

Estudos Genéticos e Moleculares em um Grande Grupo de Pacientes com Malformações do Córtex Cerebral*

Fábio Rossi Torres, Daniela Aguiar de Souza-Kols, Simone Sayuri Tsuneda, Rodrigo Secolin, Iara Leda Brandão de Almeida, Camila Fernanda Lopes, Maria do Carmo Sousa Rodrigues, Maria Augusta Montenegro, Antonia Paula Marques-de-Faria, Marilisa Mantovani Guerreiro, Juan Clinton Llerena Jr, Fernando Cendes, Iscia Lopes-Cendes

Departamento de Neurologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas;
Departamento de Genética, Fundação Instituto Oswaldo Cruz

RESUMO

Objetivos: As malformações do córtex cerebral (MCC) são uma causa importante de epilepsia. Nossas metas foram: triagem de mutações em genes associados às MCC (*FLN1*, *LIS1*, *DCX* e *EMX2*), investigar funcionalmente as mutações e mapear o *locus* para polimicrogia perisylviana familiar. **Métodos:** A triagem de mutações foi realizada por PCR, DHPLC e sequenciamento. Estudo funcional foi realizado por RT-PCR, PCR em tempo real e HUMARA. O estudo de ligação foi realizado por PCR e análise com programas *Fragment Profiler*[®] e *MLINK*[®]. **Resultados:** Mutações deletérias foram identificadas em 3/108 pacientes. Uma mutação de *splicing* (G987C) em *FLN1* foi identificada em duas pacientes aparentadas com heterotopia nodular periventricular. Mudança no padrão de inativação do cromossomo X é responsável pelas diferenças clínicas entre as pacientes. Uma substituição A1385C (H277P) foi identificada em *LIS1* em um indivíduo com lissencefalia. Alterações neutras foram identificadas em *DCX* e *EMX2*. A análise de ligação identificou um *locus* em Xq27.2-Xq27.3 para polimicrogia familiar. **Conclusão:** Mosaïcismo, mutações em regiões não codificantes, deleções, rearranjos e casos atípicos podem estar contribuindo para a baixa frequência de mutações identificadas. Esquizencefalia e polimicrogia parecem não ter base genética relacionada com o gene *EMX2*. Um novo *locus* candidato em Xq27.2-Xq27.3 foi identificado para polimicrogia perisylviana familiar.

Unitermos: Sistema nervoso central, desenvolvimento, malformações corticais, genética.

ABSTRACT

Genetics and molecular study in group of patients with malformations of cerebral cortex

Objectives: Malformations of cerebral cortex (MCC) are an important cause of epilepsy. Our main goals were: to search for mutations in genes responsible for MCC (*FLN1*, *LIS1*, *DCX* and *EMX2*), to map the *locus* for familial perisylvian polymicrogyria and to investigate the molecular mechanisms of the mutations identified. **Methods:** Mutation screening was performed by PCR, DHPLC and sequencing. HUMARA and Real Time PCR were performed to study the molecular mechanisms of mutations. Linkage analysis was carried out by PCR, *Fragment profiler*[®] and *MLINK*[®] software. **Results:** Deleterious mutations were identified in 3/108 patients. We found a G987C *splicing* mutation in the *FLN1* in two related patients with periventricular nodular heterotopia. Skewed X-chromosome inactivation was detected as the possible mechanism responsible for clinical differences observed in the two patients. An A1385C transversion (H277P) in *LIS1* was identified in one patient with lissencephaly. Only neutral variants were identified in *DCX* and *EMX2*. Linkage analysis has detected a *locus* in Xq27.2-Xq27.3 for familial polymicrogyria. **Conclusion:** We believe that the low frequency of mutations identified may be due to mosaicism, mutations in non-coding regions, deletions and patients with atypical neuroimaging findings. Deleterious mutations in *EMX2* were not found in patients with schizencephaly and polymicrogyria. We found a *locus* for familial perisylvian polymicrogyria in Xq27.2-Xq27.3.

Key words: Central Nervous System, development, cortical malformations, genetics.

* Trabalho premiado com o Prêmio Aristides Leão durante o XXXII Congresso Brasileiro de Epilepsia 2008. Received June 16, 2008; accepted July 18, 2008.

INTRODUÇÃO

As malformações do córtex cerebral (MCC) são uma importante causa de epilepsia.⁷ A etiologia das MCC, geralmente, está relacionada a insultos pré-natais.^{9,20} No entanto avanços nos estudos dos mecanismos moleculares de desenvolvimento do córtex cerebral e uma maior disponibilidade de exames de ressonância magnética (RM) têm demonstrado que as MCC também podem ser conseqüências de fatores genéticos. Vários genes foram identificados responsáveis por MCC: *FLN1* para heterotopia nodular periventricular (HNP)⁴, *LIS1* e *DCX* para o espectro da lissencefalia-heterotopia subcortical em banda (LIS-HSB)^{11,2} *EMX2* para a esquizencefalia¹ e possivelmente polimicrogiria, embora ainda haja controvérsias sobre este último. Desta forma, os principais objetivos deste trabalho foram: 1) realizar uma triagem de mutações nos quatro principais genes responsáveis por MCC (*FLN1*, *LIS1*, *DCX* e *EMX2*) em um grande grupo de pacientes acometidos por estas malformações, 2) investigar o mecanismo molecular das mutações identificadas, 3) mapear o *locus* candidato para polimicrogiria perisylviana bilateral (PPB) familiar através da técnica de análise de ligação.

MÉTODOS

Pacientes

Todos os pacientes participantes deste trabalho foram analisados por um médico neurologista. O diagnóstico e classificação das malformações corticais foram realizados através de exames de ressonância magnética e, quando está não era disponível por alguma razão, por tomografia computadorizada (usada em apenas 19 pacientes com esquizencefalia e dois com LIS-HSB não seguidos em nosso serviço). A classificação do gradiente de severidade do espectro LIS-HSB foi realizada segundo um sistema anteriormente descrito³. Um questionário semi-estruturado foi utilizado para se obter informações sobre a história clínica e familiar dos pacientes, incluindo antecedentes de epilepsia ou outras condições neurológicas em parentes de primeiro, segundo e terceiro grau e também de antecedentes pré-natais. Todos os pacientes participantes deste projeto assinaram um termo de consentimento aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (CEP/FCM) e pela comissão nacional de ética em pesquisa (CONEP).

Triagem de Mutações

O DNA genômico dos pacientes foi extraído de linfócitos provenientes do sangue periférico pela técnica de fenol-clorofórmio. A amplificação das regiões codificantes dos genes candidatos foi realizada pela técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Para o gene *FLN1* somente os

cinco primeiro exons codificantes foram analisados. Os pacientes com HNP foram testados para o gene *FLN1*, os indivíduos com o espectro LIS-HSB foram analisados para os genes *LIS1* e *DCX*, enquanto os pacientes acometidos por esquizencefalia e PPB foram testados para o gene *EMX2*. Os produtos amplificados foram submetidos à técnica de *denaturing high performance liquid chromatography* (DHPLC) em um cromatógrafo WAVE 4500® (Transgenomic, San Jose, CA) e, quando apresentavam padrões de eluição diferentes dos controles normais, foram seqüenciados com *Big Dye Terminator Sequencing kit*® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para seqüenciador Megabace 1000® (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). As alterações identificadas foram testadas *in silico*, com os programas de computador Polyphen e SIFT, além da escala Grantham⁵, para aferir se as mesmas eram patogênicas.

Estudos Funcionais da Mutação 987G>C no gene *FLN1*

O RNA total dos pacientes analisados foi extraído de linfócitos do sangue periférico pelo método de Trizol. A reação de RT-PCR foi realizada com o *kit Improm II™ Reverse Transcriptase System* (Promega, Madison, WI, USA) seguindo recomendações do fabricante. O cDNA resultante foi amplificado por PCR com *primers* específicos flanqueando a região exon 6, intron 6, exon 7. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose e, em seguida, purificados e clonados em células de *E. coli* DH5α através de um vetor pGEM™ (Promega, Madison, WI, USA) sendo posteriormente seqüenciados.

Os experimentos de inativação do cromossomo X foram realizados pela técnica de HUMARA (*human androgen receptor gene*), utilizando *primers* marcados com fluoróforos e DNA genômico. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel e quantificados pelo programa ImageQuantTL™ em um aparelho Typhoon™ (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, United Kingdom). Os estudos de expressão foram realizados em um aparelho de *Real Time PCR* (7500 *Real Time PCR system* da Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) com o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) seguindo recomendações do fabricante. Os *primers* e a sonda foram obtidos da Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) e o gene 18S foi utilizado como controle endógeno. Todos os experimentos de quantificação relativa foram realizados em triplicata e o teste do X2 foi utilizado para medir as diferenças entre a expressão gênica das duas pacientes com mutação.

Análise de Ligação

O estudo de ligação foi realizado em uma família com PPB composta de um total de 15 indivíduos. Amostras de DNA dos participantes foram genotipadas para 18 mar-

cadores microsátélites flanqueando um intervalo de 42.3cM no cromossomo Xq27-q28. A reação de PCR foi realizada com *primers* marcados com fluoróforos FAM, VIC™ ou NED (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os produtos de PCR marcados com fluorocromo foram analisados em um seqüenciador automático MegaBACE 1000™ e a análise dos alelos foi realizada com os programas Fragment Profiler® (GE Healthcare). Os dados obtidos pelo programa Fragment Profiler® foram processados com o programa LINKGEN. A análise de ligação de dois pontos e múltiplos pontos foi calculada com os programas MLINK® e LINMAP® (versão 5.2) (CEPH, University of Utah, Columbia University, 1990). O programa GENEHUNTER® foi utilizado para construção do haplótipo.⁶ Valores de *lod score* (*Z*) iguais ou maiores que 2.00 são indicativos de ligação entre o marcador e a doença.¹⁴

RESULTADOS

Pacientes

Um total de 108 pacientes com diferentes formas de MCC foi inicialmente analisado por DHPLC para a presença de mutações em genes candidatos. Treze pacientes possuem HNP (10 mulheres e três homens); sendo que quatro apresentam o padrão clássico (nódulos neuronais bilaterais nas margens dos ventrículos laterais sem nenhuma malformação do córtex adjacente) e nove padrões atípicos (nódulos neuronais unilaterais, altamente assimétricos ou localizados focalmente, nódulos localizados da superfície do córtex até os ventrículos e associação de outras malformações corticais). Foram identificados 19 pacientes portadores do espectro LIS-HSB (11 mulheres e oito homens), sendo que 10 apresentam LIS (três mulheres e sete homens) enquanto outros nove são afetados por HSB (oito mulheres e um homem). Também foram estudados 46 pacientes com esquizencefalia (23 mulheres e 23 homens) e 30 com PPB (oito mulheres e 22 homens). Dentro desta casuística foram identificados dois casos familiares de HNP (mãe e filha), nenhum caso familiar do espectro LIS-HSB, dois casos familiares de esquizencefalia (duas irmãs) e 20 casos familiares de PPB (distribuídos em seis famílias). Dentre os casos familiares de PPB, foi identificada uma grande família com padrão de herança autossômico dominante ligado ao cromossomo X e poder estatístico suficiente para estudos de ligação genética.

Triagem de Mutações

A análise por DHPLC identificou padrões de eluição alterados para todos os genes estudados. O sequenciamento dos produtos de amplificação para o gene *FLN1* identificou dois SNPs (*single nucleotide polymorphism*) não patogênicos já descritos na base de dados do NCBI

(National Center Biotechnology Information), IVSV + 519C>G (NCBI, rs4898478) e IVSV + 506C>T (NCBI, rs4898479), além de uma substituição G987C (NCBI, NM_001456) presente em dois pacientes relacionados (mãe e filha) e ausente em 50 indivíduos controles (ver figura na ref. 17). Para o gene *LIS1* foram detectadas alterações neutras C1805T (NCBI, rs6628) e IVSVI + 27C>T (NCBI, rs3213696), além de outras substituições como G1670C (NCBI, NM_000430) que supostamente levaria a troca de uma troca de cisteína para serina na posição 372 da proteína (C372S), G1368C (NCBI, NM_000430) e G1383C (NCBI, NM_000430) que trocam respectivamente um glutamato para um aspartato nas posições 271 (E271D) e 276 (E276D) da proteína, sendo todas as alterações também identificadas em um grupo controle. Uma alteração A1385C, (NCBI, NM_000430) foi identificada no gene *LIS1* em um paciente com lissencefalia grave grau 3a (ver figura na ref. 16). A ausência da alteração em um grupo controle e a confirmação de sua patogenicidade através da escala Grantham⁵ e dos programas SIFT e Polyphen sugerem que a mesma se trata de uma mutação deletéria. A análise do gene *DCX* revelou apenas duas variantes neutras não descritas na base de dados do NCBI: IVSII + 28G>A e IVSV + 19G>A. Para o gene *EMX2* foi identificada uma alteração neutra C796A (NCBI; NM_004098) que não altera a arginina na posição 156 da proteína em quatro pacientes com esquizencefalia, esta mesma alteração foi identificada no grupo controle. A análise por DHPLC não identificou nenhum padrão de eluição alterado no gene *EMX2* em pacientes com PPB.

Estudos Funcionais da Mutação 987G>C no gene *FLN1*

Através de análise em gel de eletroforese foi demonstrado que o produto de PCR do cDNA da mãe e filha possuíam tamanhos moleculares diferentes (maiores) quando comparados com controles normais. O sequenciamento dos produtos de PCR mostrou a presença da seqüência completa do intron 6 no cDNA dos pacientes (ver figura na ref. 17). Análises com programas de bioinformática mostraram que a manutenção do intron insere um codon de parada prematuro na matriz de leitura do RNAm do gene *FLN1*.¹⁷

Estudos de inativação do cromossomo X realizados com DNA proveniente de sangue periférico revelaram um padrão de inativação não randômico no probando (filha).¹⁷ O PCR quantitativo em tempo real mostrou uma expressão aumentada do alelo mutante no probando quando comparado com a mãe (ver figura na ref. 17).

Análise de Ligação

Valores significativos de *lod score* de dois pontos foram obtidos para dois marcadores (DXS1205 e DXS1227) com

$Z_{max} = 2.06$ a $\theta = 0.0$ (13). O cálculo de *lod score* de múltiplos pontos indicou uma região candidata de 13 cM entre os marcadores DXS1205 e DXS8043, localizados no cromossomo Xq27.2-Xq27.3.¹³

DISCUSSÃO

Alterações deletérias foram identificadas em apenas 3/108 pacientes estudados. Acreditamos que a presença de mosaicismos somáticos, mutações em regiões não codificantes, grandes deleções e rearranjos estruturais, além da presença de um significativo número de casos com padrões de neuroimagem atípicos, são fatores que podem estar influenciando na baixa frequência de mutações encontradas no nosso grupo de pacientes, especialmente os portadores de HNP e do espectro LIS-HSB. A única mutação encontrada no gene *FLN1*, em duas pacientes aparentadas com a forma clássica e bilateral de HNP, confirma a alta frequência de alterações deletérias em casos familiares de HNP.¹⁰ A mutação G987C no gene *FLN1*, devido a sua posição, poderia atuar como mutação de sentido trocado ou como de sítio de *splicing*, é importante ressaltar que mutações de sentido trocado (ganho de função) localizadas nos primeiros exons do gene *FLN1* levam as síndromes otopalatodigital tipo 1 e 2, displasia frontometáfiseal e síndrome de Melnick-Needles¹², distintas da HNP. Nossos resultados demonstraram que o efeito da mutação é a destruição do sítio de *splicing* do sexto intron do gene *FLN1*, confirmando que mutações de perda de função localizadas nos primeiros exons deste gene estão associadas com HNP. Além do mais, há uma diferença de manifestação clínica evidente entre as duas pacientes portando esta mutação, os nódulos assim como a refratariedade das crises e déficits neurológicos são muito mais proeminentes na filha do que na mãe. Estas diferenças poderiam ser explicadas por mecanismos de inativação não randômica do cromossomo X favorecendo uma maior expressão do alelo mutante, nossos experimentos de HUMARA e PCR em tempo real confirmam esta hipótese. Em relação à mutação identificada no gene *LIS1* pudemos confirmar que mutações de sentido trocado são raras em pacientes com LIS-HSB¹⁸ e que a localização destas mutações em regiões carboxi-terminais da proteína LIS1 não está relacionada a fenótipos menos severos como relatado anteriormente,⁸ sendo necessários maiores estudos para uma correlação mais precisa entre a natureza da mutação e grau de malformação do espectro LIS-HSB. Para o grupo de pacientes com esquizencefalia e PPB, os resultados negativos para o gene *EMX2* eram até certo ponto esperados, já que trabalhos recentes pesquisando mutações neste gene em pacientes com esquizencefalia não identificaram mutações patogênicas no mesmo,¹⁵ portanto nosso trabalho exclui o *EMX2* da etiologia da maioria dos casos de esquizencefalia e PPB. Após os ex-

perimentos de triagem de mutações, estudamos por análise de ligação uma grande família segregando PPB. A análise de marcadores microsatélites revelou um novo *locus* candidato em Xq27.2-Xq27.3 de localização mais centromérica ao descrito por outro grupo,¹⁹ evidenciando a presença de heterogeneidade genética para PPB familiar. Uma triagem de mutações nos genes candidatos localizados dentro da região Xq27.2-Xq27.3 está sendo realizada no momento com o objetivo de identificar o gene responsável por PPB.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer a todos pacientes e seus familiares, pois sem a boa vontade dos mesmos este trabalho não seria possível. Agradecemos também à CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Brunelli S, Faiella A, Capra V, Nigro V, Simeone A, Cama A, et al. Germline mutation in the homeobox gene *EMX2* in patients with severe schizencephaly. *Nature Genet* 1996; 12:94-6.
- Des Portes V, Francis F, Pinard JM, Desguerre I, Moutard ML, Snoek I, et al. Doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia. *Hum Mol Genet* 1998; 7:1063-70.
- Dobyns WB, Truwit CL, Ross ME, Matsumoto N, Pilz DT, Ledbetter DH. Differences in the gyral pattern distinguish chromosome 17-linked and X-linked lissencephaly. *Neurology* 1999; 53:270-7.
- Fox JW, Lamperti ED, Ekisioğlu YZ, Hong SE, Feng Y, Graham DA, et al. Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* 1998; 21:1315-25.
- Grantham R. Amino acid difference formula to help protein evolution. *Science* 1974; 185:862-4.
- Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES. Parametric and nonparametric linkage analysis: A unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 1996; 58:1347-63.
- Kuzniecky R, Murro A, King D, Morawetz R, Smith J, Powers R et al. Magnetic resonance imaging in childhood intractable partial epilepsies: pathologic correlations. *Neurology* 1993; 43: 681-7.
- Leventer RJ, Cardoso C, Ledbetter DH, Dobyns WB. *LIS1* missense mutations cause milder lissencephaly phenotypes including a child with normal IQ. *Neurology* 2001; 57:416-22.
- Palmini A, Andermann E, Andermann F. Prenatal events and genetic factors in epilepsy patients with neuronal migration disorders. *Epilepsia* 1994; 35:965-73.
- Parrini E, Ramazzotti A, Dobyns WB, Mei D, Moro F, Veggiotti P, et al. Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin A mutations. *Brain* 2006; 29:1892-906.
- Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, Wehnert M, Faustinella F, Dobyns WB, et al. Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature* 1993; 364:717-21.
- Robertson PS, Twigg SFR, Sutherland-Smith AJ, Biancalana V, Gorlin RJ, Horn D, et al. Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nature Genet* 2003; 33:487-91.
- Santos NF, Secolin R, Brandão-Almeida IL, Silva MS, Torres FR, Tsuneda SS, et al. A new candidate locus for bilateral perisylvian polymicrogyria mapped on chromosome Xq27. *Am J Med Genet* 2008; 146:1151-7.
- Terwillinger JD, Ott J. Handbook of human genetic linkage. Maryland: Johns Hopkins; 1993.
- Tietjen I, Bodell A, Apse K, Mendonza AM, Chang BS, Shaw GM, et al. Comprehensive *EMX2* genotyping of a large schizencephaly case series. *Am J Med Genet A* 2007; 143:1313-6.

16. Torres FR, Montenegro MA, Marques-De-Faria AP, Guerreiro MM, Cendes F, Lopes-Cendes I. Mutation screening in a cohort of patients with lissencephaly and subcortical band heterotopia. *Neurology* 2004; 62:799-802.
17. Tsuneda SS, Torres FR, Montenegro MA, Guerreiro MM, Cendes F, Lopes-Cendes I. A new missense mutation found in the *FLN1* gene in a family with Bilateral Periventricular Nodular Heterotopia (BPNH) alters the splicing process. *J Mol Neurosci* 2007; 35:195-200.
18. Uyanik G, Morris-Rosendahl DJ, Stiegler J, Klapcecki J, Gross C, Berman Y, et al. Location and type of mutation in the *LIS1* gene do not predict phenotypic severity. *Neurology* 2007; 69:442-7.
19. Villard L, Nguyen K, Cardoso C, Martin CL, Weiss AM, Sifry-Platt M, et al. A locus for Bilateral Perisylvian Polymicrogyria maps to Xq28. *Am J Hum Genet* 2002; 70:1003-8.
20. Wyllie E, Comair Y, Ruggieri P, Raja S, Prayson R. Epilepsy surgery in the setting of periventricular leukomacia and focal cortical dysplasia. *Neurology* 1996; 46:839-41.

Endereço para correspondência:

Fábio Rossi Torres
Departamento de Genética Médica – Faculdade de Ciências Médicas
Universidade Estadual de Campinas
Rua Tessália Vieira de Camargo
CEP: 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Tel.: (19)3521-8902 – E-mail: frossit@yahoo.com