

NOVA MUTAÇÃO NO GENE *MYOC*, c.1187_1188insCCCAGA, IDENTIFICADA EM UMA FAMÍLIA BRASILEIRA COM GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO JUVENIL

Braghini, CA¹; Soardi, FC²; Vasconcelos, JPC³; Melo, MB¹

1. LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR HUMANA 3, CENTRO DE BIOLOGIA MOLECULAR E ENGENHARIA GENÉTICA

2. LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR HUMANA 1, CENTRO DE BIOLOGIA MOLECULAR E ENGENHARIA GENÉTICA

3. DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA, FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Agência Financiadora: FAPESP

Palavras-chave: *MYOC*-Glaucoma-Mutação



B0074



Intrudução

✓ O glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) é uma doença neurodegenerativa, caracterizada pela escavação progressiva do disco óptico com correspondente perda de campo visual.

✓ Mutações no gene *MYOC* estão relacionadas a muitos casos autossômicos dominantes de GPAA do tipo juvenil (GPAA-J), uma forma precoce e mais severa de GPAA.

✓ A maioria das mutações encontradas no gene *MYOC* estão localizadas na porção C-terminal do gene, no domínio *olfactomedina-like*.

✓ O desenvolvimento do GPAA ligado à mutações no gene *MYOC* se deve ao mecanismo de ganho de função, que leva ao aumento da pressão intra-ocular (PIO) causada pela obstrução do fluxo do humor aquoso pela malha trabecular.

✓ Mutações *missense* representam 85,9% das variantes relacionadas à doença, enquanto somente 4,2% das variantes são pequenas inserções.

Objetivo

✓ O objetivo deste estudo foi realizar o *screening* de mutações no gene *MYOC* em cinco gerações de uma família brasileira com GPAA-J.

Pacientes e Métodos

Pacientes

✓ Sete membros de cinco gerações de uma família brasileira com GPAA-J foram avaliados, bem como 60 indivíduos controle.

Avaliação Oftalmológica

- ✓ Pacientes:
 - Dano glaucomatoso no nervo óptico;
 - Perda correspondente de campo visual;
 - Ângulo aberto;
 - PIO superior a 21 mmHg.
- ✓ Grupo Controle:
 - Indivíduos com mais de 60 anos de idade;
 - Ausência de histórico familiar de glaucoma ou cegueira;
 - PIO ≤ 15 mmHg;
 - Relação escavação/disco ≤ 0,4 e assimetria ≤ 0,1.

Análises Moleculares

✓ A três regiões codificantes do gene *MYOC* foram analisadas por PCR e sequenciamento direto em pacientes e controles.

Análise da Proteína

✓ Os modelos da miocilina (*MYOC*) humana normal e mutante foram construídos utilizando a estrutura 3D resolvida de DDAH de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB-ID 1H70). Para a modelagem molecular foi utilizado o programa MODELLER® 9v2. Os métodos de avaliação Procheck® e Ramachandran® foram utilizados para comparar cada modelo com a estrutura de referência. As figuras dos modelos foram avaliadas e editadas pelo programa Millennium STING (CNPTIA-Embrapa, Brazil). A sequência da miocilina humana foi comparada com proteínas correspondentes de alguns mamíferos pelo ClustalW (<http://align.genome.jp/>).

Resultados e Discussão

✓ Uma nova mutação, c.1187_1188insCCCAGA, foi encontrada entre as bases 1187 e 1188, segregando com a doença em quatro indivíduos de três gerações da família (Figura 1), estando ausente nos 60 controles avaliados. Os parâmetros clínicos dos membros da família estão apresentados na tabela 1.

✓ Esta inserção leva à inclusão de dois aminoácidos, um ácido aspártico e uma prolina, entre os resíduos 395 e 396 no domínio *olfactomedina-like*.

✓ Embora não tenha truncado a proteína, de acordo com o programa de predição de estrutura secundária PSIPRED v2.6, esta mutação ocorre depois de uma folha beta e dentro de um sítio de fosforilação de caseína quinase II (Figura 2).

✓ No alinhamento múltiplo de sequências da miocilina humana com proteínas de outros mamíferos, os resíduos D395 e E396 não apresentam-se altamente conservados, porém estão localizados em uma região bastante conservada (Figura 2). Contudo, na comparação de contatos internos, várias alterações podem ser observadas na presença da mutação (Figura 3).

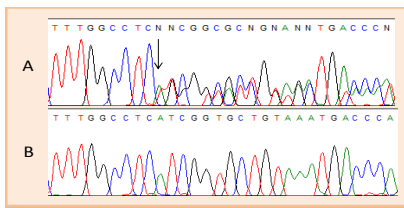
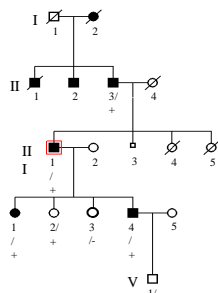


Figura 1. Acima: Pedigree da família estudada, mostrando a segregação da mutação c.1187_1188insCCCAGA com a doença em três gerações (II-3, III-1, IV-1 and IV-4). Abaixo: Eletroferograma do sequenciamento do terceiro exon do gene *MYOC* do paciente afetado (A), mostrando a mutação em heterozigose (c.1187_1188insCCCAGA), e do paciente não afetado (B). A seta indica a localização da inserção.

Tabela 1. Parâmetros clínicos de acordo com ausência/presença da mutação.

ID	DIAGNÓSTICO	MUTAÇÃO	IDADE DIAG. (anos)	PIO MÁX. OD (mmHg)	PIO MÁX. OE (mmHg)	FUNDOSCOPIA OD	FUNDOSCOPIA OE	GRUPO DE MPOFICAÇÃO
II-3	GPAA-J	+	78 (congnat)	36	35	1,1	1,1	2
III-1	GPAA-J	+	44/23	36	35	3,0	3,0	2/4
IV-1	GPAA-J	+	21/22	36	30	3,0	0,6	1/2
III-2	NORMAL	-	56	18	18	1,2	0,2	+
III-3	NORMAL	-	172	14	14	1,2	0,2	+
IV-4	NP	+	25/27	22	23	1,2	0,3	1
IV-5	NORMAL	-	25	-	-	1,2	0,2	+

ID = identidade IDADE DIAG = idade de diagnóstico
PIO MÁX. OD = máxima PIO no olho direito PIO MÁX. OE = máxima PIO no olho esquerdo

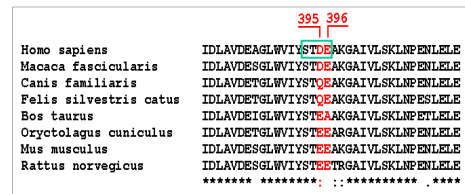


Figura 2. O alinhamento múltiplo de aminoácidos de proteínas da família das olfactomedinas, demonstrando que os resíduos D395 e E396 não são bem conservados entre as espécies. A caixa verde indica um dos sítios de fosforilação de caseína quinase II presentes na miocilina.

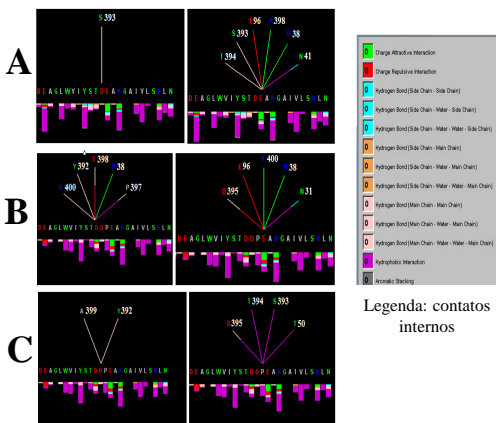


Figura 3. A. Sequência normal: o resíduo D395 interage com o S393 por ligação de hidrogênio na cadeia principal. E396 interage com diferentes aminoácidos: T394 e S393 por ligação de hidrogênio na cadeia principal; E96 por interação repulsiva; K398 e R38 por interação atrativa; N41 por ligação de hidrogênio na cadeia lateral e ligação hidrofóbica. **B. Sequência mutante:** foram observadas alterações de contato relevantes em D395 e E398. A inserção de D396 e P397 permitiu que D395 e E398 criassem muitos contatos internos, sugerindo que estas mudanças podem também causar relevantes mudanças estruturais na proteína. **C. Resíduos inseridos:** a inserção dos resíduos D396 e P397 leva à criação de novos contatos internos na proteína em uma região bastante conservada. D396 estabelece duas fortes interações com A399 e Y392. O resíduo hidrofóbico P397 estabelece interações hidrofóbicas com T394, S393, T50 e D395.

Conclusões

✓ A inserção c.1187_1188insCCCAGA, provavelmente, está envolvida na etiologia do GPAA-J nesta família. A sua localização, próxima a regiões conservadas do domínio *olfactomedina-like* preditas como folhas beta, pode comprometer a estrutura secundária e, portanto, o envelhecimento adequado deste domínio, bem como alterar a afinidade da miocilina por seus ligantes extracelulares.

✓ Estudos funcionais podem revelar se esta mutação, assim como outras no gene *MYOC*, impede a secreção da miocilina normal.

Referências

- Kanagavalli et al. 2003. Evaluation and understanding of myocilin mutations in Indian primary open angle glaucoma patients. *Mol Vis.* 2003 Nov 14;9:606-14.
- Rozsa et al. 1998. GLCIA mutations point to regions of potential functional importance on the TIGR/MYOC protein. *Mol Vis.* 1998 Oct 6;4:20.
- Mukhopadhyay et al. 2002. Did myocilin evolve from two different primordial proteins? *Mol Vis.* 2002 Jul 22;8:271-9.
- Hewitt et al. 2008. Myocilin allele-specific glaucoma phenotype database. *Hum Mutat.* 2008 Feb;29(2):207-11.