

Detección de mutaciones en el gen MYOC/TIGR en pacientes peruanos con glaucoma primario de ángulo abierto

DETECTION OF MUTATIONS IN MYOC/TIGR GENE IN PERUVIAN PRIMARY OPEN ANGLE GLAUCOMA PATIENTS

María Luisa Guevara-Fujita¹, Verónica Mendoza², Teja Patil³, Enrique Vargas⁴, Silvia Fernández⁴, Julia E. Richards³, Ricardo Fujita¹

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue identificar variantes en el exón 3 del gen de miocilina (MYOC/TIGR) en pacientes peruanos con Glaucoma Primario de Ángulo Abierto (GPAA). Es en este exón del gen MYOC donde se encuentra la mayoría de mutaciones en pacientes con GPAA a nivel mundial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de ADN fueron obtenidas de 70 pacientes con GPAA y sus respectivos controles del Instituto Nacional de Oftalmología (INO) Lima-Perú, mediante técnicas estandarizadas. Dos fragmentos que comprenden el exón 3 del gen MYOC fueron amplificados por PCR y evaluados mediante Conformation Sensitive Gel Electrophoresis (CSGE) para identificar las variantes. Los segmentos con resultado positivo fueron secuenciados y sus cromatogramas analizados para identificar el cambio en la secuencia.

RESULTADOS

Dos pacientes diagnosticados con GPAA, presentaron cambios en la secuencia del exón 3 del gen MYOC. Un polimorfismo neutro denominado Thr325Thr y una nueva mutación Gly326Ser.

CONCLUSIONES

El polimorfismo neutro Thr325Thr es una de las muchas variaciones que se han reportado en estudios anteriores en el

exón 3 del gen MYOC. Sin embargo la mutación Gly236Ser, aún no reportada en bases de datos, sugiere un rol importante en la función de la miocilina, convirtiéndola en una mutación causal de GPAA en el paciente analizado. El hallazgo de esta mutación permitirá el estudio de los miembros de la familia para un diagnóstico temprano y un manejo adecuado de la enfermedad.

PALABRAS CLAVES

MYOC/TIGR, mutación, polimorfismo.

ABSTRACT

The aim of this study was to identify variations in exon 3 of the myocilin gene (MYOC/TIGR) sequence in Peruvian primary open angle glaucoma (POAG) patients. This exon of the MYOC gene is where most of the mutations are located in POAG patients worldwide.

MATERIAL AND METHODS

DNA samples of 70 diagnosed POAG patients and controls were obtained from INO (Instituto Nacional de Oftalmología) following customary procedures. We amplified exon 3 of MYOC gene in two fragments by PCR. These products were evaluated with conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE). Sequence variations found were sent for sequence analysis and chromatograms were read to identify nucleotide changes.

¹ Docente investigador. Centro de Genética y Biología Molecular (CGBM), Facultad de Medicina Humana (FMH), Universidad de San Martín de Porres (USMP).

² Asistente de investigación. CGBM-FMH-USMP.

³ Public Health School, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48105.

⁴ Médico oftalmólogo. Instituto Nacional de Oftalmología (INO).

RESULTS

PCR products of two diagnosed POAG patients showed sequence changes in exon 3 of MYOC gene. One known neutral polymorphism Thr325Thr and a novel mutation Gly326Ser, were detected.

CONCLUSIONS

The Thr325Thr polymorphism, is a previously reported variation in exon 3 of the MYOC gene. However Gly326Ser mutation suggests an important role in myocilin function, becoming a causal disease mutation of POAG in analyzed patients. Our finding of a novel mutation in MYOC/TIGR will contribute to study family members of the proband to make early diagnoses with regular clinical visits and effective treatment.

KEY WORDS

MYOC/TIGR, mutation, polymorphism.

INTRODUCCIÓN

El glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) es una neuropatía óptica que causa disminución del campo visual y ceguera si no se realiza el tratamiento a tiempo. Se estima que esta enfermedad podría afectar aproximadamente a 45 millones de personas en el mundo en el año 2010 y 60 millones para el 2020.¹

Se sabe que existe un componente genético para la enfermedad, razón por la cual los familiares de personas afectadas tienen mayores probabilidades de presentar GPAA que la población normal (25% contra 1.02%).² Según el Comité de Nomenclatura de la Organización del Genoma Humano (HGCN), el símbolo para los loci de glaucoma primario es "GLC"; los números representan el tipo de glaucoma: 1 para ángulo abierto, 2 para ángulo cerrado y 3 para glaucoma congénito. Las letras indican el orden temporal de identificación, por ejemplo "A" y "N" indican el primer y el decimotercero gen mapeado respectivamente. La lista de loci de GPAA hasta ahora va de GLC1A a GLC1N.³

Mutaciones en el gen de la miocilina (MYOC, también conocido como TIGR), localizado en GLC1A 1q24, causan GPAA.^{4,6} Recientemente otros dos genes han sido identificados, OPTN (GLC1E) y WDR36 (GLC1G).^{5,7} El diagnóstico temprano de glaucoma puede ayudar a prevenir el irreparable daño ocular si es causado por mutaciones en MYOC, donde el aumento de la presión intraocular (PIO) suele ser mayor y con consecuencias más severas.⁸ El gen de la miocilina está compuesto por 3 exones y dos intrones. El exón 3 es el más

grande y posee un dominio similar a olfactomedina, donde se encuentran más del 90% de las mutaciones reportadas hasta el día de hoy.^{9,10}

Por este motivo estamos caracterizando las mutaciones presentes en una muestra de la población afectada por GPAA, mediante el uso de una técnica indirecta de detección de variantes y el secuenciamiento de éstas para identificar los cambios en la secuencia del gen en estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación clínica

Exámenes clínicos y oftalmológicos de 70 pacientes con GPAA y sus respectivos controles, provenientes de distintas provincias del Perú, fueron realizados en el Instituto Nacional de Oftalmología (INO-Lima, Perú). La presión intraocular (PIO) de ambos ojos se midió con el tonómetro de Goldmann (Haag Streit AT900). El grosor de la córnea fue medido con paquímetro (Ocuscan-Alcon). La evaluación del nervio óptico y su documentación fue realizada por una cámara no midriática (Visucam-Zeiss) y los campos visuales fueron analizados mediante el perímetro Octopus 1-2-3 (Interzeag AG, Schlieren-Zürich, Suiza). La determinación del diagnóstico de glaucoma se basó en los siguientes criterios: Ángulo abierto de la cámara anterior, cambios glaucomatosos del disco óptico. Se excluyeron los casos con glaucoma secundario o desarrollado como consecuencia de otras enfermedades. Los controles además de realizarse las pruebas clínicas y oftalmológicas no debían tener antecedentes de GPAA en la familia.

Recolección de muestras

Previo explicación del estudio y con la firma de los consentimientos informados de 70 pacientes y sus controles, según protocolo de estudios aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de San Martín de Porres, se procedió a la recolección de 5ml de sangre periférica de pacientes y controles en vacutainers con EDTA como anticoagulante. El ADN fue extraído con técnicas estandarizadas, disuelto en TE 20:5, rotulado y almacenado a 4°C.

Análisis molecular

El exón 3 del gen MYOC fue amplificado en dos segmentos por PCR en un termociclador (BIO-RAD DNA Engine® Peltier Thermal Cycler). Para ello se utilizó 100ng ADN genómico, 1.5 Buffer 10X, 20µM primers, 1.5mM MgCl₂, 2U Taq ADN polimerasa y 10mM de dNTP's, en un volumen final de 15µl. Las secuencias de los dos pares de primers y los programas de amplificación de PCR se desarrollaron según estudios previos¹¹, teniendo como resultado dos segmentos; el primero de 480pb y el segundo de 586pb.

El proceso de detección de mutaciones se desarrolló con la técnica Conformation Sensitive Gel Electrophoresis (CSGE), adaptada de Williams et. al.¹² Se mezclaron los productos de PCR del ADN de los pacientes y controles con un volumen igual del producto de PCR de un control normal previamente secuenciado. Se seleccionaron a los pacientes y controles que mostraron variantes conformacionales por diferencia en la movilidad de las bandas en comparación con un control negativo. Los productos amplificados por PCR de los pacientes seleccionados fueron evaluados cualitativa y cuantitativamente en geles de agarosa 1% y purificados con QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, USA). Estos productos purificados se enviaron con los primers forward y reverse al DNA Sequencing Core de la Escuela de Medicina de la Universidad de Michigan, para constatar los cambios. Las secuencias y cromatogramas fueron analizados visualmente para identificar las mutaciones.

RESULTADOS

Setenta pacientes no consanguíneos diagnosticados con GPAA y 70 controles fueron evaluados en el presente estudio. Todos los casos corresponden a diagnósticos de GPAA en pacientes adultos, siendo la edad promedio de detección de la enfermedad los 59 años en mujeres y 63 años en varones. La media de las presiones intraoculares actuales es de 18mmHg en mujeres y varones, quienes vienen siendo tratados y la mayoría de ellos han sido intervenidos quirúrgicamente en el Instituto Nacional de Oftalmología.

Dos pacientes mostraron diferente movilidad en CSGE (Fig. 1). Al analizar los cromatogramas se identificaron dos variantes en las secuencias del exón 3 de MYOC/TIGR (Fig. 2), un polimorfismo neutro, registrado en estudios anteriores¹¹, denominado Thr325Thr (ACGACA) y una nueva mutación Gly326Ser (GGTAGT), aún no reportada en bases de datos.

A



B

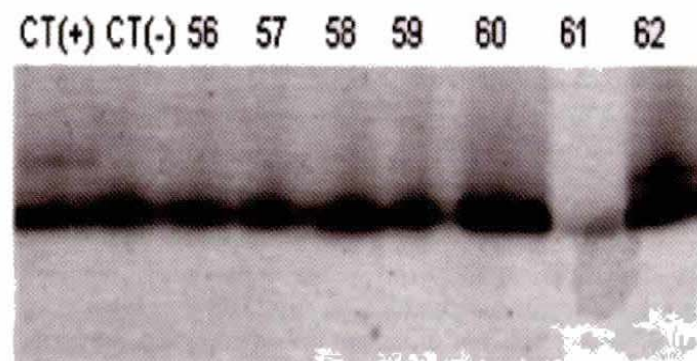


Fig. 1: Detección de cambio de nucleótido en pacientes G08 (A) y G62 (B) mediante técnica CSGE en el primer segmento del exón 3 del gen MYOC. Se observa, en ambos, la diferencia en la migración de las bandas (doble banda).

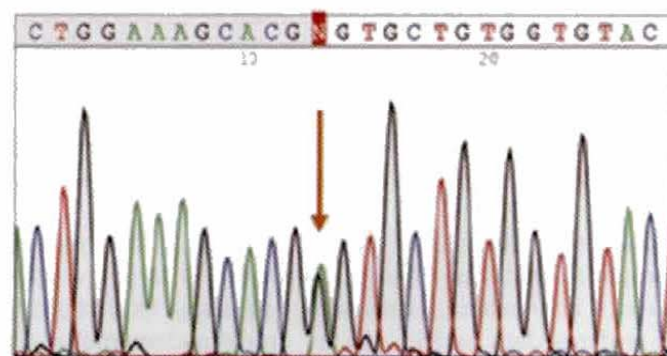


Fig. 2: Cromatograma del exón 3 del gen MYOC del paciente G62, muestra la nueva mutación GGT/AGT, que codifica para Gly326Ser.

DISCUSIÓN

Nuestro Centro ha realizado varios estudios en familias con GPAA, en los cuales se han encontrado diferentes regiones cromosómicas responsables de la enfermedad, lo que comprueba la heterogeneidad de este tipo de glaucoma. El estudio más reciente, reveló una nueva mutación en el exón 3 del gen MYOC Asn480Lys (CG) reportada por Guevara-Fujita et al¹³, en una familia peruana con ancestros andinos, la cual ya había sido identificada por Adam et al¹⁴ con un cambio diferente (CA).

Mediante el análisis molecular de los pacientes se determinó la presencia del polimorfismo Thr325Thr con una frecuencia de 1.46% en la población analizada. Este cambio ha sido reportado previamente con una frecuencia del 3% en 1703 pacientes de tres diferentes grupos raciales (caucásicos, africanos y asiáticos).¹⁰ El paciente al cual le fue detectado este polimorfismo tiene 66 años y posee antecedentes familiares de glaucoma. Es probable que la mutación causal de glauco-

ma se encuentre en otros exones del gen MYOC ó en otros genes como OPTN ó WDR36^{5,7}.

Además se identificó una nueva mutación Gly326Ser (GA) sin reportes disponibles a la fecha, en un paciente de 74 años de edad, natural de la provincia de Chíncha en el departamento de Ica, quien cuenta con antecedentes familiares de glaucoma. La sustitución de un aminoácido no polar con carga negativa (Glicina) por uno polar de carga positiva (Serina) es un cambio importante que podría afectar la estructura y función de la miocilina causando la enfermedad en el paciente. La importancia de encontrar esta nueva mutación en un paciente con GPAA es esencial para evaluar, en estudios posteriores, a la familia entera de este probando para hacer un diagnóstico temprano de la enfermedad en las últimas generaciones, ayudando de esta manera en la prevención y desarrollo de la enfermedad.

REFERENCIAS

1. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol*. 2006;90:262-267.
2. Allingham RR, Liu Y, Rhee DJ. The genetics of primary open-angle glaucoma: a review. *Exp Eye Res*. 2009 Apr;88(4):837-44.
3. On line Mendelian Inheritance in Man (OMIM) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>. (Consulta abril 2009).
4. Sheffield VC, Stone EM, Alward WLM, et al. Genetic linkage of familial open angle glaucoma to chromosome 1q21-q31. *Nature Genetics*. 1993;4:47-50.
5. Monemi S, Spaeth G, DaSilva A, et al. Identification of a novel adult-onset POAG primary open angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. *Human Mol Genet*. 2005;14:725-733.
6. Stone EM, Fingert JH, Alward WLM, et al. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science*. 1997;225:668-670.
7. Rezaie T, Child A, Hitchings R. Adult-onset primary open angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science*. 2002;295:1077-1079.
8. Melki R, Belmouden A, Brezin a, et al. Myocilin analysis by DHPLC in French POAG patients: increased prevalence of Q368X mutation. *Hum Mut*. 2003;22:179.
9. Rozsa FW, Shimizu S, Lichter PR, Johnson AT, Othman MI, Scott K, Downs CA, Nguyen TD, Polansky J, Richards JE. GLC1A mutations point to regions of potential functional importance on the TIGR/MYOC protein. *Mol Vis*. 1998;4:20.
10. Fingert JH, Heon E, Liebmann JM, Yamamoto T, et al. Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations. *Hum Mol Genet*. 1999;8:899-905.
11. Shimizu S, Lichter PR, Johnson AT, et al. Age-dependent prevalence of mutations at the GLC1A Locus in primary open-angle Glaucoma. *Am J Ophthalmology*. 2004;111:1439-1448.
12. Williams IJ, Abuzeadah A, Winship PR, et al. Precise carrier diagnosis in families with haemophilia A: use of conformational sensitive gel electrophoresis for mutation screening and polymorphism analysis. *Thromb Haemost*. 1998;79:723-726.
13. Guevara-Fujita ML, Perez G. R, Estrada C. A, Pawar H, Vargas E, Richards JE, Fujita R. Recurrent Myocilin Asn480Lys Glaucoma causative mutation arises de novo in a family of Andean descent. *J Glaucoma*. 2008;17:67-72.
14. Adam MF, Belmouden A, Binisti P, et al. Recurrent mutations in a single exon encoding the evolutionarily conserved olfactomedin-homology domain of TIGR in familial open-angle glaucoma. *Hum Mol Genet*. 1997;6:2091-2097.