

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**ESTUDO DE EXPRESSÃO GÊNICA EM PACIENTES
COM CALCIFICAÇÕES CEREBRAIS PORTADORES DE
MUTAÇÕES NO GENE *SLC20A2***

LYLYAN FRAGOSO PIMENTEL

Recife, 2014

LYLYAN FRAGOSO PIMENTEL

**ESTUDO DE EXPRESSÃO GÊNICA EM PACIENTES COM
CALCIFICAÇÕES CEREBRAIS PORTADORES DE MUTAÇÕES NO
GENE SLC20A2**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador:

Prof. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira
Departamento de Neuropsiquiatria, CCS/UFPE
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE

Co-orientadora:

Profa. Dra. Cíntia Renata Costa Rocha
Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE

Recife, 2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Pimentel, Lylyan Fragoso

Estudo de expressão gênica em pacientes com calcificações cerebrais de portadores de mutações no *SLC20A2*/ Lylyan Fragoso Pimentel– Recife: O Autor, 2014.

34 folhas : il., fig., tab.

Orientador: João Ricardo Mendes de Oliveira

Coorientadora: Cíntia Renata Costa Rocha

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de

Pernambuco. Ciências Biológicas, Ciências Biológicas, 2015.

Inclui bibliografia

- 1. Genética molecular 2. Regulação de expressão gênica I. Oliveira, João Ricardo Mendes de (orientadora) II. Rocha, Cíntia Renata Costa (coorientadora) III. Título**

572.8

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-183

LYLYAN FRAGOSO PIMENTEL

ESTUDO DE EXPRESSÃO GÊNICA EM PACIENTES COM CALCIFICAÇÕES CEREBRAIS PORTADORES DE MUTAÇÕES NO GENE SLC20A2

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Data da Aprovação 26/11/2015

Banca Examinadora

PROF. DR. JOÃO RICARDO MENDES DE OLIVEIRA
PRESIDENTE (ORIENTADOR)
DEPARTAMENTO DE NEUROPSIQUIATRIA – CCS/UFPE

PROF^a DR^a MICHELLY CRISTINY PEREIRA
1º TITULAR
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS – CCB/UFPE

PROF. DR. RAFAEL LIMA GUIMARÃES
2º TITULAR
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA – CCB/UFPE

DR^a ROBERTA RODRIGUES DE LEMOS
1º SUPLENTE
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI – UFPE

PROF. DR. JOSÉ LUIZ DE LIMA FILHO
2º SUPLENTE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA – CCB/UFPE

Recife, 2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas inúmeras oportunidades de aprendizado que me foram ofertadas durante este caminho e pelas pessoas a minha volta, com as quais este aprendizado se torna possível.

Aos meus pais, Pedro e Nadja, pelo suporte, pela paciência e pelo amor incondicional. Aos meus irmãos, Livia e Lucas, por todo carinho e por estarem sempre ao meu lado. Aos meus avós, que sempre serão minhas referências e os alicerces de quem eu sou. Aos inúmeros tios, tias, primos e primas pelos momentos prazerosos e divertidos.

Ao meu amado companheiro, Juan Luiz, com quem tenho o prazer de compartilhar a minha vida. Agradeço pelos ensinamentos, pela enorme paciência, pela confiança, por sua lealdade, por sua dedicação, pelo carinho e pelo amor construídos ao longo destes três anos de união.

Aos professores e mestres que tive ao longo de minha vida, desde o ensino fundamental às aulas na Pós-graduação.

Aos velhos e novos amigos que têm me acompanhado e me apoiado durante toda esta trajetória pelos ensinamentos e pelo aprendizado adquirido, Roberta Lemos, Eriton Cunha, Regina Galdino, Joana Braga e Matthew Keasey. À Professora Cíntia Rocha pela dedicação e pela paciência em me acompanhar durante os meus primeiros passos no Mestrado.

Ao Professor João Ricardo, por me acompanhar desde o meu ingresso na vida científica, pela preciosa oportunidade de trabalhar na linha de pesquisa que sempre almejei. Obrigado por ser um mestre, guia e modelo, pela confiança, por ter acreditado em mim.

Ao LIKA, por fornecer o espaço físico e as ferramentas necessárias para a realização da pesquisa.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo suporte financeiro durante o Mestrado.

RESUMO

As Calcificações Cerebrais Familiares Primárias (CCFP) constituem uma rara condição genética de herança autossômica dominante e se caracterizam, primordialmente, pela deposição simétrica e bilateral de cálcio nos gânglios da base do cérebro. Em 2012 foi identificada a primeira mutação associada com as CCFP no gene responsável pela codificação do tipo III de um transportador de fosfato inorgânico sódio-dependente (PiT2), o *SLC20A2*. Ele é reportado como o principal elemento do mecanismo patológico das CCFP, visto que, sua perda funcional está relacionada com o acúmulo de fosfato inorgânico na matriz extracelular. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o padrão de expressão do gene *SLC20A2* sob o efeito de mutações encontradas em amostras de pacientes com CCFP. O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total que foi isolado do sangue dos pacientes. Em seguida, com o uso da técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR), quantificou-se a expressão do mRNA nas amostras com base no método $\Delta\Delta C_t$. Os resultados obtidos demonstraram que a expressão do *SLC20A2* foi levemente reduzida (~10%) na amostra de um paciente portador de uma mutação nonsense, em comparação ao grupo controle. O eletroferograma do sequenciamento do cDNA indicou uma diminuição no pico do alelo mutante comparativamente ao DNA genômico, indicando que está ocorrendo o decaimento do mRNA mediado pela presença da mutação nonsense. Juntamente com os achados reportados na literatura, os dados desta pesquisa reforçam a necessidade da triagem dos genes relacionados às CCFP bem como das mutações envolvidas com suas bases moleculares.

Palavras-chave: Calcificações Cerebrais Familiares Primárias; gânglios da base; *SLC20A2*; expressão gênica

ABSTRACT

The Primary Familial Brain Calcifications (PFBC) is a rare genetic disease which present an autosomal dominant inheritance and is characterized by bilateral calcifications affecting basal ganglia. In 2012 it was identified the first mutation in *SLC20A2* associated with PFBC. The *SLC20A2* gene is responsible for encoding type III carrier of inorganic phosphate (Pi) sodium-dependent (PiT2) and it is reported as the major element of the PFBC pathological mechanism, once their functional loss is associated with the Pi accumulation in extracellular matrix. Therefore, this study aimed to evaluate the *SLC20A2* expression under the effect of mutations, in patients with PFBC. The cDNA was synthesized from total RNA isolated from patients peripheral blood. Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) was used to measure mRNA level amongst patients and controls based on the $\Delta\Delta C_t$ method. The results showed that the *SLC20A2* expression was slightly decreased ($\sim 10\%$) in the proband with a missense mutation, compared to control group expression. The results of cDNA sequencing showed reduced expression compared to genomic DNA mutant allele, indicating that the mRNA decay is occurring mediated by the presence of nonsense mutation. Together with the findings already reported in the literature, our data reinforce the need to screening for genes associated to the PFBC and the mutations involved with their molecular bases.

Keywords: Family Primary Cerebral calcifications; basal ganglia calcification; *SLC20A2*; gene expression

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: A. Tomografia Computadorizada (TC) do cérebro de indivíduo normal; ausência de calcificações. B. Calcificação simétrica e bilateral nos gânglios da base (seta amarela) e no tálamo (seta vermelha). C. Calcificações severas e extensas observadas nos gânglios da base e outras áreas do cérebro. Adaptado de Wang et al., 2012.	11
Figura 2: Calcificações observadas em cortes histológicos de diversas áreas do cérebro indicadas pelas setas pretas: vasos sanguíneos no cerebelo (A), córtex do cerebelo (B), núcleo denteado (C), córtex (D), hipocampo (E) e matéria branca. Coloração Hematoxilina-Eosina. Adaptado de Wider et al., 2009.	12
Figura 3: Diagrama esquemático da estrutura da proteína PiT-2 evidenciando as mutações associadas às CCFP. As regiões em roxo representam os domínios homólogos N-PD-1131 e C-PD-1131, importantes para a função transportadora de Pi da proteína. Os círculos azuis representam resíduos de aminoácidos mutados e os domínios transmembrana são numerados de I a XII. O modelo esquemático foi desenvolvido através do software TOPO 2 (http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO/top.html) (Wang et al., 2012).	13
 CAPÍTULO I	
Figure 1: Pedigree analysis and positive CT scan of index case with migraine and hypovitaminosis D. A Pedigree of the index case indicating the subjects with brain calcifications (only II-1) and those with migraine (I-2, II-1 and II-2). II-2 also presents thyrotoxicosis. B Horizontal CT scan slice showing spots of calcification in the basal ganglia for the proband.	26
Figure 2: De novo mutation in SLC20A2 gene. A, B Electropherograms showing a SLC20A2 de novo mutation in the patient (NM_006749.4:c.1158C>G), both in genomic DNA (A) and cDNA (B). This variant is absent in parents (C, D). Schematic diagram of wild-type and mutant SLC20A2 proteins highlighting a shorter putative PiT-2 protein due to a stop codon at the 386 amino acid residue (NP_006740.1:p.Y386X) (E). Both models were generated by TOPO2 online software (http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO2/).	27
 ANEXO	
PERSPECTIVA	
Figura 1: Níveis da expressão gênica obtidos a partir de qRT-PCR referente ao gene <i>SLC20A2</i> e ao microRNA 9 (miR9) em dois pacientes com CCFP.	29

LISTA DE ABREVIATURAS

CCFP	Calcificações Cerebrais Familiares Primárias
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CIGB	Calcificações Idiopáticas nos Gânglios da Base
DF	Doença de Fahr
IRM	Imagem de Ressonância Magnética
Pi	Fosfato Inorgânico
<i>PDGFβ</i>	<i>Platelet-derived growth factor - β</i>
<i>PDGFRβ</i>	<i>Platelet-derived growth factor - β receptor</i>
SLC	<i>Solute carrier</i>
qRT-PCR	PCR Quantitativa em Tempo Real
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
TC	Tomografia Computadorizada

SUMÁRIO

	Pág.
AGRADECIMENTOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
1. INTRODUÇÃO GERAL	10
1.1 Calcificações Cerebrais Familiares Primárias	10
1.1.1 Diagnóstico, Aspectos Clínicos e Neuropatológicos	10
1.1.2 Aspectos Genéticos e Moleculares	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivo Específico	14
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPÍTULO I	18
MANUSCRITO	19
ABSTRACT	20
INTRODUCTION	21
MATERIAL AND METHODS	21
<i>Subjects and Samples</i>	21
<i>DNA Sequencing</i>	21
<i>RNA Analysis</i>	22
RESULTS	22
<i>Clinical Features of Patient with SLC20A2 De Novo Mutation</i>	22
<i>Screening and Validation of a De Novo SLC20A2 Mutation</i>	22
DISCUSSION AND CONCLUSION	23
ACKNOWLEDGEMENTS	24
CONFLICT OF INTEREST	24
REFERENCES	25
ANEXOS	28
PERSPECTIVAS	29
ATIVIDADES COMPLEMENTARES	30
CONCLUSÕES GERAIS	33

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Calcificações Cerebrais Familiares Primárias

As calcificações ectópicas ocorrem segundo processos biológicos modulados por diversas moléculas e, frequentemente, podem causar danos em tecidos moles como o cérebro, vasos, rins, pulmões e coração (Nitschke & Rutsch, 2012). Os primeiros relatos de calcificações vasculares observadas nos gânglios da base do cérebro ocorreram em 1850 por Delacour. Ele descreveu o caso de um homem de 56 anos cujo quadro clínico era composto por rigidez e fraqueza severa dos membros inferiores acompanhadas de tremor. Os exames anatomopatológicos realizados após o óbito, revelaram calcificações cerebrais bilaterais e esclerose (Delacour, 1850; citado por Klein e Vieregge, 1998). Posteriormente, Bamberger e Pick documentaram estes achados detalhadamente em estudos histopatológicos (Manyam, 2005).

O epônimo “Doença de Fahr” (DF) tem sido associado às Calcificações Idiopáticas nos Gânglios da Base (CIGB) depois que o neurologista alemão Karl Theodor Fahr, em 1930, reportou áreas com calcificações microscópicas na autópsia realizada no cérebro de um paciente de 81 anos com histórico de demência (Saleem et al., 2013). Desde então, o termo Doença de Fahr vem sendo amplamente associado a todas as formas de mineralização bilateral nos gânglios da base e em outras áreas do cérebro (Manyam, 2005). Entretanto, esse padrão de calcificação também é encontrado em diversas manifestações como nas doenças endócrinas, distúrbios neurológicos e processos infecciosos, o que a torna um marcador não-específico (Oliveira, 2011).

Recentemente, a nova nomenclatura “Calcificações Cerebrais Familiares Primárias” (CCFP) foi proposta em substituição dos termos usuais visto que, suas bases genéticas já foram identificadas e, ainda, as calcificações também são vistas em outras áreas cerebrais além dos gânglios basais (Sobrido et al., 2013). Devido ao caráter generalista das calcificações cerebrais, é extremamente importante a realização de exames complementares que garantam o diagnóstico adequado do fenótipo do paciente buscando sua real causa e origem. Isto permitirá a caracterização das formas idiopática e não-idiopática das calcificações além de contribuir para o estabelecimento de uma definição nosológica mais precisa (Oliveira, 2011).

1.1.1 Diagnóstico, Aspectos Clínicos e Neuropatológicos

As CCFP caracterizam-se por uma ampla heterogeneidade clínica entre os indivíduos afetados, sejam todos de uma mesma família ou entre famílias diferentes. A manifestação clínica mais comum são os distúrbios motores como o Parkinsonismo, observado em mais da metade dos casos.

Outros sintomas compõem o quadro clínico como distonia, comprometimento cognitivo, demência, ataxia, convulsões, desordem da marcha e enxaqueca crônica. Dentre os sintomas cognitivos listam-se distúrbios de humor, psicose, depressão, transtorno obsessivo compulsivo, bipolaridade e depressão. Ainda há casos de pacientes que sequer desenvolvem sintomas ou apresentam comorbidades clínicas como hipertensão arterial juntamente com o achado das calcificações (Manyam, 2005; Oliveira, 2011; Wang et al., 2012; Nicolas et al., 2014).

Alguns estudos relatam diferentes tipos de CCFP segundo a idade de surgimento dos sintomas. A forma infantil, que ocorre nos primeiros anos de vida, é mais rara e manifesta sinais psicóticos semelhantes à esquizofrenia; a de início tardio, entre 40 e 60 anos de idade, exibe sintomas como demência e distúrbios no movimento (Saleem et al., 2013)

O diagnóstico das CCFP é obtido através de detalhada investigação do histórico clínico e familiar do paciente atrelado às ferramentas de neuroimagem como Tomografia Computadorizada (TC) ou Imagem de Ressonância Magnética (IRM). Ainda são utilizados testes bioquímicos a fim de investigar a presença de doenças metabólicas e também deve-se atentar para: presença de calcificação bilateral nos gânglios da base, disfunções neurológicas, ausência de características somáticas que sinalizem doença mitocondrial, ausência de infecções ou intoxicação, níveis séricos de cálcio e paratormônio para que se confirme a ausência de hipoparatiroidismo (Manyam, 2005; Oliveira, 2011; Saleem et al., 2013).

O processo de mineralização observado nas CCFP pode ser desencadeado por distúrbios metabólicos e inflamatórios mas também pode ser controlado por fatores genéticos. Os exames neuropatológicos revelam a presença de calcificações ao redor dos capilares, na parede das arteríolas e em pequenas veias nas regiões afetadas no cérebro, causando morte neuronal e gliose. Diversos estudos demonstram que as calcificações ocorrem bilateral e simetricamente na maioria dos casos, e se concentram em áreas como os gânglios basais, tálamo, núcleo denteado, córtex cerebral, matéria branca subcortical do cerebelo e no hipocampo (Figura 1). A composição das calcificações pode variar de acordo com a região afetada porém, os minerais mais encontrados são o fosfato de cálcio e carbonato além de gliconato, mucopolissacarídeos e traços de Alumínio, Ferro, Cobalto, Cobre, Molibdênio, Zinco, Magnésio, Fósforo, Prata e Manganês (Figura 2) (Duckett et al., 1977; Manyam, 2005; Oliveira, 2011; Saleem et al., 2013; Taglia et al., 2014).

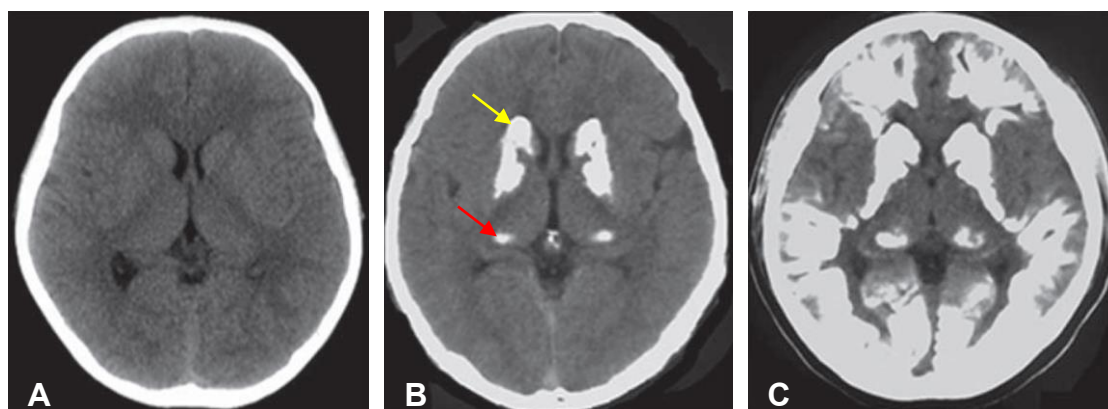


Figura 1 – A. Tomografia Computadorizada (TC) do cérebro de indivíduo normal; ausência de calcificações. B. Calcificação simétrica e bilateral nos gânglios da base (seta amarela) e no tálamo (seta vermelha). C. Calcificações severas e extensas observadas nos gânglios da base e outras áreas do cérebro. Adaptado de Wang et al., 2012.

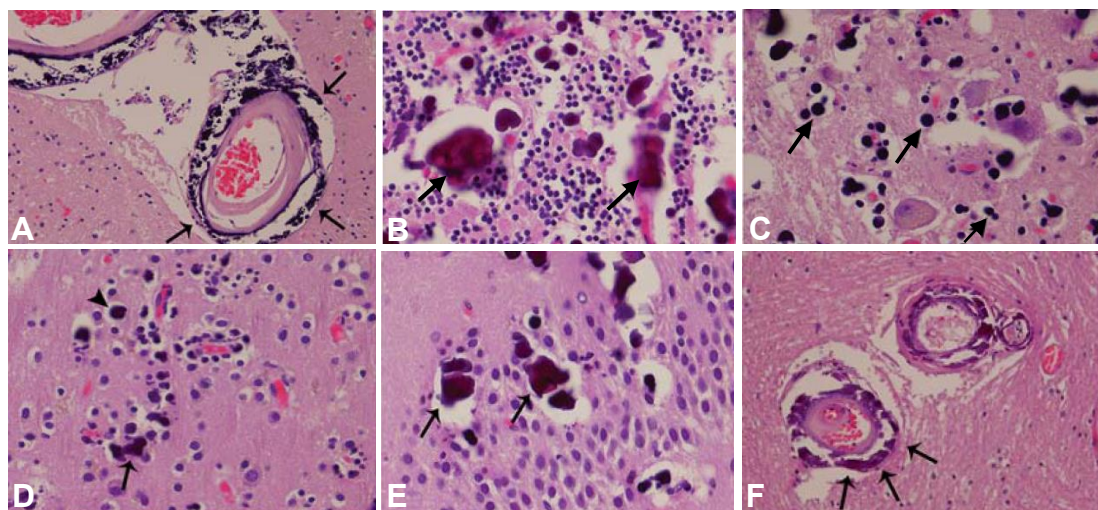


Figura 2 – Calcificações observadas em cortes histológicos de diversas áreas do cérebro indicadas pelas setas pretas: vasos sanguíneos no cerebelo (A), córtex do cerebelo (B), núcleo dentado (C), córtex (D), hipocampo (E) e matéria branca. Coloração Hematoxilina-Eosina. Adaptado de Wider et al., 2009.

Análises de microscopia eletrônica sugerem que as calcificações se originam em um ponto inicial e aumentam progressivamente em volume e área afetada. Alguns autores sugerem que esse processo de expansão tem sua origem com as mitocôndrias neuronais (Lemos et al., 2013). Tem sido relatado que a deficiência na expressão de vários inibidores de calcificações seria suficiente para disparar este processo. Por outro lado, as calcificações vasculares resultariam do excesso sistêmico de mediadores estimulantes de calcificação, a exemplo do fosfato inorgânico (Pi) (Nitschke & Rutsch, 2012).

Outra característica observada em alguns casos de CCFP é a diminuição dos níveis de vitamina D, importante agente atuante na homeostase de cálcio e fósforo em diversos tecidos do corpo como osso, intestino, cérebro e músculo. Estudos já constataram que a hipovitaminose D associada à hipocalcemia e hiperparatireoidismo, vem acompanhada por calcificações intracraniais que afetam principalmente os gânglios da base, o córtex, o tálamo e o cerebelo. Ademais, depósitos de cálcio também foram observados em pacientes com CCFP que apresentavam níveis normais de Cálcio e Fósforo porém, níveis reduzidos de vitamina D (Kalue et al., 2006).

1.1.2 Aspectos Genéticos e Moleculares

As CCFP geralmente são herdadas de forma autossômica dominante e já foram identificados três principais genes que possuem mutações associadas à doença: *SLC20A2*, *PDGFRβ* (sigla do inglês, platelet-derived growth factor β) e *PDGFRβ* (platelet-derived growth factor receptor β) (Hsu et al., 2013; Keller et al., 2013; Nicolas et al., 2014).

Localizado na posição 5q32, o gene *PDGFRβ* codifica uma proteína da superfície celular das plaquetas com função de receptor da tirosina-quinase para dos fatores de crescimento derivados de plaqueta (Tallquist et al., 2000).

Recentemente, Nicolas et al. (2013) identificaram mutações no *PDGFRβ* associadas as CCFP em duas famílias francesas. Os autores relatam também que a ativação deste receptor leva à ativação de vias de sinalização que disparam processos de proliferação, diferenciação e migração celular. O gene *PDGFRβ* é expresso no cérebro humano principalmente nos gânglios da base e no núcleo denteado do cerebelo, corroborando os achados das calcificações em pacientes com CCFP (Nicolas et al., 2013).

O gene *PDGFβ* codifica a principal proteína ligante do *PDGFRβ*, a PDGF-B, que possui um importante papel como fator de crescimento nas células mesenquimais e no recrutamento dos pericitos durante o processo de angiogênese (Keller et al., 2013). Uma mutação de perda de função foi identificada recentemente no gene *PDGFβ* levando ao surgimento das CCFP através do comprometimento da integridade da barreira hematoencefálica (Nicolas et al., 2014).

Na posição 8p11.21 (sub-banda 21, banda 1, região 1 do braço curto do cromossomo 8) foi identificada uma família proteica denominada SLC20 a qual pertence à superfamília de trans

portadores de soluto SLC (SLC – *solute carrier*) (Chen et al., 2013; Yamada et al., 2014).

A superfamília SLC compõe um grande grupo de proteínas transmembrana que estão presentes em células de mamíferos e controlam a absorção celular, o fluxo de nutrientes, de neurotransmissores, metabólitos, drogas e toxinas. As proteínas que fazem parte desta superfamília foram inicialmente identificadas como receptores retrovirais (Ram-1) e posteriormente caracterizadas como cotransportadores de sódio (Na^+) e Pi (Bai et al., 2013; Villa-Bellosta et al., 2009).

À família SLC20 pertencem os genes *SLC20A1* e *SLC20A2*, responsáveis pela codificação do tipo III de transportadores de fosfato inorgânico sódio-dependente, PiT1 e PiT2, respectivamente (Figura 3). Estes genes são vastamente expressos e em níveis variáveis nos diferentes tecidos, o que sugere que eles funcionam como *housekeeping genes* atuando na manutenção da captação de Pi para dentro das células sob diferentes condições de pH (Forster et al., 2013; Wang et al., 2012).

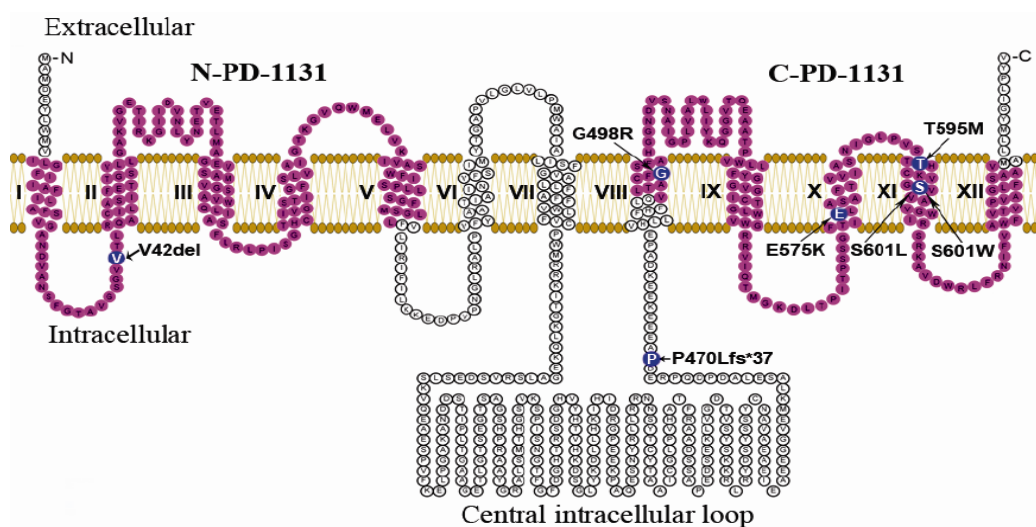


Figura 3 – Diagrama esquemático da estrutura da proteína PiT-2 evidenciando as mutações associadas às CCFP. As regiões em roxo representam os domínios homólogos N-PD-1131 e C-PD-1131, importantes para a função transportadora de Pi da proteína. Os círculos azuis representam resíduos de aminoácidos mutados e os domínios transmembrana são numerados de I a XII. O modelo esquemático foi desenvolvido através do software TOPO 2 (<http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO/top.html>) (Wang et al., 2012).

Recentemente têm sido relatadas outras funções associadas ao gene *SLC20A1*, além da atividade transportadora. Ele é descrito como desempenhando importante papel na homeostase de Pi nos ossos bem como na função da paratireoide e ainda está associado ao processo de calcificação nos vasos sanguíneos. Estudos de expressão demonstraram que depleção da PiT1 é capaz de reduzir a proliferação celular além de comprometer o processo mitótico. Corroborando com esses achados, estudos *in vivo* evidenciaram que o nocaute deste gene em camundongos causava letalidade dos embriões, refletindo a importância da PiT1 no desenvolvimento (Forster et al., 2013).

Atualmente, cerca de vinte famílias de várias etnias já foram relatadas como portadoras de diferentes mutações no *SLC20A2*. Mutações neste gene são associadas à aproximadamente 40% dos casos de CCFP e a perda da sua função está relacionada com o acúmulo de Pi na matriz extracelular causando, assim, a deposição de fosfato de cálcio. Por estes motivos, o gene *SLC20A2* é reportado como o principal elemento do mecanismo patológico das CCFP (Hsu et al., 2013; R R Lemos, Oliveira, & Oliveira, 2013; Wang et al., 2012).

A expressão do *SLC20A2*, bem como sua função de *housekeeping* na manutenção da homeostase do Pi, se estende por vários tecidos do corpo incluindo células da musculatura lisa, osso, paratireoide, rins, intestino e cérebro (Bøttger & Pedersen, 2011; Ishimura & Aito, 2008; Villa-Bellosta et al., 2009). Mutações associadas às CCFP também já foram identificadas na PiT2 em uma região com resíduos de glutamato altamente conservados que possui um papel crucial no transporte do Pi (Bottger & Pedersen, 2002). Ensaios posteriores inseriram tais mutações no modelo animal *Xenopus*, resultando no comprometimento da captação do Pi, o que sugere que estas mutações podem estar diretamente relacionadas com a haploinsuficiência do gene (Wang et al., 2012).

Diversos tipos de mutações têm sido reportadas no gene *SLC20A2*: missense, pontual, deleção, nonsense, sinônima e mutações em sítios de *splicing*. Através dos estudos moleculares e análises *in silico* com softwares de predição de patogenicidade, essas mutações foram caracterizadas como deletérias (Roberta et al., 2013).

Zhang et al. (2013) recentemente realizaram estudos de expressão do gene *SLC20A2* em pacientes afetados pelas CCFP através de PCR Quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR). Os resultados detectaram uma redução de aproximadamente 30% na expressão do *SLC20A2* nos pacientes em relação aos controles, devido à uma deleção (c.510delA) que produz uma proteína truncada com stop códon prematuro (Zhang et al., 2013).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o padrão de expressão do gene *SLC20A2* em amostras de pacientes com mutações neste gene.

2.2 Objetivo Específico

Estudar a expressão do gene *SLC20A2* através dos níveis de RNA mensageiro em amostras de pacientes portadores de mutações correlacionando o padrão de expressão com os diferentes tipos de mutações encontradas.

REFERÊNCIAS

- Bai, L., Collins, J. F., Ghishan, F. K., Marks, J., Debnam, E. S., Unwin, R. J., ... Forster, I. C. (2013). Cloning and characterization of a type III Na-dependent phosphate cotransporter from mouse intestine. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279(4), C1135–C1143.
- Böttger, P., & Pedersen, L. (2002). Two highly conserved glutamate residues critical for type III sodium-dependent phosphate transport revealed by uncoupling transport function from retroviral receptor function. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(45), 42741–7. doi:10.1074/jbc.M207096200
- Bøttger, P., & Pedersen, L. (2011). Mapping of the minimal inorganic phosphate transporting unit of human PiT2 suggests a structure universal to PiT-related proteins from all kingdoms of life. *BMC Biochemistry*, 12(1), 21. doi:10.1186/1471-2091-12-21
- Chen, W.-J., Yao, X.-P., Zhang, Q.-J., Ni, W., He, J., Li, H.-F., ... Wu, Z.-Y. (2013). Novel SLC20A2 mutations identified in southern Chinese patients with idiopathic basal ganglia calcification. *Gene*, 529(1), 159–62. doi:10.1016/j.gene.2013.07.071
- Duckett, S., Galle, P., Poirier, J., & Hauw, J. (1977). Presence of Zinc , Aluminum , Magnesium in Striopalledodentate (SPD) Calcifications (Fahr ’ s Disease): Electron Probe Study *, 10, 7–10.
- Forster, I. C., Hernando, N., Biber, J., & Murer, H. (2013). Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2-3), 386–95. doi:10.1016/j.mam.2012.07.007
- Hsu, S. C., Sears, R. L., Lemos, R. R., Quintáns, B., Huang, A., Spiteri, E., ... Coppola, G. (2013). Mutations in SLC20A2 are a major cause of familial idiopathic basal ganglia calcification. *Neurogenetics*, 14(1), 11–22.
- Ishimura, M. N., & Aito, S. N. (2008). Tissue-specific mRNA Expression Profiles of Human Solute Carrier Transporter Superfamilies, 23(1), 22–44.
- Kalue, A., Loseva, E., Haapasalo, H., Rantala, I., Keranen, J., & Lou, Y. (2006). Thalamic calcification in vitamin D receptor knockout mice. *Genetics of Nervous System Diseases*, 17(7), 717–721.
- Keller, A., Westenberger, A., Sobrido, M. J., García-Murias, M., Domingo, A., Sears, R. L., ... Oliveira, J. R. M. (2013). Mutations in the gene encoding PDGF-B cause brain calcifications in humans and mice. *Nature Genetics*, 45(9), 1077–82.
- Klein, C. & Vieregge, P. (1998). Fahr's disease - far from a disease. *Movement Disorders*, 13, 620-621

- Lemos, R. R., Ferreira, J. B. M. M., Keasey, M. P., & Oliveira, J. R. M. (2013). *An update on primary familial brain calcification. International review of neurobiology* (1st ed., Vol. 110, pp. 349–71). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-410502-7.00015-6
- Lemos, R. R., Oliveira, M. F., & Oliveira, J. R. M. (2013). Reporting a new mutation at the SLC20A2 gene in familial idiopathic basal ganglia calcification. *European Journal of Neurology: The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies*, 20(3), e43–4. doi:10.1111/ene.12044
- Manyam, B. V. (2005a). What is and what is not “Fahr”’s disease’. *Parkinsonism & Related Disorders*, 11(2), 73–80. doi:10.1016/j.parkreldis.2004.12.001
- Nicolas, G., Jacquin, A., Thauvin-Robinet, C., Rovelet-Lecrux, A., Rouaud, O., Pottier, C., ... Hannequin, D. (2014). A de novo nonsense PDGFB mutation causing idiopathic basal ganglia calcification with laryngeal dystonia. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, (August 2013), 1–3. doi:10.1038/ejhg.2014.9
- Nicolas, G., Pottier, C., Maltête, D., Coutant, S., Rovelet-lecrux, A., Augustin, J., ... Campion, D. (2013). Mutation of the PDGFRB gene as a cause of idiopathic basal ganglia calcification, 181–187.
- Nitschke, Y., & Rutsch, F. (2012). Genetics in arterial calcification: lessons learned from rare diseases. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 22(6), 145–9. doi:10.1016/j.tcm.2012.07.011
- Oliveira, J. R. M. (2011). *Managing Idiopathic Basal Ganglis Calcification (“Fahr’s Disease”)*. New York: Nova Science Publishers.
- Saleem, S., Aslam, H. M., Anwar, M., Anwar, S., Saleem, M., Saleem, A., & Rehmani, M. A. K. (2013). Fahr’s syndrome: literature review of current evidence. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8(1), 156. doi:10.1186/1750-1172-8-156
- Taglia, I., Mignarri, A., Olgiati, S., Menci, E., Petrocelli, P. L., Breedveld, G. J., ... Dotti, M. T. (2014). Primary familial brain calcification: Genetic analysis and clinical spectrum. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 00(00), 1–5. doi:10.1002/mds.26053
- Tallquist, M. D., Klinghoffer, R. A., Heuchel, R., Mueting-nelsen, P. F., Corrin, P. D., Heldin, C., ... Soriano, P. (2000). Retention of PDGFR- α function in mice in the absence of phosphatidylinositol 3 -kinase and phospholipase C β signaling pathways, 3179–3190. doi:10.1101/gad.844700.it
- Villa-Bellosta, R., Ravera, S., Sorribas, V., Stange, G., Levi, M., Murer, H., ... Forster, I. C. (2009). The Na⁺-Pi cotransporter PiT-2 (SLC20A2) is expressed in the apical membrane of rat renal proximal tubules and regulated by dietary Pi. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 296(4), F691–9. doi:10.1152/ajprenal.90623.2008

- Wang, C., Li, Y., Shi, L., Ren, J., Patti, M., Wang, T., ... Liu, J.-Y. (2012a). Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. *Nature Genetics*, 44(3), 254–6. doi:10.1038/ng.1077
- Wang, C., Li, Y., Shi, L., Ren, J., Patti, M., Wang, T., ... Liu, J.-Y. (2012b). Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. *Nature Genetics*, 44(3), 254–6. doi:10.1038/ng.1077
- Wider, C., Dickson, D. W., Schweitzer, K. J., Broderick, D. F., & Wszolek, Z. K. (2009). Familial idiopathic basal ganglia calcification: a challenging clinical-pathological correlation. *Journal of Neurology*, 256(5), 839–42. doi:10.1007/s00415-009-5025-6
- Yamada, M., Tanaka, M., Takagi, M., Kobayashi, S., Taguchi, Y., Takashima, S., ... Hozumi, I. (2014). Evaluation of SLC20A2 mutations that cause idiopathic basal ganglia calcification in Japan. *Neurology*, 82(8), 705–12. doi:10.1212/WNL.0000000000000143
- Zhang, Y., Guo, X., & Wu, A. (2013). Association between a novel mutation in SLC20A2 and familial idiopathic basal ganglia calcification. *PloS One*, 8(2), e57060. doi:10.1371/journal.pone.0057060

CAPÍTULO I

Manuscrito publicado no Periódico *Journal of Molecular Neuroscience*

Fator de Impacto: 2.757

Qualis CAPES Ciências Biológicas I: B1

First Report of a De Novo Mutation at SLC20A2 in a Patient with Brain Calcification

J. B. Ferreira¹ & L. Pimentel¹ & M. P. Keasey¹ & R. R. Lemos¹ & L. M. Santos² & M. F. Oliveira³ & S. Santos⁴ & N. Jensen⁵ & K. Teixeira¹ & L. Pedersen⁵ & C. R. Rocha¹ & M. R. Dias da Silva² & J. R. M. Oliveira¹

¹ Keizo Asami Laboratory (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil

² Laboratory of Molecular and Translational Endocrinology, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

³ Neurosurgery Residency Program, Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

⁴ Forensics Lab-Social Defense Secretary, Governo do Estado de Pernambuco, Recife, Brazil

⁵ Department of Molecular Biology and Genetics, Aarhus University, Aarhus, Denmark

Corresponding author: joao.ricardo@ufpe.br

ABSTRACT

Primary familial brain calcification (PFBC) is identified by mineralization of the basal ganglia and other brain regions in the absence of known causes. The condition is often inherited in an autosomal dominant pattern and can manifest itself clinically with neuropsychiatric symptoms such as Parkinsonism, headaches, psychosis, and mood swings. Mutations in the *SLC20A2* gene account for ~40 % of inherited cases, and this gene encodes an inorganic phosphate transporter (PiT-2), a transmembrane protein associated with Pi homeostasis. The p.Y386X mutation in *SLC20A2* was identified in a patient who presented migraines, brain calcification, and mild but chronic hypovitaminosis D. *SLC20A2* c.1158C>G single-nucleotide heterozygous mutation results in a premature stop codon and a putative truncated protein of 385 amino acids. Proband parents do not present the mutation, which is also not present in major public SNP databases, suggesting a de novo sporadic trait. This study describes for the first time a de novo *SLC20A2* mutation in a PFBC patient with migraine and mild hypovitaminosis D. This data further reinforces the pathogenic role of *SLC20A2* mutations as causal factors in PFBC physiopathology.

Keywords: *SLC20A2*, Brain calcification, VitaminD, Inorganic phosphate, De novo mutation

INTRODUCTION

Calcification of the brain can occur secondarily to other conditions such as infections (e.g., neurocysticercosis) and hormonal and biochemical imbalances. However, the terms “idiopathic basal ganglia calcification” or “Fahr’s disease” were often used as synonyms to refer to cases without an apparent etiology. More recently, a new nomenclature suggests “primary familial brain calcification” (PFBC) as more appropriate for diagnostic purposes (Sobrido et al. 2013).

Common clinical manifestations include Parkinsonism, psychosis, dementia, and headaches, with an autosomal dominant pattern of inheritance for calcifications in the basal ganglia, thalamus, and dentate nuclei. In 2012, the first mutations associated with PFBC were reported in *SLC20A2* (chromosome 8) encoding the ubiquitously expressed inorganic phosphate transporter PiT-2. Currently, almost 40 *SLC20A2* mutations have been associated with PFBC (Bøttger and Pedersen 2002; Wang et al. 2012; Nicolas et al. 2014b). More recently, mutations in platelet-derived growth factor (*PDGFB*) and its receptor *PDGFRB* genes have been found in multiple PFBC patients. This data suggests that several pathways might lead to a similar phenotype (Keller et al. 2013; Nicolas et al. 2013). Here, we report the discovery of the first de novo *SLC20A2* mutation in a Brazilian patient with brain calcification found during the investigation of a chronic migraine.

METHODS

Subjects and Samples

An index case presenting chronic headaches was initially investigated with full blood and urine screening as well as neuroimaging analysis. Screening was also performed in three of the patient’s relatives. CT scans were available only for subjects I-2, II-1, and II-2. Peripheral blood samples were collected from four subjects: index case and three relatives (Fig. 1a). A skin biopsy was also performed on the proband for DNA and RNA analysis. This project was approved by the UFPE Ethics Committee with signed informed consent forms from each subject.

DNA Sequencing

Genomic DNA from blood and skin was isolated by saltingout protocol. PCR amplicons for *SLC20A2* exons were generated from blood DNA and sequenced by the Sanger method, using primers and cycle conditions described previously (Wang et al. 2012). Exon variants were analyzed using CLC Main Workbench software (Qiagen, USA). The identified mutation was verified by PCR and sequencing with five replicates in the proband and two for each relative.

To confirm the biological relationship between the parents and proband, DNA was amplified and short tandem repeat (STR) analysis was performed with “Identifiler® Plus” (Life Technology, USA) and “PowerPlex® 16 HS” systems (Promega, USA) using 18 loci.

RNA Analysis

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed to quantify SLC20A2 messenger RNA (mRNA) expression in samples using the $\Delta\Delta CT$ method. Total RNA was isolated from blood using PAXgene Blood RNA System (Qiagen, #762174, Switzerland). Reverse transcription was performed for each sample using the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific Bio, #K1632, USA) in a 20- μ L reaction containing 500 ng of total RNA. Real-time reactions were as follows: 1 μ L complementary DNA (cDNA), 3.5 μ L H₂O, and 5 μ L TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, #4369510, Foster City, CA) with 0.5 μ L of 20 $\times$ TaqMan Gene Expression Assay (Hs_00198840_m1; Applied Biosystems) or 20 $\times$ TaqMan® Endogenous Control (Hs_02758991_g1; Applied Biosystems) in a 10- μ L reaction. Real-time PCR reactions were run in triplicate and run using a 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems). PCR-amplified cDNA fragments were then sequenced with automatic Sanger sequencing using the primers as follows: forward (5'-TCT GCT GCA CAA AAT CCA CA-3') and reverse (5'-ACG GGT GTA GCT GCT TCT TG-3').

RESULTS

Clinical Features of Patient with SLC20A2 De Novo Mutation

A 33-year-old female (mother of two children, employed as a real estate manager) was under investigation for chronic migraine, with mild functional impairment that had progressed recently. The chronic migraine had characteristically a pulsating pattern, was sensitive to light, and sometimes during over 24 h. This initially took her to an ER, and a neurological follow-up detected the calcifications. Various medications were used to alleviate this intermittent symptom. The patient also referred to regular menses not linked to a regular menstrual cycle. No neurological deficits were observed on physical examination.

A CT scan revealed bilateral calcifications in the globus pallidus and pulvinar region of the thalamus and less intensely in the dentate nucleus. Sparse calcifications also presented in the white matter of the cerebellum and frontal subcortical regions (Fig. 1b). Hemoglobin, ceruloplasmin, and serological testing for toxoplasmosis, CMV, HIV, and hepatorenal biochemical markers were normal. Adenohypophyseal hormones such as prolactin, GH, TSH, FSH, and LH, together with cortisol, glucose, and lipids, were all within normal levels.

Biochemical and endocrinological tests revealed only mild hypovitaminosis D (16 nmol/L of 25 hydroxyvitamin D [25(OH)D]). A supplementation was prescribed, but no change was detected at serum level follow-up (15 nmol/L of 25(OH)D). The proband reported a familial history of dementia (mother and maternal aunt) and thyrotoxicosis (Graves' disease) in a younger sister. Neuroimaging analysis of both mother and sister showed no calcification (data not shown).

Screening and Validation of a De Novo SLC20A2 Mutation

We identified the new mutation p.Y386X in exon 10 (previously exon 8) of the SLC20A2 gene (NM_006749.4:c.1158C>G; NP_006740.1), which results in a premature stop codon and a putative truncated protein with 385 amino acids instead of 652 (Fig. 2).

This mutation was not observed in the online databases EVS and 1000 Genomes or in 55 controls from the Inseer/Ruen exome databases. Three relatives of the patient (two generations) were screened for the mutation, all of which showed negative (Figs. 1a and 2c, d). The biological relationship between the proband and parents was confirmed by multiplex STR analyses (data not shown).

Since somatic mosaicism is common in subjects with rare disorders and de novo mutations, we screened another tissue from a different embryonic origin, which also contained the mutation. We also analyzed mRNA expression in RNA extracted from peripheral blood of the proband by RT-qPCR. *SLC20A2* expression was decreased by ~10 % (data not shown) in the proband. cDNA sequence reads show a reduced peak correspondent to the mutant allele (Fig. 2b), comparatively with the genomic DNA (Fig. 2a).

DISCUSSION

This is the first report of a de novo mutation in the *SLC20A2* gene, reinforcing the causative role of pathogenic variations of this gene in PFBC. Curiously, this patient also presents mild but chronic hypovitaminosis D. In 2012, the patient was diagnosed with hypovitaminosis D, and despite prescription of supplements, there was no change (parathyroid hormone was within the normal range in both instances).

Chronic hypovitaminosis D is influenced by several factors, i.e., age, skin tone, latitude, sun exposure, and season of the year. In addition, hypovitaminosis D is a common problem in the city of São Paulo (Maeda et al. 2013). Therefore, without further evidence, it was not possible to confirm if the hypovitaminosis D was a comorbidity or a new phenotype.

Analysis of *SLC20A2* mRNA expression demonstrated only a small decrease in *SLC20A2* expression (~10 % decrease relative to controls) despite the proband carrying a premature transcription termination signal (stop codon). Zhang et al. (2013) performed similar experiments and described a decrease by ~30 % in *SLC20A2* expression in patients carrying the mutation. This might be due to compensation by the wild-type allele triggered by allelic loss. In our study, a stable expression of mutant *SLC20A2* mRNA or upregulation of the wild-type allele could account, on one hand, for the small differences we observed in our RTqPCR.

On the other hand, cDNA sequence reads suggest lower expression of the mutant allele (Fig. 2b), comparatively with the genomic DNA (Fig. 2a), suggesting an RNA-mediated decay, typically found in stop codon carriers. *SLC20A2* and other genes associated with PFBC should also be screened for mutations in patients with non-idiopathic brain calcifications. The presence of hypovitaminosis D in the proband likely exists as a comorbidity due to the absence of this condition in previous PFBC patients with *SLC20A2* mutations.

However, it is necessary to document this finding and to be aware of occasional future reports. Nicolas et al. (2014a) recently reported a de novo mutation in *PDGFB*, the second most frequent mutated gene in PFBC, in a patient with brain calcification and laryngeal dystonia. Together with our report, such findings reinforce the need to screen for mutations linked to PFBC even in cases with sporadic and atypical phenotype.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ihgu Lucena and Dr. Juliana Machado for technical assistance with sample processing; FACEPE (APQ 1831- 4.01/12) and CNPq (457556/2013-7;307909/2012-3;400540/2013-4) for the financial support; and Gaël Nicolas (Ruen University), Paula Sandrin, and Sérgio Crovella. J.B.F. and L.M.S. hold FACEPE and CAPES fellowships, respectively.

CONFLICT OF INTEREST

S.S., L.P., C.R., M.R.D.S., L.S., and J.R.M.O. work in public institution and did not receive any incentive from private companies. J.R.M.O. is the author of a book about familial brain calcification, edited by Nova Publishing (USA). J.F., L.P., M. K., R.R.L., M.F.O., N.J., and K.T. receive fellowships from graduate, undergraduate and post-graduate programs. The authors report no other disclosure and no conflict of interest directly linked to this report.

REFERENCES

- Bøttger P, Pedersen L (2002) Two highly conserved glutamate residues critical for type III sodium-dependent phosphate transport revealed by uncoupling transport function from retroviral receptor function. *J Biol Chem* 277:42741–42747
- Keller A, Westenberger A, Sobrido MJ et al (2013) Mutations in the gene encoding PDGF-B cause brain calcifications in humans and mice. *Nat Genet* 45:1077–1082
- Maeda SS, Saraiva GL, Kunii IS et al (2013) Factors affecting vitamin D status in different populations in the city of São Paulo, Brazil: the São Paulo vitamin D Evaluation Study (SPADES). *BMC Endocr Disord* 13:14
- Nicolas G, Pottier C, Maltête D et al (2013) Mutation of the PDGFRB gene as a cause of idiopathic basal ganglia calcification. *Neurology* 80:181–187
- Nicolas G, Rovelet-Lecrux A, Pottier C et al (2014a) PDGFB partial deletion: a new, rare mechanism causing brain calcification with leukoencephalopathy. *J Mol Neurosci* 53:171–175
- Nicolas G, Richard AC, Pottier C, Verny C, Durif F, Roze E, Favrole P, Rudolf G, Anheim M, Tranchant C, Frebourg T, Campion D, Hannequin D (2014b) Overall mutational spectrum of SLC20A2, PDGFB and PDGFRB in idiopathic basal ganglia calcification. *Neurogenetics*. doi:10.1007/s10048-014-0404-2
- Sobrido MJ, Copolla G, Oliveira JRM, Hopfer S, Geschwind DH (2013) Familial primary brain calcification. In P. RA, B. TD, & D. CR (Eds.), *Gene reviews™*, (2014 ed.). University of Washington, Seattle
- Wang C, Li Y, Shi L et al (2012) Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. *Nat Genet* 44:254–256
- Zhang Y, Guo X, Wu A (2013) Association between a novel mutation in SLC20A2 and familial idiopathic basal ganglia calcification. *PLoS One* 8:e57060

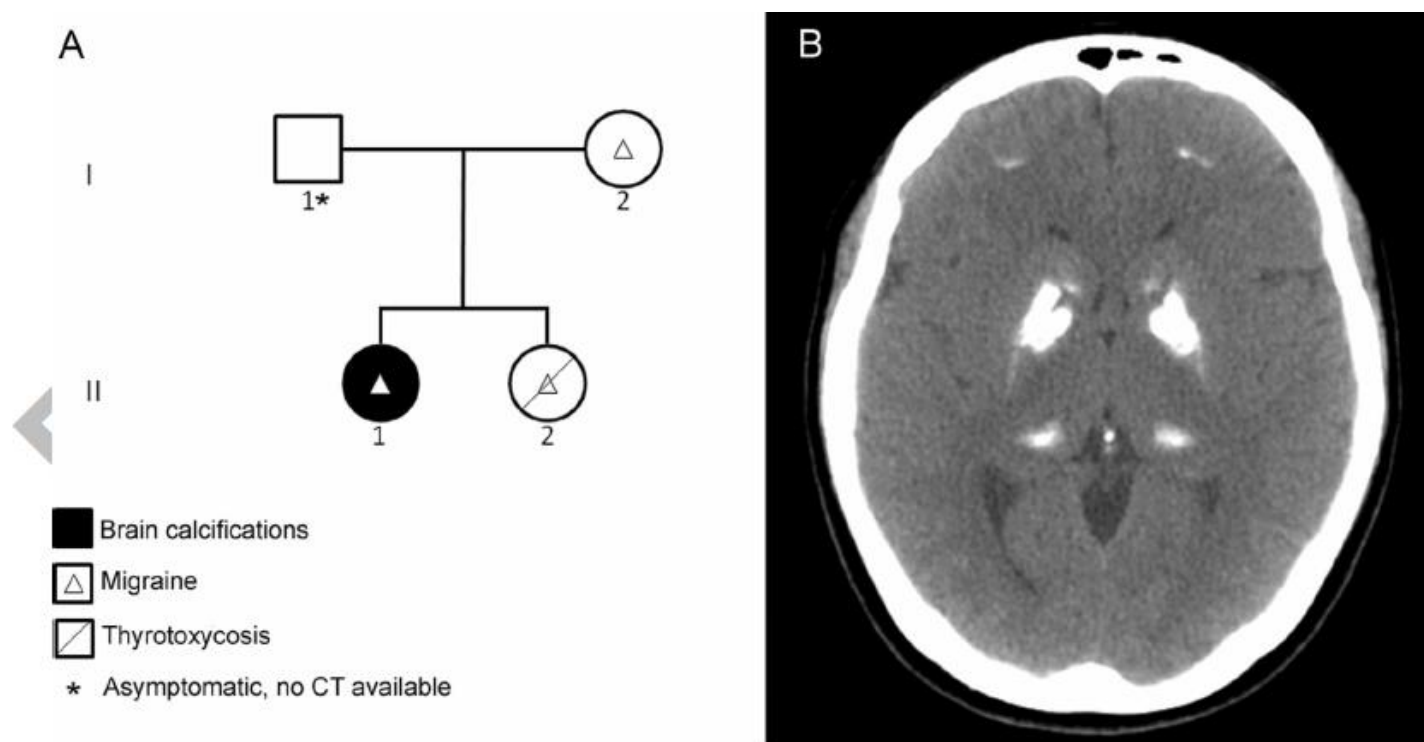


Fig. 1 – Pedigree analysis and positive CT scan of index case with migraine and hypovitaminosis D. **A** Pedigree of the index case indicating the subjects with brain calcifications (only II-1) and those with migraine (I-2, II-1 and II-2). II-2 also presents thyrotoxicosis. **B** Horizontal CT scan slice showing spots of calcification in the basal ganglia for the proband.

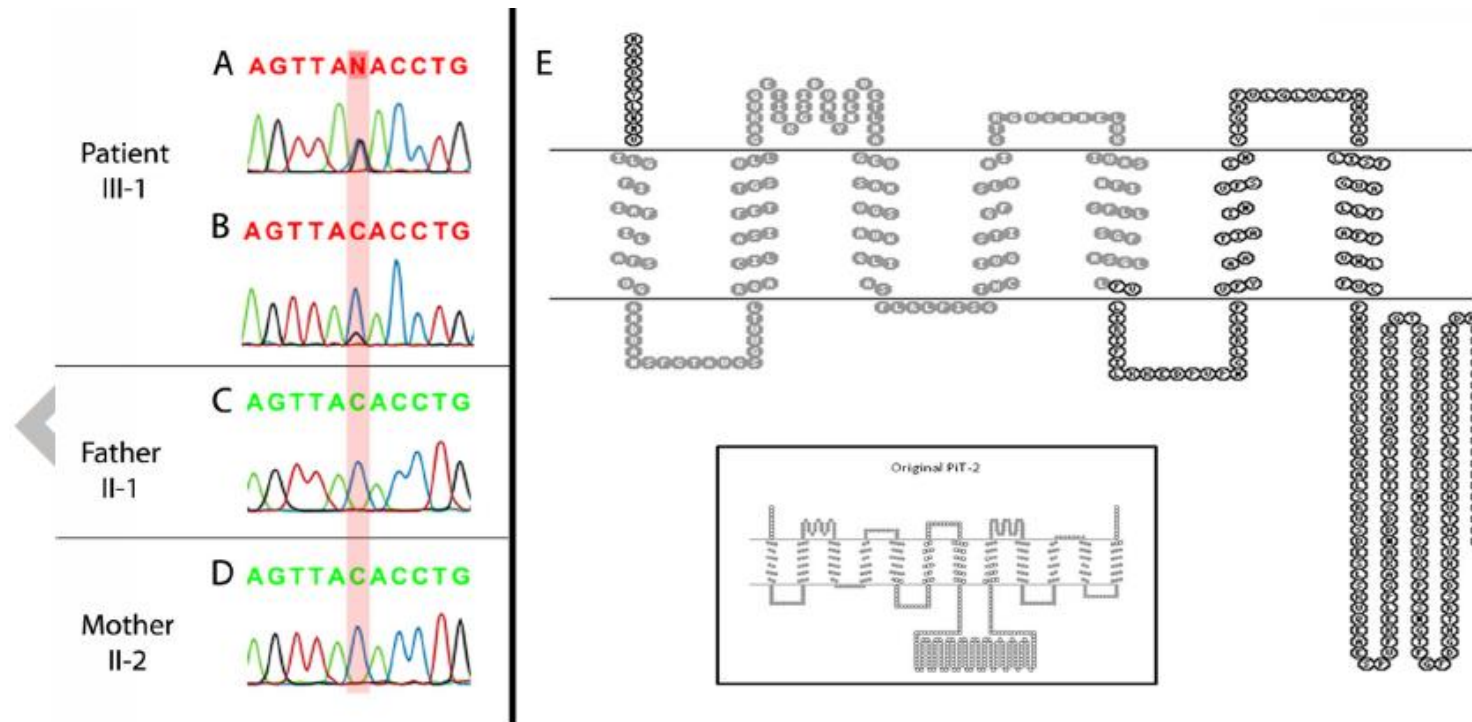


Fig. 2 – De novo mutation in SLC20A2 gene. **A, B** Electropherograms showing a SLC20A2 de novo mutation in the patient (NM_006749.4:c.1158C>G), both in genomic DNA (**A**) and cDNA (**B**). This variant is absent in parents (**C, D**). Schematic diagram of wild-type and mutant SLC20A2 proteins highlighting a shorter putative PiT-2 protein due to a stop codon at the 386 amino acid residue (NP_006740.1:p.Y386X) (**E**). Both models were generated by TOPO2 online software (<http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO2/>).

ANEXOS

PERSPECTIVAS

Regulação da expressão do gene *SLC20A2*

Posterior à identificação da desregulação do *SLC20A2*, buscou-se avaliar outros mecanismos que exerçam função na modulação da expressão deste gene. Análises *in silico*, predisseram uma sequência alvo no gene *SLC20A2* complementar à estrutura do microRNA 9 (miR9). Através da técnica qRT-PCR foi mensurado o nível da expressão do miR9 e do gene *SLC20A2* em dois pacientes com CCFP:

- 1A01BR = mutação missense (c.1483G>A p.Ala495Thr);
- 1H01BR = mutação nonsense (c.1158C>G p.Tyr386*).

A partir dos resultados preliminares, observou-se que a expressão do gene *SLC20A2* foi menor nos dois pacientes em relação ao grupo controle. Concomitantemente, a expressão do miR9 mostrou-se menor no paciente 1H01BR e maior no paciente 1A01BR, indivíduo cuja mutação apresenta consequências menos danosas à proteína PiT-2 em comparação à mutação nonsense, que conduz à sua perda da sua função (Figura 1).

Estes dados permitem conjecturar que a diminuição da expressão do gene alvo, *SLC20A2*, pode estar ocorrendo mediante a ação regulatória pós-transcricional do miR9.

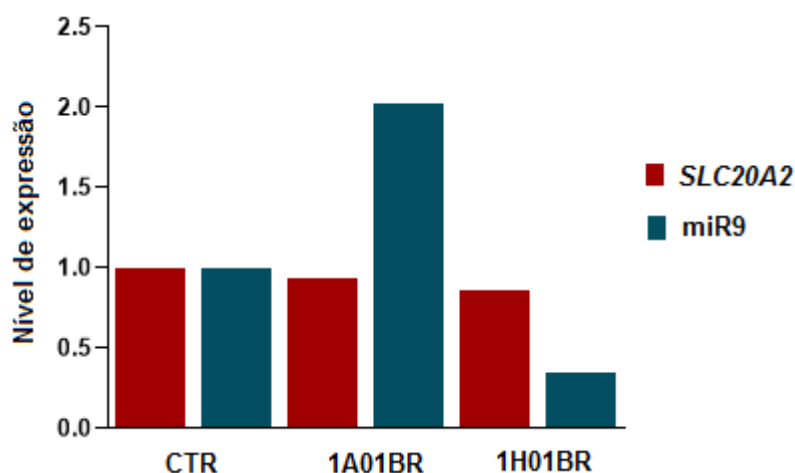


Figura 1 – Níveis da expressão gênica obtidos a partir de qRT-PCR referentes ao gene *SLC20A2* e ao microRNA 9 (miR9) em dois pacientes com CCFP.

ATIVIDADES COMPLEMENTARES

Resumo apresentado no V Simpósio Internacional em Diagnóstico e Terapêutica/ VIII Jornada Científica do LIKA

EVIDENCE OF RNA MEDIATED DECAY AND GENE SILENCING IN A MAJOR GENE (*SLC20A2*) LINKED TO BRAIN CALCIFICATIONS

Lylyan Fragoso Pimentel^{1,3}; Roberta Rodrigues de Lemos¹; Joana Braga de Moraes Ferreira^{1,3}; João Ricardo Mendes de Oliveira^{1,2}

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami/LIKA – UFPE.

²Departamento de Neuropsiquiatria/CCS - UFPE

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/CCB - UFPE

INTRODUCTION: Primary familial brain calcification (PFBC) is a neuropsychiatric disorder that presents heterogeneous symptoms such as migraine, parkinsonism, psychosis, dementia and mood swings. So far, three genes were linked to ~50% of the families: *SLC20A2*, *PDGFRβ* and *PDGFβ*. *SLC20A2* is responsible for most familial cases mapped and it encodes for an inorganic phosphate transporter. More than 40 mutations were found in families from various countries and three of them were found in Brazilian families. The study of RNA allow understanding and inferring the functional implications of various types of mutations. **OBJECTIVE:** To report two RNA regulatory mechanisms observed in PFBC patients with mutations in *SLC20A2* gene, a stop codon (c.1158C>G p.Tyr386) and a missense (c.1483G>A p.Ala495Thr). **METHODS:** RNA samples were extracted from blood white cells. Primers and probes were design to cover the *SLC20A2* exonic regions. Quantitative Real Time PCR was used to measure mRNA level amongst patients and controls and cDNA was sequenced with automatic Sanger sequencing to check RNA mediated decay, at the sample with a stop codon. Bioinformatics analyzes were made in order to screen microRNA binding sites demonstrating that the miR9 has better binding site in *SLC20A2*. Posteriorly, microRNA expression was measured. **RESULTS:** In the patient carrying a stop codon, the mRNA expression demonstrated a ~10% decrease relative to controls in *SLC20A2* expression as well as miR9 expression. At the same time, cDNA sequence reads suggest lower expression of the mutant allele, comparatively with the genomic DNA. The other patient showed a lower *SLC20A2* expression while microRNA expression was increased. **CONCLUSION:** The cDNA sequencing suggest an RNA mediated decay, typically found in stop codon carriers. The decreasing of *SLC20A2* expression in the other patient, compared to the high expression of miR9 may indicate that the *SLC20A2* gene is regulated by this microRNA.

Keywords: *SLC20A2*; gene expression; RNA-mediated decay; microRNA; miR9

Financial Support: Facepe; CNPq; CAPES

DESCRIPTIVE ANALYSIS OF THE GENE EXPRESSION PATTERN FOR SLC20A2 IN THE MOUSE BRAIN ATLAS FROM THE ALLEN INSTITUTE FOR BRAIN SCIENCE

Pimentel, LF¹; Oliveira, JRM^{1,2}

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami/LIKA – UFPE.

²Departamento de Neuropsiquiatria/CCS - UFPE

INTRODUCTION: The SLC20A2 gene encodes an inorganic phosphate transporter whose mutation has been reported in the pathology of Familial Idiopathic Brain Calcification (FIBC). FIBC is a rare genetic condition characterized by calcium phosphate deposition without a metabolic cause. Neuroimaging studies performed by the Allen Institute for Brain Science database (AIBS) on the pattern of expression of the SLC20A2 gene, demonstrate that despite the wide tissue distribution, levels of expression are particularly high in regions often affected by calcifications. However, there is no mouse model for this condition and the definition of a standard pattern of gene expression remains a matter of debate. **OBJECTIVES:** To describe a standard pattern of SLC20A2 gene expression throughout the mouse brain. **MATERIAL AND METHODS:** The mouse brain atlas from the AIBS merges data generated by various techniques, including microarrays, neuroimaging, in situ hybridization and neuroanatomy, all integrated into a 3D format allowing users access to information on a myriad of previously defined. An initial tabulation of this data was generated for the whole brain followed by assessment of specific brain regions. Subsequently, the results were visualized using the 3D modeling software, Brain Explorer, enabling a comparative evaluation in areas of greatest SLC20A2 expression. **RESULTS:** The spatial mapping data followed by expression analysis allowed us to define brain regions of significant neuroanatomical gene expression including the cerebellum, thalamus and isocortex. These results partially reproduced known expression patterns while also adding a new level of molecular and neuroanatomical resolution, in a non-biased approach. **CONCLUSIONS:** Preliminary analysis will assist in establishing a standard control, essential for elucidating the pathophysiological basis of FIBC. Furthermore, these findings serve as a significant resource for comparison with a SLC20A2 knock out mouse model, currently undergoing analysis by different groups working in collaboration with us.

Keywords: SLC20A2; Familial Idiopathic Brain Calcification; gene expression; Allen Institute for Brain Science

Financial Support: Facepe

Original Research Paper

Epidemiological genetics and meta-analysis of a polymorphism at codon 129 of the PRNP gene in Alzheimer's disease in Brazil

Lylyan Fragoso Pimentel¹, José Eriton Gomes da Cunha¹,
Renato Lírio Morelato², Flávia de Paula³, João Ricardo Mendes de Oliveira^{1,4}

¹Keizo Asami Laboratory (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, ²Hospital da Santa Casa da Misericórdia de Vitória, da Escola Superior de Ciências da Santa Casa da Misericórdia de Vitória, Brasil, ³Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil, ⁴Neuropsychiatry Department, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

The polymorphism at codon 129 of the prion protein gene (PRNP) is a major risk factor for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). Several authors reported neuropathological and clinical overlapping between CJD and Alzheimer's disease (AD), with a few association studies generating conflicting results. To investigate the distribution of this polymorphism in AD, we selected 58 patients with probable AD and 73 controls from a Brazilian population. There was no association between the PRNP polymorphism at codon 129 and AD. Our meta-analysis (performed using Alzgene; <http://www.alzgene.org>) along with previous studies conducted in Brazil demonstrated a negative association.

Keywords: Alzheimer's disease, Creutzfeldt-Jakob disease, E200K mutation, M129V polymorphism, PRNP

Introduction

The most common form of dementia is Alzheimer's disease (AD), which corresponds to about 60% of all cases.¹ The early form of AD (early-onset AD, EOAD) is associated with autosomal dominant mutations in three major genes: the genes that encode APP; presenilin 1 and 2 (PSEN1 and PSEN2).^{2,3} Separately, several studies have linked the $\epsilon 4$ allele of apolipoprotein E (ApoE) as a risk factor for late-onset AD (LOAD).^{2,4}

Prion diseases comprise a set of invariably fatal nosological entities, which can affect animals and humans and can be sporadic, genetic or acquired. Prion diseases occur as a result of extracellular accumulation of the prion *scrapie* (PrP^{Sc}) in nervous tissue and the development of lesions with a spongiform appearance.^{5,6}

In humans, the most common prion disease is Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) with worldwide incidence ranging from one to two cases per million inhabitants/year.⁷ In genetic form (gCJD), variations in the prion protein gene (PRNP) are associated with risk, for example, the M129V polymorphism (substitution of a methionine for a valine at codon 129)

and E200K mutation (exchange of lysine for glutamate at codon 200) are most frequently observed.⁸

The polymorphism at codon 129 (M129V) can modulate the incubation time and clinical course of disease. The allelic frequency in healthy individuals varies among different human populations and may be 0.653 and 0.958 in a British and Japanese population respectively for the M allele.⁹ Previous studies have reported that codon 129 modulates the biophysical properties of the PrP^C protein, as well as the susceptibility, clinical phenotype, and pathology of prion disease.^{7,10} Furthermore, the homozygous genotype MM codon 129 was related with the increase of the risk of alpha-helix protein formation (relative to VV and MV) and thereby protein aggregation.¹¹

CJD and AD share neuropathological features such as deposition of protein aggregates in similar brain regions and amyloidosis. Thus, some authors believe a common underlying genetic cause pervades for both AD and CJD.¹² With the objective of evaluating a possible association between AD and the M129V polymorphism, we analyzed samples from patients from a Brazilian population.

Additionally, we developed a meta-analysis based on the database Alzgene (<http://www.alzgene.org>) in order to investigate the distribution of the M129V polymorphism in different ethnic groups for comparison with our results.

Correspondence to: J. R. M. de Oliveira, Keizo Asami Laboratory (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Av. Prof. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, CEP 50670-901, Brazil. Email: joao.ricardo@ufpe.br

CONCLUSÕES GERAIS

- As pequenas diferenças observadas na análise da expressão do gene *SLC20A2* entre os grupos estudados, poderia ser explicada pela ação compensatória do alelo selvagem;
- Paralelamente, os resultados do sequenciamento do cDNA sugerindo a baixa expressão do alelo mutante comparativamente ao DNA genômico, indicam que está havendo o decaimento do mRNA mediado pela presença da mutação nonsense (mecanismo conhecido como *Nonsense-mediated Decay* ou *RNA-mediated Decay*)
- O estudo aprofundado dos genes e das mutações associadas às CCFP permitirá a identificação das suas bases genéticas além de fornecer maiores esclarecimentos acerca dos diferentes caminhos que levam à formação das calcificações cerebrais anormais.