braulke et al. 2015). No entanto, mesmo que globalmente utilizado para o diagnóstico de doenças genéticas, a técnica possui algumas limitações que podem diminuir a sensibilidade para variantes patogênicas do tipo mudança de *splicing*, em particular aquelas causadas por variantes distantes dos éxons, ou variantes no número de cópias, como deleções e inserções. A utilização de diferentes metodologias de diagnóstico genético se faz necessária para resolver os casos onde o sequenciamento de Sanger pode apresentar limitações. Nesse sentido, a implementação do RT-PCR permitiu que fosse finalizado o diagnóstico genético de um paciente com ML III alfa/beta (capítulo 3 dos resultados) ao identificar a nova alteração do tipo conversão r.86\_116conNM\_024312.5:19\_49. Como as análises realizadas no éxon 1 e regiões adjacentes próximas (5' UTR e íntron 1) não identificaram variantes na amostra de gDNA que expliquem o resultado identificado no mRNA do paciente, e que as possibilidades de grandes deleções ou *allelic dropout* podem ser excluídas, a possibilidade de alguma alteração longe da fronteira éxon-íntron, bastante profunda no íntron (*deep intronic*), por exemplo, poderia explicar o fenótipo observado. Nesse ponto, é importante ressaltar que o íntron 1 se estende por 33 Kb.

Já faz alguns anos que a análise dos genes *GNPTAB* e *GNPTG* através da técnica de Sequenciamento de Nova Geração está disponível em nosso centro de pesquisa. Em função do custo ainda considerável e do pequeno número de amostras de pacientes, a utilização dessa ferramenta como primeira escolha para o diagnóstico de ML II/III ainda não é uma realidade. Contudo, para alguns casos onde nossa estratégia de diagnóstico padrão não foi suficiente para identificar ambas as variantes patogênicas, a utilização do sequenciamento de terceira geração apenas confirmou os achados prévios. Enquanto esse fato demonstra a robustez do sequenciamento de Sanger, também aponta a necessidade de incorporação de uma metodologia diagnóstica com sensibilidade para a detecção de variantes que causem mudança no número de cópias. Recentes abordagens com a plataforma de sequenciamento de nova geração (Brusius-Facchin et al. 2019) permitem que interrogações nesse sentido sejam realizadas, e podem facilmente ser implantadas; além disso, o desenvolvimento e implementação de outras técnicas como MLPA ou aCGH (Benito-Sanz et al. 2017) podem ser úteis para a resolução de casos de diagnóstico genético incompleto.

#### *Avaliação da atividade da GlcNAc-1-fosfotransferase*

A atividade enzimática da GlcNAc-1-fosfotransferase é um experimento complexo que utiliza o doador do resíduo de fosfato, a molécula UDP-GlcNAc, modificado radioativamente (Varki et al. 1981). O experimento atualmente é realizado em poucos laboratórios, um na Alemanha e outro no USA, e recentemente nosso grupo de pesquisa adquiriu os reagentes para realizar o ensaio aqui no Brasil. Durante o período de realização dessa tese, o grupo realizou a padronização do ensaio em leucócitos de duas amostras controles e de um paciente com ML III alfa/beta, e os resultados foram condizentes com os publicados previamente.



## Conclusões por objetivo

As conclusões da presente tese serão apresentadas de acordo com os objetivos específicos:

- **Objetivo específico 1** - *Caracterizar o impacto funcional das variantes p.Asp76Gly, p.Ser385Leu, p.Glu389Lys, p.Asp408Asn, p.His956Tyr e p.Arg986Cys de GNPTAB, identificadas em pacientes com ML II/III.*
  - As variantes p.Asp76Gly, p.Ser385Leu, p.Glu389Lys e p.Asp408Asn podem ser consideradas, segundo o *American College of Medical Genetics*, como patogênicas;
  - O resíduo p.Ser385 parece ser importante para a atividade catalítica da GlcNAc-1-fosfotransferase;
  - O resíduo p.Asp76 é importante para o transporte do precursor  $\alpha\beta$  do retículo endoplasmático ao complexo de Golgi;
  - Os resíduos p.Glu389, p.Asp408, p.His956 e p.Arg986 são importantes para a atividade catalítica da GlcNAc-1-fosfotransferase, por realizar a transferência de elétrons que ocasionará na ligação do GlcNAc-1-fosfato à manose, ou por agir na interação-ligação com o substrato UDP-GlcNAc ou na ancoragem desse para que a catálise ocorra.
- **Objetivo específico 2** - *Caracterizar o perfil de variantes patogênicas identificadas no gene GNPTAB em pacientes brasileiros com diagnóstico clínico e bioquímico de ML II/III, e sua distribuição nas regiões brasileiras.*
  - O sequenciamento das regiões exônicas e junções éxon/intron do gene *GNPTAB*, pelo método de Sanger, é uma ferramenta eficiente de diagnóstico genético de pacientes brasileiros com ML II/III;
  - As ML II e III alfa/beta apresentam grande heterogeneidade alélica, com alta frequência de variantes privadas;
  - As classes de variantes do tipo mudança de fase de leitura e troca de sentido são as mais frequentemente encontradas em pacientes brasileiros com ML II e III alfa/beta;
  - Os éxons de *GNPTAB* que apresentam o maior número de diferentes variantes patogênicas são o 13 e o 10;

-A variante mais frequentemente encontrada em *GNPTAB* é a c.3503\_3504del (localizada no éxon 19), seguida pelas variantes c.1208T>C (éxon 10), c.2249dup (éxon 13), c.242G>T (éxon 3) e c.1196C>T (éxon 10);

-As variantes c.3503\_3504del e c.1208T>C apresentam ampla distribuição no Brasil, sendo que a primeira contribui para a maioria dos alelos identificados nas regiões Nordeste, Centro-oeste e Sudeste, enquanto a variante c.242G>T é encontrada em dois estados da região Sudeste do Brasil;

-As variantes c.2249dup e c.1196C>T foram identificadas apenas nos estados de São Paulo e Santa Catarina, respectivamente, onde contribuem para a maioria dos alelos identificados naqueles estados.

- **Objetivo específico 3** - *Desenvolver um protocolo de diagnóstico genético para o gene GNPTAB de pacientes com diagnóstico clínico e bioquímico de ML II/III.*

-O protocolo proposto para a identificação de variantes patogênicas do gene *GNPTAB* inclui a análise sequencial, pelo método Sanger, dos éxons 19 (etapa 1); 13 e 10 (etapa 2); 3, 8 e 12 (etapa 3); e 14, 17 e 20 (etapa 4). A análise dos éxons inseridos na etapa 5 do protocolo será aleatória e realizada apenas para as amostras negativas para duas variantes patogênicas até o final da etapa 4.

## Considerações finais e perspectivas

Com os resultados da presente tese é possível determinar vários aspectos importantes para o campo científico internacional e nacional das ML II/III. Contudo, nossos resultados também possibilitam que novos questionamentos possam ser realizados e, portanto, são perspectivas para próximos passos da linha de pesquisa:

- Investigar a incomum regionalização das variantes patogênicas c.2249dup e c.1196C>T e descrever as possíveis explicações para esse fenômeno;
- Investigar a incomum alta frequência alélica da alteração patogênica c.1208T>C na população brasileira de pacientes com ML II/III;
- Avaliar o papel dos aminoácidos p.Asp76, p.Arg334, p.Ser399, p.Ile403, p.Leu1001 e p.Asp1018, que quando alterados apresentam a característica de retenção da proteína mutante no RE;
- Avaliar o papel dos aminoácidos p.Trp81, p.Phe374 e p.Ser385 para a atividade catalítica da GlcNAc-1-fosfotransferase, uma vez que mutantes desses resíduos estão localizados no complexo de Golgi e apresentam uma atividade residual muito baixa;
- Implementar no diagnóstico genético outras técnicas que apresentem sensibilidade diagnóstica para grandes variantes patogênicas, como deleções e duplicação;
- Introduzir o ensaio da atividade residual da GlcNAc-1-fosfotransferase para a rotina do laboratório com o intuito de gerar dados que contribuam para o entendimento da relação genótipo-fenótipo;
- Desenvolver e implementar o sistema de avaliação *in vitro* da patogenicidade de variantes patogênicas do tipo mudança de *splicing*.

## Referências Bibliográficas

- Abramowicz A and Gos M (2019) Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *J Appl Genet* 60:231–231. doi: 10.1007/s13353-019-00493-z
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Wilson J, Walter P and Hunt T (2017) *Analisando células, moléculas e sistemas*.
- Alegria T, Cury G, Todeschini LA and Schwartz IVD (2013) Should neonatal hyperparathyroidism associated with mucopolipidosis II/III be treated pharmacologically? *J Pediatr Endocrinol Metab* 26:1011–3. doi: 10.1515/jpem-2012-0356
- Alegria T, Sperb-Ludwig F, Guarany NR, Ribeiro EM, Lourenço CM, Kim CA, Valadares ER, Galera MF, Acosta AX, Horovitz DDG et al. (2019) Clinical Characterization of Mucopolipidoses II and III: A Multicenter Study. *J Pediatr Genet* 198–204. doi: 10.1055/s-0039-1697605
- Alfadhel M, Alshehhi W, Alshaalan H, Balwi Mohammed A and Eyaida W (2013) Mucopolipidosis II: first report from Saudi Arabia. *Ann Saudi Med* 33:382–386. doi: 10.5144/0256-4947.2013.382
- Bajaj L, Lotfi P, Pal R, Ronza A di, Sharma J and Sardiello M (2019) Lysosome biogenesis in health and disease. *J Neurochem* 148:573–589. doi: 10.1111/jnc.14564
- Bao M, Elmendorf BJ, Booth JL, Drake RR and Canfield WM (1996) Bovine UDP- N -acetylglucosamine : Lysosomal-enzyme N -Acetylglucosamine-1-phosphotransferase II Enzymatic Characterization and Identification of the Catalytic Subunit. 271:31446–31451.
- Barea JJ, van Meel E, Kornfeld S and Bird LM (2015) Tuberous sclerosis, polycystic kidney disease and mucopolipidosis III gamma caused by a microdeletion unmasking a recessive mutation. *Am J Med Genet Part A* 167:2844–2846. doi: 10.1002/ajmg.a.37213
- Bargal R, Zeigler M, Abu-Libdeh B, Zuri V, Mandel H, Ben Neriah Z, Stewart F, Elcioglu N, Hindi T, Merrer ML et al. (2006) When Mucopolipidosis III meets Mucopolipidosis II: GNPTA gene mutations in 24 patients. *Mol Genet Metab* 88:359–363. doi: 10.1016/j.ymgme.2006.03.003
- Barnes JW, Aarnio-Peterson M, Norris J, Haskins M, Flanagan-Steet H and Steet R (2020) Upregulation of sortilin, a lysosomal sorting receptor, corresponds with reduced bioavailability of latent TGFβ in mucopolipidosis II cells. *Biomolecules* 10:1–19. doi: 10.3390/biom10050670
- Benito-Sanz S, Belinchon-Martínez A, Aza-Carmona M, De La Torre C, Huber C, González-Casado I, Ross JL, Thomas NS, Zinn AR, Cormier-Daire V et al. (2017) Identification of 15 novel partial SHOX deletions and 13 partial duplications, and a review of the literature reveals intron 3 to be a hotspot region. *J Hum Genet* 62:229–234. doi: 10.1038/jhg.2016.113
- Blanz J, Zunke F, Markmann S, Damme M, Braulke T, Saftig P and Schwake M (2015) Mannose 6-phosphate-independent Lysosomal Sorting of LIMP-2. *Traffic* 16:1127–1136. doi: 10.1111/tra.12313

- Boonen M, van Meel E, Oorschot V, Klumperman J and Kornfeld S (2011) Vacuolization of mucopolysaccharidosis type II mouse exocrine gland cells represents accumulation of autolysosomes. *Mol Biol Cell* 22:1135–47. doi: 10.1091/mbc.E10-07-0584
- Braulke T, Raas-Rothschild A and Kornfeld S (2015) I - Cell Disease and Pseudo - Hurler Polydystrophy : Disorders of Lysosomal Enzyme Phosphorylation and Localization. *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. pp 1–31
- Brusius-Facchin AC, Siebert M, Leão D, Malaga DR, Pasqualim G, Trapp F, Matte U, Giugliani R and Leistner-Segal S (2019) Phenotype-oriented ngs panels for mucopolysaccharidoses: Validation and potential use in the diagnostic flowchart. *Genet Mol Biol* 42:207–214. doi: 10.1590/1678-4685-gmb-2018-0102
- Canuel M, Korkidakis A, Konnyu K and Morales CR (2008) Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H. *Biochem Biophys Res Commun* 373:292–297. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.06.021
- Castonguay AC, Olson LJ and Dahms NM (2011) Mannose 6-Phosphate Receptor Homology (MRH) Domain-Containing Lectins in the Secretory Pathway Alicia. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 72:181–204. doi: 10.1038/nature13314.A
- Cathey S, Kudo M, Tiede S, Raas-Rothschild A, Braulke T, Beck M, Taylor HA, Canfield WM, Leroy JG, Neufeld EF et al. (2008) Molecular Order in Mucopolysaccharidosis II and III Nomenclature. *Am J Med Genet A* 143A:2106–2112. doi: 10.1002/ajmg.a
- Cathey S, Leroy JG, Wood T, Eaves K, Simensen RJ, Kudo M, Stevenson RE and Friez MJ (2010) Phenotype and Genotype in Mucopolysaccharidoses II and III alpha/beta: A Study of 61 Probands. 47:38–48. doi: 10.1136/jmg.2009.067736.Phenotype
- Ceroni JRM, Spolador GM, Bermeo DS, Honjo RS, de Oliveira LAN, Bertola DR and Kim CA (2019) Clinical and radiological findings in Brazilian patients with mucopolysaccharidosis types II/III. *Skeletal Radiol* 48:1201–1207. doi: 10.1007/s00256-019-3159-x
- Chien YH, Lee NC, Chen PW, Yeh HY, Gelb MH, Chiu PC, Chu SY, Lee CH, Lee AR and Hwu WL (2020) Newborn screening for Morquio disease and other lysosomal storage diseases: Results from the 8-plex assay for 70,000 newborns. *Orphanet J Rare Dis* 15:1–7. doi: 10.1186/s13023-020-1322-z
- Cobos; PN, Steglich C, Santer R, Lukacs Z and Gal A (2013) Dried Blood Spots Allow Targeted Screening to Diagnose Mucopolysaccharidosis and Mucopolysaccharidosis. *Am J Med Genet* 30:859–864. doi: 10.1007/8904
- Coutinho M (2014) N-Acetylglucosamine-1-Phosphate Transferase, Alpha/Beta and Gamma Subunits (GNPTAB, GNPTG). In: Taniguchi N, Honke K, Fukuda M, Narimatsu H, Yamaguchi Y and Angata T (eds) *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*, 2<sup>a</sup> EDIÇÃO. Springer Japan, Tokyo, pp 1335–1347
- Coutinho M, Encarnação M, Gomes R, da Silva Santos L, Martins S, Sirois-Gagnon D, Bargal R, Filocamo M, Raas-Rothschild A, Tappino B et al. (2011) Origin and spread of a common deletion causing mucopolysaccharidosis type II: insights from patterns of haplotypic diversity. *Clin Genet* 80:273–80. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01539.x
- Coutinho MF, Encarnação M, Laranjeira F, Lacerda L, Prata MJ and Alves S (2016) Solving

a case of allelic dropout in the GNPTAB gene: implications in the molecular diagnosis of mucopolidiosis type III alpha/beta. *J Pediatr Endocrinol Metab* 29:1225–1228. doi: 10.1515/jpem-2016-0173

Coutinho MF, Prata MJ and Alves S (2012) A shortcut to the lysosome: The mannose-6-phosphate-independent pathway. *Mol Genet Metab* 107:257–266. doi: 10.1016/j.ymgme.2012.07.012

Cury GK, Matte U, Artigalás O, Alegria T, Velho R V, Sperb F, Burin MG, Ribeiro EM, Lourenço CM, Kim C a et al. (2013) Mucopolidiosis II and III alpha/beta in Brazil: analysis of the GNPTAB gene. *Gene* 524:59–64. doi: 10.1016/j.gene.2013.03.105

David-Vizcarra G, Briody J, Ault J, Fietz M, Fletcher J, Savarirayan R, Wilson M, McGill J, Edwards M, Munns C et al. (2010) The Natural History and Osteodystrophy of Mucopolidiosis Types II and III. *J Paediatr Child Heal* 454:316–322. doi: 10.1111/j.1440-1754.2010.01715.x. The

De Braekeleer M. (1991) Hereditary Disorders in Saguenay-Lac-St-Jean (Quebec, Canada). *Hum hered* 41:141–146. doi: 10.1159/000153992

de Duve C (2005) The lysosome turns fifty. *Nat Cell Biol* 7:847–849. doi: 10.1038/ncb0905-847

De Pace R (2014) Structural requirements for transport and subunit interactions of the GlcNAc-1-phosphotransferase complex. University of Hamburg

De Pace R, Coutinho MF, Koch-Nolte F, Haag F, Prata MJ, Alves S, Bräulke T and Pohl S (2014) Mucopolidiosis II-related mutations inhibit the exit from the endoplasmic reticulum and proteolytic cleavage of GlcNAc-1-phosphotransferase precursor protein (GNPTAB). *Hum Mutat* 35:368–76. doi: 10.1002/humu.22502

Di Lorenzo G, Velho RV, Winter D, Thelen M, Ahmadi S, Schweizer M, De Pace R, Cornils K, Yorgan TA, Grüb S et al. (2018) Lysosomal Proteome and Secretome Analysis Identifies Missorted Enzymes and Their Nondegraded Substrates in Mucopolidiosis III Mouse Cells. *Mol Cell Proteomics* 17:1612–1626. doi: 10.1074/mcp.ra118.000720

di Ronza A, Bajaj L, Sharma J, Sanagasetti D, Lotfi P, Adamski CJ, Collette J, Palmieri M, Amawi A, Popp L et al. (2018) CLN8 is an endoplasmic reticulum cargo receptor that regulates lysosome biogenesis. *Nat Cell Biol* 20:1370–1377. doi: 10.1038/s41556-018-0228-7

Dill KA (1990) Dominant Forces in Protein Folding. *Biochemistry* 29:7133–7155. doi: 10.1021/bi00483a001

Duve C de, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R and Appelmans F (1954) Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissues. 604–617.

Egea PF, Stroud RM and Walter P (2005) Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Curr Opin Struct Biol* 15:213–220. doi: 10.1016/j.sbi.2005.03.007

Ellsworth KA, Pollard LM, Cathey S and Wood T (2016) Measurement of Elevated Concentrations of Urine Keratan Sulfate by UPLC-MSMS in Lysosomal Storage Disorders (LSDs): Comparison of Urine Keratan Sulfate Levels in MPS IVA Versus Other LSDs. *JIMD*

Rep. doi: 10.1007/8904

Encarnação M, Kollmann K, Trusch M, Braulke T and Pohl S (2011) Post-translational modifications of the gamma-subunit affect intracellular trafficking and complex assembly of GlcNAc-1-phosphotransferase. *J Biol Chem* 286:5311–8. doi: 10.1074/jbc.M110.202382

Encarnação M, Lacerda L, Costa R, Prata MJ, Coutinho MF, Ribeiro H, Lopes L, Pineda M, Ignatius J, Galvez H et al. (2009) Molecular analysis of the GNPTAB and GNPTG genes in 13 patients with mucopolipidosis type II or type III - identification of eight novel mutations. *Clin Genet* 76:76–84. doi: 10.1111/j.1399-0004.2009.01185.x

Fernanda Sperb-Ludwig, Alegra T, Velho RV, Ludwig N, Siebert M, Jobim M, Vairo F, Schwartz IVD, Sperb-Ludwig F, Alegra T et al. (2019) Humoral immune response in adult Brazilian patients with Mucopolipidosis III gamma. *Genet Mol Biol* 573:571–573. doi: 10.1590/1678-4685-gmb-2018-0246

Flanagan-Steet H, Sias C and Steet R (2009) Altered chondrocyte differentiation and extracellular matrix homeostasis in a zebrafish model for mucopolipidosis II. *Am J Pathol* 175:2063–75. doi: 10.2353/ajpath.2009.090210

Franke M, Braulke T and Storch S (2013) Transport of the GlcNAc-1-phosphotransferase  $\alpha/\beta$ -subunit precursor protein to the golgi apparatus requires a combinatorial sorting motif. *J Biol Chem* 288:1238–1249. doi: 10.1074/jbc.M112.407676

Gorelik A and Illes K (2020) Crystal Structure of the Mannose-6-Phosphate Article Crystal Structure of the Mannose-6-Phosphate Uncovering Enzyme. *Struct Des* 1–11. doi: 10.1016/j.str.2020.02.001

Greene AA, Jonas AJ, Harms E, Smith ML, Pellett OL, Bump EA, Miller AL and Schneider JA (1985) Lysosomal cystine storage in cystinosis and mucopolipidosis type II. *Pediatr Res* 19:1170–1174.

H. Maxrier, Hoeven MV, Wang P, Knox VW, Aguirre GD, Holt E, Wiemelt SP, Sleeper MM, Hubler M, Haskins ME et al. (2003) Inheritance, Biochemical Abnormalities, and Clinical Features of Feline Mucopolipidosis II: The First Animal Model of Human I-Cell Disease. *J Hered* 94:363–373. doi: 10.1093/jhered/esg080

Hara M, Inokuchi T, Taniwaki T, Otomo T, Sakai N, Matsuishi T and Yoshino M (2013) An adult patient with mucopolipidosis III alpha/beta presenting with parkinsonism. *Brain Dev* 35:462–465. doi: 10.1016/j.braindev.2012.07.009

Hassan AJ, Zeng J, Ni X and Morales CR (2004) The trafficking of prosaposin (SGP-1) and GM2AP to the lysosomes of TM4 Sertoli cells is mediated by sortilin and monomeric adaptor proteins. *Mol Reprod Dev* 68:476–483. doi: 10.1002/mrd.20096

Ho C, Tsung LL, Liu K and Poon W (2018) GNPTAB c . 2404C > T nonsense mutation in a patient with mucopolipidosis III alpha / beta : a case report. *BMC Med Genet* 1–7.

Hu Y-B, Dammer EB, Ren R-J and Wang G (2015) The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Transl Neurodegener* 4:18. doi: 10.1186/s40035-015-0041-1

Kawashima I, Ohsawa M, Fukushige T, Nagayama Y, Niida Y, Kotani M, Tajima Y, Kanekura T, Kanzaki T and Sakuraba H (2007) Cytochemical analysis of storage materials

in cultured skin fibroblasts from patients with I-cell disease. *Clin Chim Acta* 378:142–146. doi: 10.1016/j.cca.2006.11.019

Khan MA, Zubaida B, Karim N, Cheema HA and Naeem M (2020) Identification of two novel variants in GNPTAB underlying mucopolipidosis II in a Pakistani family. *J Pediatr Endocrinol Metab* 33:647–651. doi: 10.1515/jpem-2019-0426

Ko A-R, Jin D-K, Cho SY, Park SW, Przybylska M, Yew NS, Cheng SH, Kim J-S, Kwak MJ, Kim SJ et al. (2016) AAV8-mediated expression of N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase attenuates bone loss in a mouse model of mucopolipidosis II. *Mol Genet Metab* 2–10. doi: 10.1016/j.ymgme.2016.02.001

Kollmann K, Damme M, Markmann S, Morelle W, Schweizer M, Hermans-Borgmeyer I, Röcher t a K, Pohl S, Lübke T, Michalski J-C et al. (2012) Lysosomal dysfunction causes neurodegeneration in mucopolipidosis II “knock-in” mice. *Brain* 135:2661–75. doi: 10.1093/brain/aws209

Kollmann K, Pestka J, Kühn S, Schöne E, Schweizer M, Karkmann K, Otomo T, Catala-Lehnen P, Failla A, Marshall R et al. (2013) Decreased bone formation and increased osteoclastogenesis cause bone loss in mucopolipidosis II. *EMBO Mol Med* 5:1871–86. doi: 10.1002/emmm.201302979

Kubaski F, Suzuki Y, Orii K, Giugliani R, Church HJ, Mason RW, D’ng VC, Ngoc CTB, Yamaguchi S, Kobayashi H et al. (2016) Glycosaminoglycan levels in dried blood spots of patients with mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses. *Mol Genet Metab*. doi: 10.1016/j.ymgme.2016.12.010

Kudo M, Bao M, D’Souza A, Ying F, Pan H, Roe B a and Canfield WM (2005) The alpha- and beta-subunits of the human UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase [corrected] are encoded by a single cDNA. *J Biol Chem* 280:36141–9. doi: 10.1074/jbc.M509008200

Kudo M, Brem MS and Canfield WM (2006) Mucopolipidosis II (I-cell disease) and mucopolipidosis IIIA (classical pseudo-hurler polydystrophy) are caused by mutations in the GlcNAc-phosphotransferase alpha / beta -subunits precursor gene. *Am J Hum Genet* 78:451–63. doi: 10.1086/500849

Kurobane I, Inoue S, Gotoh Y, Kato S, Tamura M, Narisawa K and Tada K (1986) Biochemical Treatment Transplantation Improvement by Bone Marrow in I-Cell after Disease. 63–68.

Kwak MJ, Lee HW, Kim YM, Cho SY, Park HD and Jin DK (2018) Rare association of mucopolipidosis III alpha/beta with dilated cardiomyopathy. *Ann Clin Lab Sci* 48:785–789.

Lai LM and Lachman RS (2016) Early characteristic radiographic changes in mucopolipidosis II. *Pediatr Radiol* 46:1713–1720. doi: 10.1007/s00247-016-3673-0

Lamming DW and Bar-Peled L (2019) Lysosome: The metabolic signaling hub. *Traffic* 20:27–38. doi: 10.1111/tra.12617

Langereis EJ, Wagemans T, Kulik W, Lefeber DJ, Van Lenthe H, Oussoren E, Van Der Ploeg AT, Ruijter GJ, Wevers RA, Wijburg FA et al. (2015) A multiplex assay for the diagnosis of mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses. *PLoS One* 10:1–13. doi:



10.1371/journal.pone.0138622

Lee W-S, Jennings BC, Doray B and Kornfeld S (2020) Disease-causing Missense Mutations within the N-terminal Transmembrane Domain of GlcNAc-1-phosphotransferase Impair Endoplasmic Reticulum Translocation or Golgi Retention. *Hum Mutat* 1–8. doi: 10.1002/humu.24019

Lefrancois S, Zeng J, Hassan AJ, Canuel M and Morales CR (2003) The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *EMBO J* 22:6430–6437.

Leroy JG, Cathey SS and Friez MJ (1993) GNPTAB-Related Disorders.

Leroy JG and Demars RI (1967) Mutant enzymatic and cytological phenotypes in cultured human fibroblasts. *Science* 157:804–6. doi: 10.1126/science.157.3790.804

Leroy JG, Sillence D, Wood T, Barnes J, Lebel RR, Friez MJ, Stevenson RE, Steet R and Cathey SS (2013) A novel intermediate mucopolipidosis II/III $\alpha\beta$  caused by GNPTAB mutation in the cytosolic N-terminal domain. *Eur J Hum Genet* 22:1–8. doi: 10.1038/ejhg.2013.207

Lin Liu, Lee W-S, Doray B and Kornfeld S (2017) Role of Spacer-1 in the Maturation and Function of GlcNAc-1- Phosphotransferase. *FEBS Lett* 25:289–313. doi: 10.1002/1873-3468.12525

Liu L, Doray B and Kornfeld S (2018) Recycling of Golgi glycosyltransferases requires direct binding to coatomer. *Proc Natl Acad Sci* 115:8984–8989. doi: 10.1073/pnas.1810291115

Liu L, Lee WS, Doray B and Kornfeld S (2017) Engineering of GlcNAc-1-Phosphotransferase for Production of Highly Phosphorylated Lysosomal Enzymes for Enzyme Replacement Therapy. *Mol Ther - Methods Clin Dev* 5:59–65. doi: 10.1016/j.omtm.2017.03.006

Liu S, Zhang W, Shi H, Yao F, Wei M and Qiu Z (2016) Mutation Analysis of 16 Mucopolipidosis II and III Alpha/Beta Chinese Children Revealed Genotype-Phenotype Correlations. *PLoS One* 11:e0163204. doi: 10.1371/journal.pone.0163204

Lund TC, Cathey SS, Miller WP, Eapen M, Andreansky M, Dvorak CC, Davis JH, Dalal JD, Devine SM, Eames GM et al. (2014) Outcomes after hematopoietic stem cell transplantation for children with I-cell disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 20:1847–51. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.06.019

Matos L, Vilela R, Rocha M, Santos JI, Coutinho MF, Gaspar P, Prata MJ and Alves S (2020) Development of an antisense oligonucleotide-mediated exon skipping therapeutic strategy for Mucopolipidosis II: validation at RNA level. *Hum Gene Ther* 1–23. doi: 10.1089/hum.2020.034

Meel E van, Boonen M, Zhao H, Oorschot V, Ross FP, Kornfeld S and Judith Klumperman (2011) Disruption of the Man-6-P Targeting Pathway in Mice Impairs Osteoclast Secretory Lysosome Biogenesis. *Traffic* 12:912–924. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01203.x.Disruption

Meikle PJ (1999) Prevalence of Lysosomal Storage Disorders. *Jama* 281:249. doi: 10.1001/jama.281.3.249

- Muindi KM, Mccarthy PC, Wang T, Vionnet J, Battistel M, Jankowska E and Vann WF (2014) Characterization of the meningococcal serogroup X capsule N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. *Glycobiology* 24:139–149. doi: 10.1093/glycob/cwt091
- Munro S (2001) The MRH domain suggests a shared ancestry for the mannose 6-phosphate receptors and other N-glycan-recognising proteins. *Curr Biol* 11:499–501. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00302-5
- Nampoothiri S, Elcioglu NH, Koca SS, Yesodharan D, Kk C, Krishnan V, Bhat M, Mohandas Nair K, Radhakrishnan N, Kappanayil M et al. (2019) Does the clinical phenotype of mucopolidosis-III $\gamma$  differ from its  $\alpha\beta$  counterpart?: Supporting facts in a cohort of 18 patients. *Clin Dysmorphol* 28:7–16. doi: 10.1097/MCD.0000000000000249
- Naumchik BM, Gupta A, Steet HF, Steet RA, Cathey SS, Orchard PJ and Lund TC (2020) The Role of Hematopoietic Cell Transplant in the Glycoprotein Diseases. *Cells* 1–14. doi: 10.3390/cells9061411
- Ni X and Morales CR (2006) The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor. *Traffic* 7:889–902. doi: 10.1111/j.1600-0854.2006.00429.x
- Okada S, Owada M, Sakiyama T, Yutaka T and Ogawa M (1985) I-cell disease: clinical studies of 21 Japanese cases. *Clin Genet* 28:207–215.
- Otomo T, Higaki K, Nanba E, Ozono K and Sakai N (2011) Lysosomal storage causes cellular dysfunction in mucopolidosis II skin fibroblasts. *J Biol Chem* 286:35283–90. doi: 10.1074/jbc.M111.267930
- Otomo T, Higaki K, Nanba E, Ozono K and Sakai N (2009a) Inhibition of autophagosome formation restores mitochondrial function in mucopolidosis II and III skin fibroblasts. *Mol Genet Metab* 98:393–9. doi: 10.1016/j.ymgme.2009.07.002
- Otomo T, Hossain MA, Ozono K and Sakai N (2012) Genistein reduces heparan sulfate accumulation in human mucopolidosis II skin fibroblasts. *Mol Genet Metab* 105:266–9. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.10.015
- Otomo T, Muramatsu T, Yorifuji T, Okuyama T, Nakabayashi H, Fukao T, Ohura T, Yoshino M, Tanaka A, Okamoto N et al. (2009b) Mucopolidosis II and III  $\alpha/\beta$ : mutation analysis of 40 Japanese patients showed genotype-phenotype correlation. *J Hum Genet* 54:145–51. doi: 10.1038/jhg.2009.3
- Otomo T, Schweizer M, Kollmann K, Schumacher V, Muschol N, Tolosa E, Mittrucker H-W and Braulke T (2015) Mannose 6 phosphorylation of lysosomal enzymes controls B cell functions. *J Cell Biol* 208:171–180. doi: 10.1083/jcb.201407077
- Paik KH, Song SM, Ki CS, Yu HW, Kim JS, Min KH, Chang SH, Yoo EJ, Lee IJ, Kwan EK et al. (2005) Identification of mutations in the GNPTA (MGC4170) gene coding for GlcNAc-phosphotransferase  $\alpha/\beta$  subunits in Korean patients with mucopolidosis type II or type IIIA. *Hum Mutat* 26:308–314. doi: 10.1002/humu.20205
- Pan J, Tan H and Wu L (2019) Identification of Five Novel Mutations Causing Rare Lysosomal Storage Diseases. *Med Sci Monit* 7634–7644. doi: 10.12659/MSM.915876
- Perera RM and Zoncu R (2016) The Lysosome as a Regulatory Hub. *Annu Rev Cell Dev*

Biol 32:223–253. doi: 10.1146/annurev-cellbio-111315-125125

Pino G, Conboy E, Tortorelli S, Minnich S, Nickander K, Lacey J, Peck D, Studinski A, White A, Gavrilov D et al. (2019) Multiplex testing for the screening of lysosomal storage disease in urine : Sulfatides and glycosaminoglycan profiles in 40 cases of sulfatiduria. *Mol Genet Metab* 0–1. doi: 10.1016/j.ymgme.2019.10.009

Pinto R, Caseiro C, Lemos M, Lopes L, Fontes A, Ribeiro H, Pinto E, Silva E, Rocha S, Marcão A et al. (2004) Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet* 12:87–92. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201044

Plante M, Claveau S, Lepage P, Lavoie E, Brunet S, Roquis D, Morin C, Vézina H and Laprise C (2008) Mucopolipidosis II: a single causal mutation in the N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase gene (GNPTAB) in a French Canadian founder population. *Clin Genet* 73:236–44. doi: 10.1111/j.1399-0004.2007.00954.x

Poorthuis BJHM, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JEM, De Jong JGN, Van Weely S, Niezen-Koning KE and Van Diggelen OP (1999) The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet* 105:151–156. doi: 10.1007/s004399900075

Qian Y, Flanagan-Steet H, van Meel E, Steet R and Kornfeld S a (2013) The DMAP interaction domain of UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase is a substrate recognition module. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:10246–51. doi: 10.1073/pnas.1308453110

Qian Y, Lee I, Lee W-S, Qian M, Kudo M, Canfield WM, Lobel P and Kornfeld S (2010) Functions of the alpha, beta, and gamma subunits of UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. *J Biol Chem* 285:3360–70. doi: 10.1074/jbc.M109.068650

Qian Y, van Meel E, Flanagan-Steet H, Yox A, Steet R and Kornfeld S (2014) Analysis of Mucopolipidosis II/III Missense Mutations Identifies Domains of UDP-GlcNAc:lysosomal Enzyme GlcNAc-1-phosphotransferase Involved in Catalytic Function and Lysosomal Enzyme Recognition. *J Biol Chem* 290:3045–3056. doi: 10.1074/jbc.M114.612507

Raas-Rothschild A, Cormier-Daire V, Bao M, Genin E, Salomon R, Brewer K, Zeigler M, Mandel H, Toth S, Roe B et al. (2000) Molecular basis of variant pseudo-hurler polydystrophy (mucopolipidosis IIIC). *J Clin Invest* 105:673–81. doi: 10.1172/JCI5826

Raas-Rothschild A, Pohl S and Braulke T (2012) Lysosomal storage disorders: A Practical Guide. *Br J Haematol*. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.05293.x

Reitman ML, Lang L and Kornfeld; S (1984) UDP-N-acetylglucosamine: Lysosomal Enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. *Methods Enzymol* 107:182007.

Sabatini DD and Adesnik MB (2015) The Biogenesis of Membranes and Organelles The Organization of the Eukaryotic Cell. *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. pp 1–132

Sadegh-Nasseri S and Kim A (2015) Exogenous antigens bind MHC class II first, and are processed by cathepsins later. *Mol Immunol* 68:81–84. doi: 10.1016/j.molimm.2015.07.018

Sardiello M (2016) Transcription factor EB: from master coordinator of lysosomal pathways to candidate therapeutic target in degenerative storage diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1371:3–

14. doi: 10.1111/nyas.13131

Shibazaki T, Hirabayashi K, Saito S, Shigemura T, Nakazawa Y, Sakashita K, Takagi M, Shiohara M, Adachi K, Nanba E et al. (2016) Clinical and laboratory outcomes after umbilical cord blood transplantation in a patient with mucopolysaccharidosis II alpha/beta. *Am J Med Genet Part A* n/a-n/a. doi: 10.1002/ajmg.a.37563

Soares MB, Turchetto-Zolet AC, Schwartz IVD and Sperb-Ludwig F (2020) Haplotype analysis and origin of the most common pathogenic mutation causing Mucopolysaccharidosis II and III alpha/beta in Brazilian patients. *Gene Reports* 19:100645. doi: 10.1016/j.genrep.2020.100645

Sperb-Ludwig F, Alegra T, Velho RV, Ludwig N, Kim C a., Kok F, Kitajima JP, van Meel E, Kornfeld S, Burin MG et al. (2015) Exome sequencing for mucopolysaccharidosis III: Detection of a novel GNPTAB gene mutation in a patient with a very mild phenotype. *Mol Genet Metab Reports* 2:34–37. doi: 10.1016/j.ymgmr.2014.12.001

Sperisen P, Schmid CD, Bucher P and Zilian O (2005) Stealth proteins: In silico identification of a novel protein family rendering bacterial pathogens invisible to host immune defense. *PLoS Comput Biol* 1:0492–0499. doi: 10.1371/journal.pcbi.0010063

Spranger JW and Wiedemann H-R (1970) The genetic mucopolysaccharidoses. *Hum Genet* 9:113–139. doi: 10.1007/BF00278928

Steet RA, Hullin R, Kudo M, Martinelli M, Bosshard NU, Schaffner T, Kornfeld S and Steinmann B (2005) A splicing mutation in the alpha/beta GlcNAc-1-phosphotransferase gene results in an adult onset form of mucopolysaccharidosis III associated with sensory neuropathy and cardiomyopathy. *Am J Med Genet A* 132A:369–75. doi: 10.1002/ajmg.a.30498

Tabone L, Caillaud C, Amaddeo A, Khirani S, Michot C, Couloigner V, Brassier A, Cormier-Daire V, Baujat G and Fauroux B (2019) Sleep-disordered breathing in children with mucopolysaccharidosis. *Am J Med Genet Part A* ajmg.a.61167. doi: 10.1002/ajmg.a.61167

Tappino B, Chuzhanova N, Regis S, Dardis A, Corsolini F, Stroppiano M, Tonoli E, Beccari T, Rosano C, Mucha J et al. (2009) Molecular characterization of 22 novel UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase -  $\alpha$  and  $\beta$ -subunit (GNPTAB) gene mutations causing mucopolysaccharidosis types II $\alpha$ / $\beta$  and III $\alpha$ / $\beta$  in 46 patients. *Hum Mutat* 30:956–973. doi: 10.1002/humu.21099

Tiede S, Storch S, Lübke T, Henrissat B, Bargal R, Raas-Rothschild A and Braulke T (2005) Mucopolysaccharidosis II is caused by mutations in GNPTA encoding the alpha/beta GlcNAc-1-phosphotransferase. *Nat Med* 11:1109–12. doi: 10.1038/nm1305

Tietze F and Butler JD (1979) Elevated cystine levels in cultured skin fibroblasts from patients with I-cell disease. *Pediatr Res* 13:1350–1355.

Tomatsu S, Montaña AM, Oguma T, Dung VC, Oikawa H, Gutiérrez ML, Yamaguchi S, Suzuki Y, Fukushi M, Barrera L a et al. (2010) Validation of disaccharide compositions derived from dermatan sulfate and heparan sulfate in mucopolysaccharidoses and mucopolysaccharidoses II and III by tandem mass spectrometry. *Mol Genet Metab* 99:124–31. doi: 10.1016/j.ymgme.2009.10.001

Trivedi PC, Bartlett JJ and Pulinilkunnil T (2020) Lysosomal Biology and Function : Modern

View of Cellular Debris Bin. Cells 1–37. doi: 10.3390/cells9051131

Unger S, Paul DA, Nino MC, McKay CP, Miller S, Sochett E, Braverman N, Clarke JTR, Cole DEC and Superti-Furga A (2005) Mucopolidosis II presenting as severe neonatal hyperparathyroidism. *Eur J Pediatr* 164:236–243. doi: 10.1007/s00431-004-1591-x

van Meel E and Kornfeld S (2016) Mucopolidosis III GNPTG missense mutations cause misfolding of the  $\gamma$  subunit of GlcNAc-1-phosphotransferase. *Hum Mutat* 1:1–12. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004

van Meel E, Lee W-S, Liu L, Qian Y, Doray B and Kornfeld S (2016) Multiple domains of GlcNAc-1-phosphotransferase mediate recognition of lysosomal enzymes. *J Biol Chem* jbc.M116.714568. doi: 10.1074/jbc.M116.714568

van Meel E, Qian Y and Kornfeld S (2014) Mislocalization of phosphotransferase as a cause of mucopolidosis III  $\alpha\beta$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:3532–7. doi: 10.1073/pnas.1401417111

Varki AP, Reitman ML and Kornfeld S (1981) Identification of a variant of mucopolidosis III (pseudo-Hurler polydystrophy): a catalytically active N-acetylglucosaminylphosphotransferase that fails to phosphorylate lysosomal enzymes. *Proc Natl Acad Sci* 78:7773–7777. doi: 10.1073/pnas.78.12.7773

Velho RV, Alegra T, Sperb F, Ludwig NFNF, Saraiva-Pereira MLML, Matte U and Schwartz IVDIVD (2014) A de novo or germline mutation in a family with Mucopolidosis III gamma: Implications for molecular diagnosis and genetic counseling. *Mol Genet Metab Reports* 1:98–102. doi: 10.1016/j.ymgmr.2014.01.002

Velho RV, De Pace R, Klünder S, Di Lorenzo G, Schweizer M, Braulke T and Pohl S (2017) Site-1 protease and lysosomal homeostasis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.06.023

Velho RV, De Pace R, Klünder S, Sperb-Ludwig F, Lourenço CM, Schwartz I V.D., Braulke T and Pohl S (2015a) Analyses of disease-related GNPTAB mutations define a novel GlcNAc-1-phosphotransferase interaction domain and an alternative site-1 protease cleavage site. *Hum Mol Genet* 24:3497–3505. doi: 10.1093/hmg/ddv100

Velho RV, De Pace R, Sarah Klünder, Ludwig FS-, Lourenço CM, Schwartz I V.D., Braulke T and Pohl S (2015b) Analyses of disease-related GNPTAB mutations define a novel GlcNAc-1-phosphotransferase interaction domain and an alternative site-1 protease cleavage site. 1–34.

Velho RV, De Pace R, Tidow H, Braulke T and Pohl S (2016a) Identification of the interaction domains between  $\alpha$ - and  $\gamma$ -subunits of GlcNAc-1-phosphotransferase. *FEBS Lett* 1–9. doi: 10.1002/1873-3468.12456

Velho RV, Harms FL, Danyukova T, Ludwig NF, Friez MJ, Cathey SS, Filocamo M, Tappino B, Güneş N, Tüysüz B et al. (2019) The lysosomal storage disorders mucopolidosis type II, type III alpha/beta and type III gamma: Update on GNPTAB and GNPTG mutations. *Hum Mutat* 40:842–864. doi: 10.1002/humu.23748

Velho RV, Ludwig NF, Alegra T, Sperb-Ludwig F, Guarany NR, Matte U and Schwartz IVD (2016b) Enigmatic in vivo GlcNAc-1-phosphotransferase (GNPTG) transcript

correction to wild type in two mucopolipidosis III gamma siblings homozygous for nonsense mutations. *J Hum Genet* 61:1–6. doi: 10.1038/jhg.2016.13

Wang Y, Ye J, Qiu W-J, Han L-S, Gao X-L, Liang L-L, Gu X-F and Zhang H-W (2018) Identification of predominant GNPTAB gene mutations in Eastern Chinese patients with mucopolipidosis II/III and a prenatal diagnosis of mucopolipidosis II. *Acta Pharmacol Sin*. doi: 10.1038/s41401-018-0023-9

Welch LG and Munro S (2019) A tale of short tails, through thick and thin: investigating the sorting mechanisms of Golgi enzymes. *FEBS Lett* 1873-3468.13553. doi: 10.1002/1873-3468.13553

Yang Y, Wu J, Liu H, Chen X, Wang Y, Zhao M and He X (2013) Two homozygous nonsense mutations of GNPTAB gene in two Chinese families with mucopolipidosis II alpha/beta using targeted next-generation sequencing. *Genomics* 102:169–73. doi: 10.1016/j.ygeno.2013.06.001

Yokoi A, Kuroda M, Toma T, Yachie A, Imi-Hashida Y and Niida Y (2018) B-cell-specific accumulation of inclusion bodies loaded with HLA class II molecules in patients with mucopolipidosis II (I-cell disease). *Pediatr Res* 0–1. doi: 10.1038/s41390-018-0234-2

Yu F, Jin J, He J, Fan L, Jiao Z, Wu P and Tang J (2019) Compound heterozygous GNPTAB mutations cause mucopolipidosis II or III alpha / beta in two Chinese families. *Int J Clin Exp Pathol* 12:2981–2988.

Zeng J, Racicott J and Morales CR (2009) The inactivation of the sortilin gene leads to a partial disruption of prosaposin trafficking to the lysosomes. *Exp Cell Res* 315:3112–3124. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.08.016

Zhan T, Cui X, Xing X, Ren A, Gan G, Liu Y, Zhang J, Tang Z and Liu M (2011) Mucopolipidosis in a Chinese family with compound heterozygous mutations at the GNPTAB gene. *Clin Chim Acta* 412:1469–71. doi: 10.1016/j.cca.2011.04.025

Zhao Y, Ren J, Padilla-Parra S, Fry EE and Stuart DI (2014) Lysosome sorting of  $\beta$ -glucocerebrosidase by LIMP-2 is targeted by the mannose 6-phosphate receptor. *Nat Commun*. doi: 10.1038/ncomms5321

## **Anexos e Apêndices**

*Anexo A - Carta de Aprovação do Projeto 2019-0374 pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre*

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Análise genética em pacientes brasileiros com Mucopolidose II/III

**Pesquisador:** Ida Vanessa Doederlein Schwartz

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 2

**CAAE:** 17908019.3.0000.5327

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**Patrocinador Principal:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.583.479

**Apresentação do Projeto:**

O projeto de pesquisa "ANÁLISE GENÉTICA EM PACIENTES BRASILEIROS COM MUCOLIPIDOSE II/III" tem por objetivo investigar variantes genéticas nos genes GNPTAB e GNPTG em amostras de pacientes brasileiros com diagnóstico clínico de Mucopolidose II ou III alfa/beta. A amostragem será por conveniência. Os pacientes serão recrutados por contato com médicos geneticistas de todo o país, através da lista de emails da Sociedade de Genética Médica. Para inclusão no estudo, os pacientes precisam ter: (1) fenótipo clínico compatível com ML II ou III, e (2) diagnóstico bioquímico confirmado de ML II ou III (níveis elevados de enzimas lisossomais em plasma, ou papel filtro, e níveis reduzidos em fibroblastos) ou diagnóstico bioquímico sugestivo de ML II ou III (níveis elevados de enzimas lisossomais em plasma ou papel filtro). O número estimado de pacientes a serem analisados é de 20 indivíduos. Sempre que for possível, amostras paternas serão coletadas com o objetivo de confirmar as alterações encontradas no paciente.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo principal

Realizar o diagnóstico genético dos genes GNPTAB e GNPTG em pacientes brasileiros com

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229  
**Bairro:** Santa Cecília **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br



Continuação do Parecer: 3.583.479

diagnóstico clínico de Mucopolidose II e III.

Objetivos secundários

- Ampliar as frequências genotípicas brasileiras de alterações patogênicas nos genes GNPTAB e GNPTG;
- Identificar novas alterações patogênicas nos genes GNPTAB e GNPTG em pacientes latinos com Mucopolidose II e III;
- Otimizar e validar o protocolo de pesquisa por alterações patogênicas para os genes GNPTAB e GNPTG.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

**Riscos:** Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes aos participantes da pesquisa estão relacionados à coleta de sangue, que são semelhantes aos riscos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina, como manchas roxas e dor no local da coleta. O desconforto e os riscos associados a este procedimento serão minimizados pela realização da coleta por profissional treinado. Os riscos relacionados ao exame genético são a possibilidade de não identificar as alterações patogênicas que causam a doença no paciente, em função de limitações decorrentes da utilização da técnica de sequenciamento por Sanger. Outro risco associado é a identificação de alterações novas e não descritas e que provavelmente causam a doença, mas que se é necessário a utilização de outras avaliações, como estudos funcionais, para comprovar a patogenicidade da alteração identificada. Por último, existe a possibilidade de quando se realizar a confirmação, nos pais, das alterações encontradas no paciente, que as análises indiquem uma possível falsa paternidade quando o pai não apresentar uma das alterações encontradas no paciente (filho).

**Benefícios:** A identificação dos defeitos do DNA presentes em um dos genes que ocasionam estas doenças pode ser importante para o aconselhamento genético da família e para o diagnóstico pré-natal. Não existe um prazo exato ou estipulado para a liberação dos resultados dos exames realizados nesta pesquisa, mas estes serão informados a família assim que estiverem disponíveis. A família pode optar por não saber o resultado dos testes quando estes estiverem disponíveis.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo que visa diagnóstico molecular de pacientes com mucopolidose. A hipótese é que realizando o diagnóstico molecular de pacientes com diagnóstico clínico e bioquímico de

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229  
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3359-7840 Fax: (51)3359-7840 E-mail: cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL  
HCPA



Continuação do Parecer: 3.583.479

Mucopolidose II/III, a identificação das alterações patogênicas possam gerar dados para que um melhor entendimento da relação genótipo-fenótipo das doenças e do entendimento do funcionamento da GlcNAc-1-fosfotransferase.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O projeto inclui resumo, fundamentação teórica, justificativa, objetivos, metodologia, descrição dos critérios de inclusão e exclusão, e dos riscos e benefícios do estudo, cronograma de atividades, orçamento e referências bibliográficas. Apresentam o Termo de Compromisso para Uso de Material Biológico e Informações Associadas e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (pacientes).

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências emitidas para o projeto no parecer 3.498.305 foram respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 06/09/2019. Não apresenta novas pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Lembramos que a presente aprovação (versão projeto e TCLEs de 06/09/2019 e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto.

Os pesquisadores devem atentar ao cumprimento dos seguintes itens:

- a) Este projeto está aprovado para inclusão de 20 participantes no Centro HCPA, de acordo com as informações do projeto ou do Plano de Recrutamento apresentado. Qualquer alteração deste número deverá ser comunicada ao CEP e ao Serviço de Gestão em Pesquisa para autorizações e atualizações cabíveis.
- b) O projeto deverá ser cadastrado no sistema AGHUse Pesquisa para fins de avaliação logística e financeira e somente poderá ser iniciado após aprovação final do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.
- c) Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada.
- d) Deverão ser encaminhados ao CEP relatórios semestrais e um relatório final do projeto.
- e) A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229  
**Bairro:** Santa Cecília **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hopa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL  
HCPA



Continuação do Parecer: 3.583.479

diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na intranet do HCPA.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1394243.pdf	06/09/2019 10:12:59		Aceito
Orçamento	Orcamento_GPPG_060519.pdf	06/09/2019 10:11:23	Nataniel Floriano Ludwig	Aceito
Outros	Oficio_SBGm_cep_HCPA.pdf	06/09/2019 10:10:01	Nataniel Floriano Ludwig	Aceito
Outros	Resposta_ao_parecer_060919.docx	06/09/2019 10:06:07	Nataniel Floriano Ludwig	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_FIPE_Sequenciamentos_novo_060919.docx	06/09/2019 10:05:16	Nataniel Floriano Ludwig	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_pacientes_adultos_FIPE_Sequenciamentos_300819.docx	06/09/2019 10:04:47	Nataniel Floriano Ludwig	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_responsaveis_paciente_FIPE_Sequenciamentos_300819.doc	06/09/2019 10:04:34	Nataniel Floriano Ludwig	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_familiares_FIPE_Sequenciamentos_300819.docx	06/09/2019 10:04:11	Nataniel Floriano Ludwig	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_assinada.pdf	09/07/2019 15:17:39	Nataniel Floriano Ludwig	Aceito
Cronograma	Cronograma_080719.docx	08/07/2019 16:07:20	Nataniel Floriano Ludwig	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TCMBIA_FIPE_Sequenciamentos_140519.pdf	08/07/2019 15:45:05	Nataniel Floriano Ludwig	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229  
 Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903  
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
 Telefone: (51)3359-7840 Fax: (51)3359-7840 E-mail: cep@hcpa.edu.br

Página 04 de 05

UFRGS - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL  
HCPA



Continuação do Parecer: 3.583.479

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PORTO ALEGRE, 18 de Setembro de 2019

---

Assinado por:  
**Marcia Mocellin Raymundo**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229  
**Bairro:** Santa Cecília **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

Página 05 de 05

*Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pacientes Participantes do Projeto de Pesquisa 2018-0639*

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº do projeto GPPG ou CAAE 17908019.3.0000.5327

Título do Projeto: Análise Genética em pacientes brasileiros com Mucopolidose II/III

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa cujo objetivo é identificar alterações no DNA (material genético) de pacientes com diagnóstico de Mucopolidose do tipo II e III. Essas são doenças genéticas, isso significa que essas doenças são causadas por alterações presentes nos genes em nossas células. Os genes são pequenas regiões no nosso DNA que apresentam a função de informar como nossas células devem funcionar e por isso são muito importantes para a nossa saúde. Os pacientes com Mucopolidose II ou III apresentam alterações em genes que chamamos de *GNPTAB* e *GNPTG*, e juntos eles são responsáveis por fabricar uma proteína que tem função na reciclagem de moléculas em nossas células. É importante identificar as alterações no DNA dos pacientes com Mucopolidose II e III para entender como essa proteína funciona. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes:

- Primeiro, teremos uma conversa com você para explicar como ocorrerá a pesquisa, e os riscos e benefícios envolvidos em realizar um exame genético. Teremos essa conversa antes e após o exame, e a chamamos de aconselhamento genético;
- Realizar uma coleta de 5 ml de sangue, que é equivalente a uma colher de chá, para análise de DNA nos genes associados à Mucopolidose II e III;
- Acesso ao seu prontuário para confirmar o diagnóstico bioquímico da doença, que você já realizou previamente;
- Quando os resultados da análise do DNA estiverem disponíveis, entraremos em contato para divulgar os resultados e explicar as possíveis condutas cabíveis. Essa será a segunda parte do aconselhamento genético;

Rubrica do participante \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

Página 1 de 4

CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você poderá ser chamado para reconseguir para a utilização do material.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são relacionados à coleta de sangue, que são semelhantes aos riscos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina, como manchas roxas e dor no local da coleta. O desconforto e os riscos associados a estas avaliações serão minimizados pela realização da coleta por profissional treinado. Os riscos relacionados ao exame genético são a possibilidade de não identificar alterações no seu DNA que causam a doença que você apresenta, ou ainda a identificação de alterações que provavelmente causam a doença, mas que nós não podemos ter certeza nesse momento.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são a identificação das alterações que causam a doença nos genes *GNPTAB* e *GNPTG*. Outro benefício do exame genético é a utilização dessa informação para o aconselhamento genético e repercussão desse resultado para seus familiares. Nos últimos anos, muitas dessas alterações foram identificadas em pacientes e estudos com essas informações ajudaram a melhorar o nosso entendimento sobre a doença.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Rubrica do participante \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

Página 2 de 4

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Com relação às amostras biológicas armazenadas:

- ( ) Autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.
- ( ) Não autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Dra. Ida Vanessa D. Schwartz, pelo telefone (51) 33598750, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

\_\_\_\_\_  
Nome do participante da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Rubrica do participante \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

Página 3 de 4

CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

\_\_\_\_\_

Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

Página 4 de 4

CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

*Apêndice B – Pôster apresentado em congressos da área*

Acesso do arquivo no QR Code

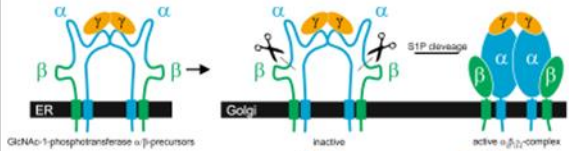


# Four N-glycosylation sites are essential for GlcNAc-1-phosphotransferase activity

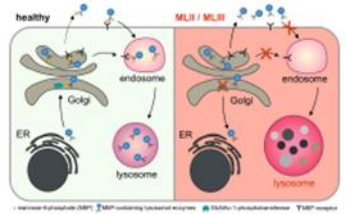
Nataniel F. Ludwig<sup>1,2</sup>, Tatyana Danyukova<sup>1</sup>, Renata Voltolini Velho<sup>1</sup>, Ida V. Schwartz<sup>2</sup> and Thomas Braulke<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Children's Hospital, Dept. Biochemistry, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; <sup>2</sup>Dept. of Genetics, Federal University Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

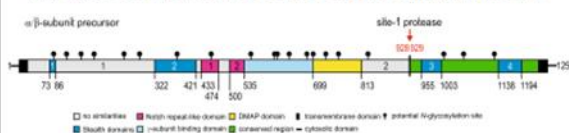
- The N-acetylglucosamine (GlcNAc)-1-phosphotransferase modifies selectively ~70 soluble lysosomal enzymes with mannose 6-phosphate residues required for proper targeting to lysosomes.
- GlcNAc-1-phosphotransferase is a hexameric complex ( $\alpha_3\beta_3$ ).



Loss or reduced GlcNAc-1-phosphotransferase activity results in mucopolisidosis II and III, respectively.



- The luminal domains of  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits are composed by modular structures important for substrate binding (UPD-GlcNAc, high mannose-type glycans and lysosomal enzymes) and catalytic activity.
- The inactive  $\alpha/\beta$  subunit precursor needs to be cleaved by site-1-protease (S1P) for catalytic activity.

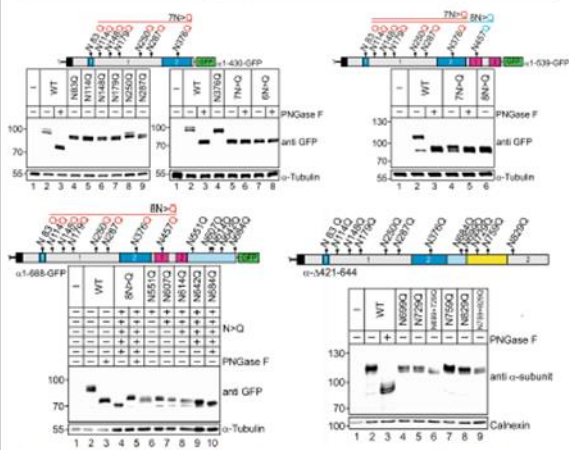


- The luminal domain of the  $\alpha/\beta$ -subunit precursor contains an unusual high number of potential N-glycosylation sites.

## Aim of study

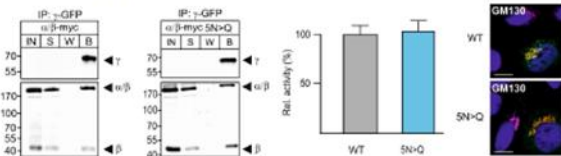
The precise location of used N-glycosylation sites and their role for subcellular localization, S1P-mediated cleavage,  $\alpha/\beta$  interaction and catalytic activity of GlcNAc-1-phosphotransferase remains elusive.

## N-glycosylation of $\alpha$ -subunits



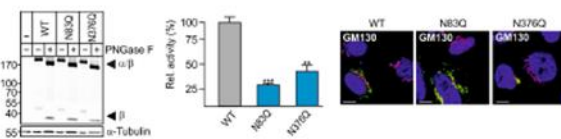
- Except N250, all others potential N-glycosylation sites in  $\alpha$ -subunits are used in HEK293 cells.

## N-glycosylation does not impair $\alpha/\beta$ subunits interaction



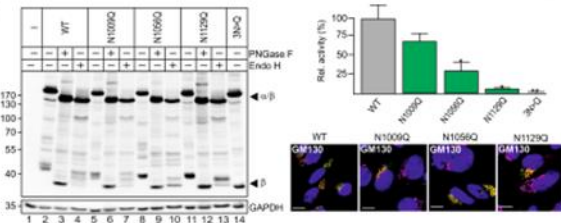
- None of the five N-glycans in the  $\gamma$ -binding domain interfere with interaction of GlcNAc-1-phosphotransferase  $\alpha/\beta$ -subunits, transport to Golgi apparatus, cleavage and enzymatic activity.

## N-glycosylation of Stealth domains 1 and 2 of $\alpha$ -subunits are required for GlcNAc-1-phosphotransferase activity



- N-glycans N83 and N376 in Stealth domains 1 and 2 of  $\alpha$ -subunits are essential for full enzymatic activity.
- N-glycans of N83 and N376 do neither impair transport to the Golgi nor proteolytic cleavage by S1P.

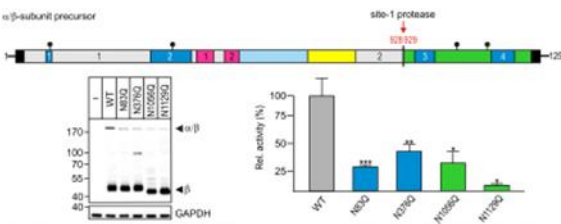
## The N-glycosylation of $\beta$ -subunits



- N1009 and N1056 are modified with high mannose-type and hybrid oligosaccharides, respectively.
- N1129 is modified with complex-type oligosaccharides.
- GlcNAc-1-phosphotransferase activity is gradually impaired by N1009Q < N1056Q < N1129Q.
- None of the N-glycans of  $\alpha/\beta$ -subunits affect transport to and S1P cleavage in the Golgi apparatus.

## Conclusion

- Four N-glycans in  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits do not affect transport to the Golgi apparatus and proteolytic activation by S1P; however, the absence of these single N-glycans results in reduction or loss of enzymatic activity, suggesting that both subunits form a tertiary structural complex for ligand binding and catalytic activity.



- The selective, GlcNAc-1-phosphotransferase activity-dependent modification of N1129 with complex oligosaccharides requires a yet unknown mechanism to regulate the glycosylation machinery.

Contacts: braulke@uke.de, ludwignataniel@gmail.com

*Apêndice C – Produção científica não relacionada à tese*

Artigo intitulado: Next-Generation Sequencing Corroborates a Probable de Novo *GNPTG* Variation Previously Detected by Sanger Sequencing

Citação:

**Ludwig, Nataniel Floriano**, Fernanda Sperb-Ludwig, Renata Voltolini; Velho, and Ida Vanessa D. Schwartz. 2017. “Next-Generation Sequencing Corroborates a Probable de Novo *GNPTG* Variation Previously Detected by Sanger Sequencing.” *Molecular Genetics And Metabolism Reports* 11:92–93.

Acesso versão digital disponível no QR Code



Artigo intitulado: Humoral Immune Response in Adult Brazilian Patients with Mucopolidosis III Gamma

Citação:

Fernanda Sperb-Ludwig, Taciane Alegria, Renata Voltolini Velho, **Nataniel Ludwig**, Marina Siebert, Mariana Jobim, Filippo Vairo, Ida V. D. Schwartz, Fernanda Sperb-Ludwig, Taciane Alegria, Renata Voltolini Velho, Nataniel Ludwig, Marina Siebert, Mariana Jobim, Filippo Vairo, and Ida V. D. Schwartz. 2019. “Humoral Immune Response in Adult Brazilian Patients with Mucopolidosis III Gamma.” *Genetics and Molecular Biology* 573:571–73.

Acesso versão digital disponível no QR Code



Artigo intitulado: The Lysosomal Storage Disorders Mucopolidose Type II, Type III Alpha/Beta and Type III Gamma: Update on *GNPTAB* and *GNPTG* Mutations

Citação:

Velho, Renata Voltolini, Frederike L. Harms, Tatyana Danyukova, **Nataniel F. Ludwig**, Michael J. Friez, Sara S. Cathey, Mirella Filocamo, Barbara Tappino, Nilay Güneş, Beyhan Tüysüz, Karen L. Tylee, Kathryn L. Brammeier, Lesley Heptinstall, Esmee Oussoren, Ans T. Ploeg, Christine Petersen, Sandra Alves, Gloria Durán Saavedra, Ida V. Schwartz, Nicole Muschol, Kerstin Kutsche, and Sandra Pohl. 2019. “The Lysosomal Storage Disorders Mucopolidose Type II, Type III Alpha/Beta and Type III Gamma: Update on *GNPTAB* and *GNPTG* Mutations.” *Human Mutation* 40:842– 864.

Acesso versão digital disponível no QR Code



Artigo intitulado: Distinct Modes of Balancing Glomerular Cell Proteostasis in Mucopolidosis Type II and III Prevent Proteinuria

Citação:

Sachs, Wiebke, Marlies Sachs, Elke Krüger, Stephanie Zielinski, Oliver Kretz, Tobias B. Huber, Anke Baranowsky, Lena Marie Westermann, Renata Voltolini Velho, **Nataniel Floriano Ludwig**, Timur Alexander Yorgan, Giorgia Di Lorenzo, Katrin Kollmann, Thomas Braulke, Ida Vanessa Schwartz, Thorsten Schinke, Tatyana Danyukova, Sandra Pohl, and Catherine Meyer-schwesinger. 2020. “Distinct Modes of Balancing Glomerular Cell Proteostasis in Mucopolidosis Type II and III Prevent Proteinuria.” *JASN* 31:1–19.

Acesso versão digital disponível no QR Code

