

MARC-ANDRÉ RODRIGUE

**GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE DES GLAUCOMES À ANGLE OUVERT : ÉTUDES  
STRUCTURE/FONCTION DE LA PROTÉINE ENCODÉE PAR LE GÈNE  
*TIGR/MYOC***

Mémoire présenté

À la Faculté des études supérieures

De l'Université Laval

Pour l'obtention

du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

Biologie cellulaire et moléculaire

FACULTÉ DE MÉDECINE

UNIVERSITÉ LAVAL

QUÉBEC

JUILLET 2000



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-53979-2

## RÉSUMÉ

Le gène *Trabecular meshwork-Inducible Glucocorticoid Response protein (TIGR)*, ou *myociline (MYOC)*, cartographié au locus *GLC1A* sur le chromosome 1q23-q25 a récemment été associé au glaucome primaire à angle ouvert (GPAO). La fonction de *TIGR/MYOC* reste toutefois inconnue.

La découverte d'homozygotes pour la mutation K423E non atteints par le GPAO soulève un nouveau modèle d'interférence allélique unique chez l'humain qui repose sur la formation d'hétérodimères non fonctionnels entre des polypeptides *TIGR/MYOC* sauvages et mutés. Pour vérifier ce modèle, nous avons cloné l'ADNc de *TIGR* sauvage et celui muté dans des vecteurs d'expression eucaryotiques et transfecté des cellules COS-7 de façon transitoire. Nous avons aussi procédé à des digestions glycosidiques. Les protéines générées furent détectées par immunoprécipitation et immunobuvardage.

Nos résultats démontrent que la protéine *TIGR/MYOC* est N-glycosylée et forme des dimères via un motif de glissière de leucines. Les polypeptides *TIGR/MYOC* forment des hétérodimères WT/K423E, supportant ainsi le modèle de complémentation homoallélique.

À mes parents

Robert et Pâquerette

## AVANT-PROPOS

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Vincent Raymond pour la confiance qu'il m'a témoigné en m'accueillant au sein de son équipe. L'enthousiasme du Dr Raymond m'a permis d'aller sans cesse de l'avant et de ne jamais abandonner devant les difficultés. Je lui suis également redevable de m'avoir laissé prendre des décisions tout au long de mon projet. Somme faite, il a été pour moi un excellent directeur. J'aimerais dire merci à Jean Morissette, co-directeur du projet glaucome, qui a apporté sa critique scientifique à mon projet.

De façon plus générale, je voudrais remercier les assistants de recherche, Stéphane et Annie, qui m'ont fait découvrir les techniques de la biologie moléculaire et permis d'acquérir une méthode de travail. Il ne faut pas oublier les autres membres de l'équipe dont Isabelle, Stéphane, Mathieu, Nancy et Steve, sans qui la vie d'étudiant n'aurait pas été aussi agréable.

Finalement, une pensée pour mes parents qui m'ont écouté et encouragé au cours de mes études. Je leur suis très reconnaissant de m'avoir donné le meilleur d'eux-mêmes. Merci à ma copine Julie avec qui j'ai partagé mes craintes et mes joies.

## **TABLE DES MATIÈRES**

<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>I</b>
<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>II</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>III</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES.....</b>	<b>V</b>
<b>LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....</b>	<b>VII</b>
<b>CHAPITRE I INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1.1. LE GLAUCOME.....	1
1.1.1. Pathologie.....	1
1.1.2. Classification .....	2
1.1.3. Épidémiologie .....	5
1.1.4. Anatomie et fonction de l'œil .....	8
1.1.5. Dégénérescence du nerf optique.....	12
1.2. GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE DU GLAUCOME À ANGLE OUVERT .....	15
1.2.1. Le gène <i>TIGR/MYOC</i> .....	15
1.2.2. Histoire dans une famille canadienne-française nombreuse .....	22

1.2.3. Étude de la structure protéique TIGR .....	24
1.3. BUT ET INTÉRÊT DU PROJET DE RECHERCHE .....	30
<b>CHAPITRE II STRUCTURAL EVIDENCE FOR METABOLIC INTERFERENCE TO ACCOUNT FOR AUTOSOMAL DOMINANT HETEROZYGOTE-SPECIFIC INHERITANCE OF GLAUCOMA.....</b>	<b>33</b>
2.1. RÉSUMÉ .....	36
2.2. INTRODUCTION .....	39
2.3. RESULTS AND DISCUSSION .....	42
2.4. METHODS .....	55
2.5. REFERENCES .....	59
<b>CHAPITRE III CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>64</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>68</b>
<b>ANNEXE A :SÉQUENCE CODANTE DE <i>TIGR/MYOC</i> .....</b>	<b>77</b>

## LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

### Chapitre I

Figure 1 : Classification des glaucomes.....	4
Figure 2 : Coupe transversale de l'œil. ....	10
Figure 3 : Synthèse et circulation de l'humeur aqueuse au niveau de la chambre antérieure de l'œil.....	11
Figure 4 : Coupe transversale de l'équilibre des pressions.....	14
Figure 5 : Gène <i>TIGR/MYOC</i> .....	18
Figure 6 : Pedigree du branchon GV510 de la famille GV-001 porteuse de la mutation K423E. ....	23
Figure 7 : Structure de la protéine <i>TIGR/MYOC</i> .....	27
Tableau 1 : Classification génétique des glaucomes selon la nomenclature HUGO....	7
Tableau 2 : Principales mutations associées au glaucome primaire à angle ouvert dans le gène <i>TIGR/MYOC</i> .....	21
Chapitre II	
Figure 1 : Antibody detection of <i>TIGR</i> gene product .....	49



Figure 2 : Western blot analysis of post-translational glycosylation of TIGR/MYOC isoform in COS-7 cells .....	50
Figure 3 :TIGR/MYOC dimerization and oligomerization in COS-7 cells and in a reticulocyte lysate system .....	51
Figure 4 :TIGR <sup>wt</sup> formed alone or in combination with TIGR <sup>K423E</sup> oligomer .....	52

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

a.a.	acide aminé
ADNc.	acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	acide ribonucléique
CMV	cytomégalovirus
Cys	cystéine
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
dNTP	triphosphate deoxyribonucléotide
DTT	dithiotreitol
E	acide glutamique
Hg	mercure
GAO	glaucome à angle ouvert
GCAO	glaucome chronique à angle ouvert
GJAO	glaucome juvénile à angle ouvert
GPAO	glaucome primaire à angle ouvert
GRE	Élément de réponse aux glucocorticoïdes

HTM .....	cellule trabéculaire humaine
K.....	lysine
kB.....	kilobases
kDa.....	kiloDalton
L.....	leucine
LC .....	lamina cribora
Met.....	methionine
MW.....	poids moléculaire
MYOC .....	myociline
PCR .....	réaction de polymérase en chaîne
Q.....	acide glutamique
SDS.....	sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE .....	SDS polyacrylamide électrophorèse
SV-40.....	simian virus 40
TIGR .....	Trabecular meshwork-Induced Glucocorticoid Response protein
ug.....	microgramme
X .....	codon stop

## CHAPITRE I INTRODUCTION

### 1.1. Le glaucome

Le glaucome, y compris toutes ses différentes pathologies, est la seconde cause de cécité au Canada. Le développement de cette pathologie est insidieuse et est dû à une dégénérescence de nerf optique généralement accompagnée d'une pression intraoculaire élevée. En 1968, le Dr Gilles Côté et ses collaborateurs ont publié une étude de ségrégation sur le glaucome primaire à angle ouvert (Cote et al., 1968). Cette famille canadienne-française nombreuse qui compte plus de 600 individus vivants, à laquelle un effet fondateur est associé depuis 1799, a été le départ de notre projet. Cette famille associée au locus *GLC1A*, nous a permis d'identifier une nouvelle mutation dans le gène *TIGR/MYOC*, la K423E. Cette mutation est responsable d'un type de GPAO spécifique à l'hétérozygote (Morissette et al., 1998).

#### 1.1.1. Pathologie

Le glaucome est une maladie complexe de l'œil caractérisée par la dégénérescence du nerf optique et généralement accompagnée d'une pression intraoculaire élevée, soit supérieure à 21 mm Hg. Insidieuse et indolore, lorsqu'elle n'est pas diagnostiquée de façon hâtive, la maladie engendre des dommages permanents aux axones du nerf optique. Cela entraîne une excavation et une atrophie de la papille optique ainsi qu'une perte progressive des champs visuels. Laissé sans traitement sur une longue période, le glaucome mène souvent à une cécité complète. Bien qu'il existe de plus en plus de médicaments qui visent à réduire la production d'humeur aqueuse au niveau du corps ciliaire, de nombreuses interventions chirurgicales sont

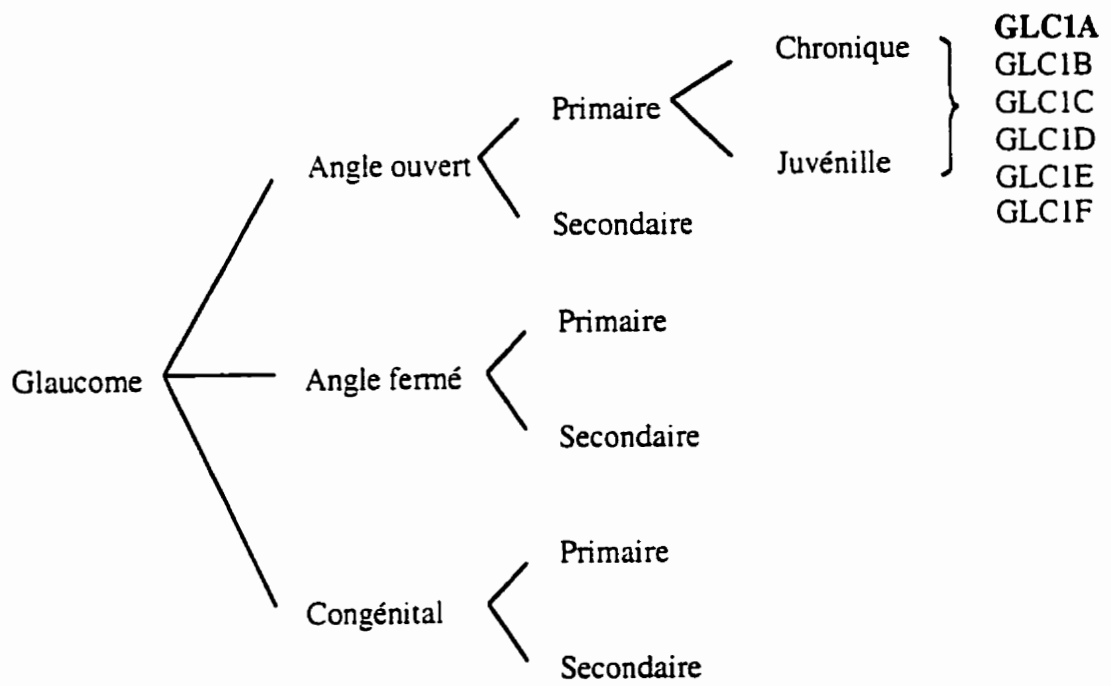
encore pratiquées (Craig and Mackey, 1999). De plus, ces familles atteintes de glaucome doivent être continuellement suivies en ophtalmologie puisque la maladie est à caractère insidieux.

### 1.1.2. Classification

Puisque le glaucome est une maladie héréditaire complexe, une classification des différents types que l'on retrouve a été faite. Cette maladie est classée en trois catégories : le glaucome à angle ouvert, angle fermé et congénital. Chaque catégorie a été subdivisée en *primaire* lorsqu'il n'y a aucune anomalie de la chambre antérieure et aucune cause connue pour la maladie et *secondaire* lorsqu'il y a une condition oculaire ou systémique sous-jacente (Shields et al., 1996). La distinction entre angle ouvert ou fermé réfère à l'angle de la jonction irido-cornéenne de la chambre antérieure, c'est-à-dire l'angle entre l'iris et la cornée. Le glaucome congénital survient généralement avant l'âge de trois ans et surtout avant l'âge de cinq ans (Danyluk and Paton, 1992) (Figure 1). Pour ce dernier groupe, il s'agit d'une malformation au niveau de l'angle irido-cornéen causée par une différenciation anormale des tissus embryonnaires de l'œil (Shields et al., 1996).

Avec l'avancement de la biologie moléculaire, la Human Genome Organisation (HUGO) a adopté le symbole *GLC* pour représenter le glaucome suivi des chiffres 1, 2 et 3 qui représentent respectivement l'angle ouvert, l'angle fermé et congénital. Afin

de définir les différents loci identifiés, les lettres de l'alphabet A,B,C... représentent l'ordre dans lequel les loci ont été découverts (Tableau 1).



**Figure 1 : Classification des glaucomes**

### 1.1.3. Épidémiologie

L'organisation mondiale de la santé a estimé, en 1992, à 5,2 millions le nombre de personnes dont la cécité était attribuable au glaucome (Thylefors, 1994 #41). Une seconde estimation pour l'an 2000 a été faite portant à 67 millions le nombre de personnes atteintes de glaucome comprenant 6,7 millions de cas de cécité bilatérale (Quigley, 1996 #82). Ceci place le glaucome comme étant la troisième cause de cécité à travers le monde avec une incidence de 2,4 millions de nouveaux cas par année (Wilson and Martone, 1996). Au Canada, la *Canadian National Institute for Blindness* classe le glaucome comme étant la seconde cause de cécité chez les personnes âgées de plus de 50 ans, pour un total de 8,3 % des cas de cécité enregistrés en 1990 (CNIB, 1990). Phénomène intéressant, au moins 50 % des gens qui souffrent de glaucome l'ignorent.

Le type de glaucome rencontré le plus fréquemment dans la population est le glaucome à angle ouvert (GAO). Il représente plus de 50 % des cas enregistrés (Shields et al., 1996). Chez les Caucasiens, cette forme affecte environ 2 % de la population âgée de plus de 45 ans (Wilson and Martone, 1996). La prévalence du GAO varie en fonction de l'âge mais aussi de l'ethnie. Chez les Afro-Américains, la prévalence est de trois à quatre fois plus élevée que chez les Américains d'origine caucasienne (Raymond, 1997). Selon l'âge d'apparition des symptômes, ce groupe se subdivise en deux sous-groupes soit, le glaucome à angle ouvert chronique et le glaucome à angle ouvert juvénile. Le terme chronique est utilisé pour définir les glaucomes qui surviennent après l'âge de 35 ans alors que le type juvénile est



diagnostiqué chez les enfants et les jeunes (Johnson et al., 1996a). En 1995, Morissette *et al*, observent par étude d'haplotype que les types juvénile et chronique sont associés au même gène sur le chromosome 1 au locus 1q21-q31 (Morissette et al., 1995).

## Tableau 1 : Classification génétique des glaucomes selon la nomenclature HUGO.

D'après Craig, 1999 (Craig and Mackey, 1999)

Classification des glaucomes	Locus	Location chromosomique	Mode de ségrégation	Gène délétère
<b>Glaucome primaire à angle ouvert</b>				
GJAO et GPOA (adulte)	<i>GLC1A</i>	1 q24.3-q25.2	AD	<i>MYOC/TIGR</i>
GPAO (adulte)	<i>GLC1B</i>	2cen-q13	AD	non identifié
GPAO (adulte)	<i>GLC1C</i>	3q21-q24	AD	non identifié
GPAO (intermédiaire)	<i>GLC1D</i>	8q23	AD	non identifié
GPAO (adulte à basse pression)	<i>GLC1E</i>	10p15-p14	AD	non identifié
GPAO	<i>GLC1F</i>	7q35-36	AD	non identifié
<b>Glaucome congénital</b>				
	<i>GLC3B</i>	2p21	AR	<i>CYP1B1</i>
	<i>GLC3A</i>	1p36	AR	non identifié

AD-autosomale dominant; AR-autosomale récessif; GJAO-glaucome juvénile à angle ouvert;

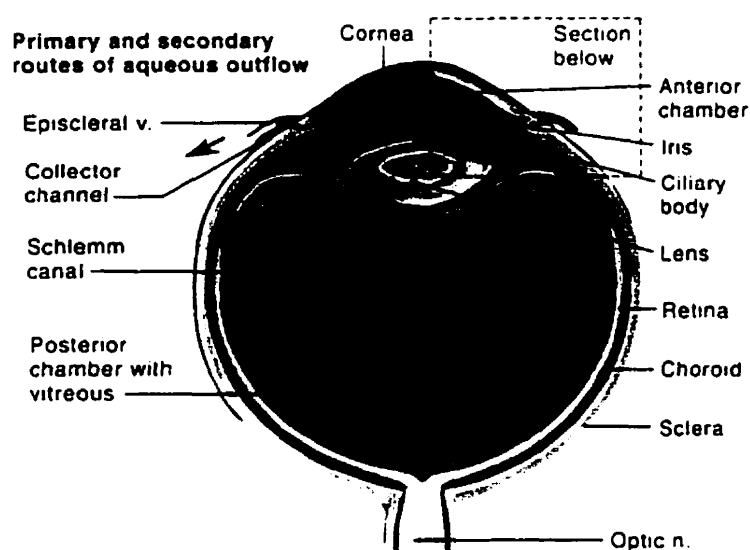
GPAO-glaucome primaire à angle ouvert

#### 1.1.4. Anatomie et fonction de l'œil

L'œil humain est une sphère composée d'une membrane externe blanche : la sclérotique et d'une partie circulaire translucide : la cornée. La cornée doit être hydratée afin de bien polariser la lumière (Danyluk and Paton, 1992). En coupe transversale, l'œil se divise en deux chambres séparées l'une de l'autre par le cristallin et l'iris. La partie postérieure de l'œil contient environ 4 ml d'un liquide dénommé l'humeur vitrée composée à 90 % d'eau, d'acide hyaluronique et de mucopolysaccharide. La chambre antérieure contient environ 0,2 mL d'humeur aqueuse dépourvue de protéine (Kaufman and Mittag, 1994) (Figure 2). Son rôle est de nourrir la cornée, le cristallin et les tissus irido-cornéens, car ces tissus ont une importante activité physiologique bien qu'ils ne sont pas vascularisés. L'humeur aqueuse doit donc être continuellement renouvelée.

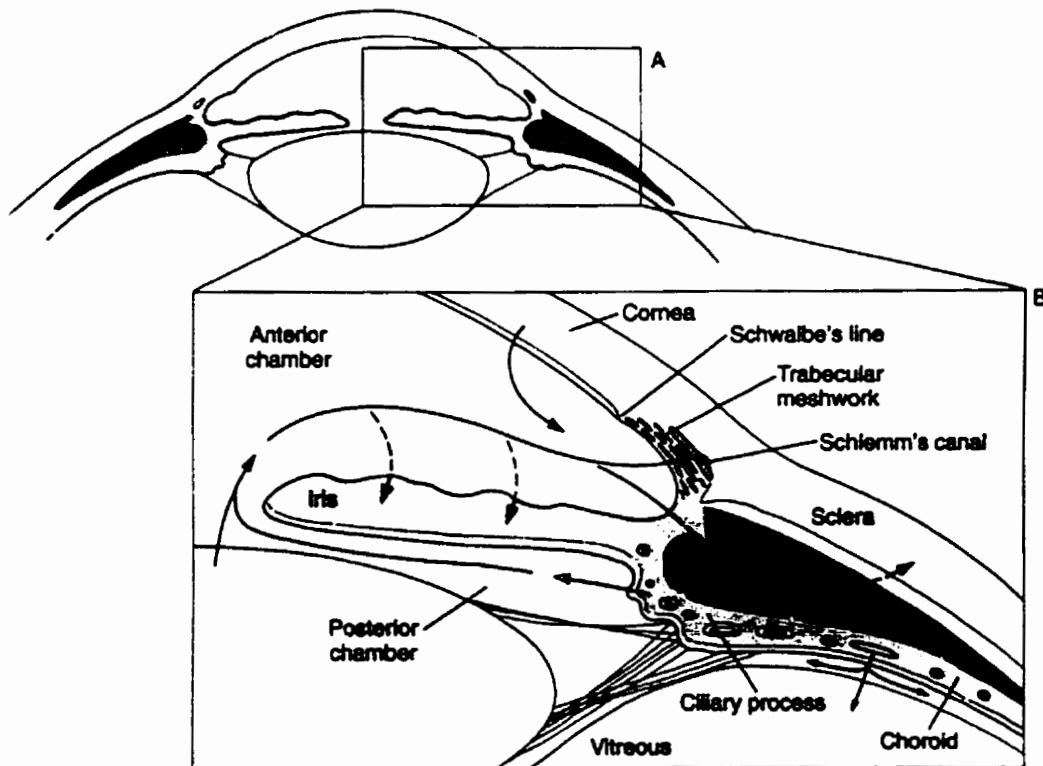
L'humeur aqueuse est produite au niveau du corps ciliaire qui est situé dans la partie latérale de la chambre postérieure. Le corps ciliaire est composé de muscles et de tissus endothéliaux hautement vascularisés. L'humeur est produite par un mécanisme de diffusion passive, de transport actif et d'osmose. Sa composition est hypertonique, c'est-à-dire plus concentrée en sel, légèrement acide avec une grande concentration en acide ascorbique (Kaufman and Mittag, 1994). L'humeur gagne la chambre antérieure via l'ouverture de l'iris pour être réabsorbée au niveau du trabéculum où elle sera filtrée avant d'être retournée dans la circulation sanguine via le canal de Schlemm (Figure 3). Chez le singe environ 30 à 50 % de l'humeur aqueuse est récupérée au niveau uvéo-sclérotique lorsque les muscles ciliaires sont

au repos. Ce type de réabsorption est toutefois moins important chez l'humain (Vogel et al., 1990). La réabsorption de l'humeur au niveau trabéculaire est sensible à la pression intraoculaire, ce qui permet de maintenir une pression stable de 15-16 mm Hg avec seulement 1-2 mm Hg de fluctuation (Kaufman and Mittag, 1994). Le flot de l'humeur vers la partie antérieure de l'œil résulte d'une circulation thermique. L'humeur aqueuse produite dans la chambre postérieure, où la température est légèrement plus élevée, est drainée par convection thermique à la chambre antérieure de l'œil. Cette dynamique de l'humeur permet de nourrir les tissus oculaires et de maintenir une pression intraoculaire qui maintient la forme de l'œil et prévient les déformations lors du mouvement (Kaufman and Mittag, 1994).



**Figure 2 : Coupe transversale de l'œil.**

Physiologie et identification des principales structures de l'œil mettant en évidence la chambre antérieure et postérieure. D'après Danyluk, 1992 (Danyluk and Paton, 1992).



**Figure 3 : Synthèse et circulation de l'humeur aqueuse au niveau de la chambre antérieure de l'œil.**

L'humeur est produite au niveau du corps ciliaire dans la chambre postérieure de l'œil. Elle gagne ensuite la chambre antérieure de l'œil par l'ouverture au niveau de l'iris. Une infime partie est absorbée par l'iris et la cornée, alors que le reste est réabsorbé par le canal de Schlemm. Avant de gagner le canal de Schlemm, l'humeur est filtrée au niveau du réseau trabéculaire. D'après Kaufman, 1994 (Kaufman and Mittag, 1994).

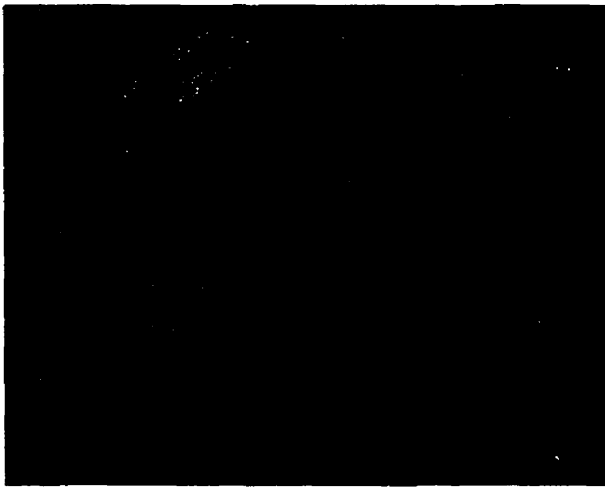
### 1.1.5. Dégénérescence du nerf optique

Chez les glaucomateux, plus particulièrement ceux souffrant de GAO, la pression intraoculaire est plus élevée que chez l'ensemble de la population (Polansky and Nguyen, 1998). La pression intraoculaire normale de l'œil se situe entre 10-20 mm Hg (Danyluk and Paton, 1992). Cette augmentation de la pression est un facteur de risque au glaucome. Cependant dans certains cas, des gens développent un glaucome à pression normale ou souffrent de pression intraoculaire élevée ( $\geq 21$  mm Hg) (PIO) sans développer de glaucome (Anderson, 1995). Pour les glaucomes à angle fermé, l'élévation de la pression résulte du défaut de réabsorption de l'humeur aqueuse produite puisque cette dernière ne peut pas gagner le réseau trabéculaire puisque l'iris bloque le trabeculum. Dans le cas des glaucomes à angle ouvert, c'est la réabsorption au niveau du trabéculum qui fait défaut. Ce dernier s'obstrue avec le temps et offre ainsi une plus grande résistance lors de la filtration, ce qui engendre une pression plus élevée (Kaufman and Mittag, 1994)(Figure 4).

Comme certains cas de glaucomes sont plus ou moins associés à une augmentation de la pression intraoculaire, quelques théories ont été proposées pour expliquer sa dégénérescence. Le nerf optique passe par le canal scléral qui est partiellement rempli d'un tissu collagèneux appelé la lamina cribosa (LC). Ce tissu est composé d'une dizaine de couches contenant environ 150-200 pores par couche (Flanagan, 1998). Dans la théorie mécanique, la pression élevée déformerait ce tissu écrasant ainsi le nerf optique (Quigley et al., 1983). La seconde théorie veut que la pression modifie le niveau de vascularisation de la LC et du nerf optique, ce qui provoquerait la

mort des cellules nerveuses (Flanagan, 1998). La dernière théorie proposée est l'excitotoxicité par le glutamate au niveau de la rétine interne. Cette théorie est supportée par des études de toxicité des ganglions réiniens en culture (Osborne et al., 1999a; Osborne et al., 1999b). En combinant ces différentes études faites sur la dégénérescence du nerf optique et celle sur le contrôle de la pression intraoculaire, la nature pathologique du glaucome commence à mieux être comprise.





**Figure 4 : Coupe transversale de l'équilibre des pressions.**

Flux de l'humeur aqueuse, en vert, au niveau de la chambre antérieure. En bleu, l'équilibre des pressions intraoculaires de l'œil. Lors de l'obstruction du flux, la papille du nerf optique est compressée et il y a atrophie des cellules nerveuses. D'après Trope, 1997 (Trope, 1997).

## 1.2. Génétique moléculaire du Glaucome à angle ouvert

### 1.2.1. Le gène *TIGR/MYOC*

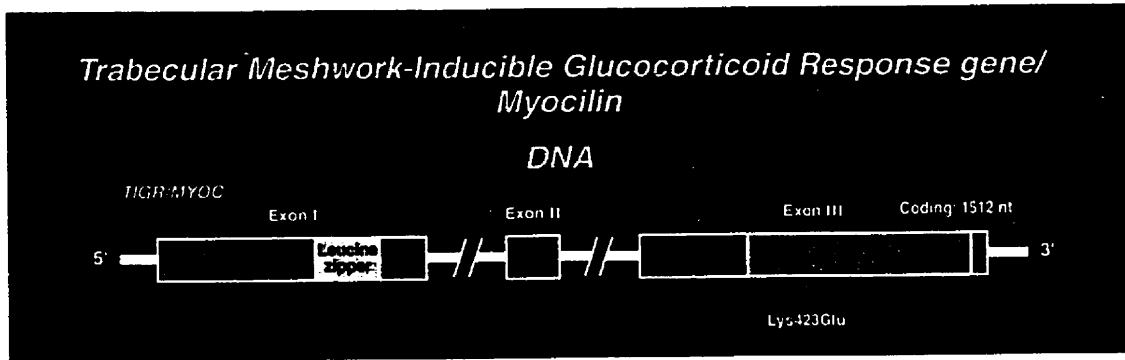
Le premier chercheur à observer que le glaucome était une maladie qui survenait de génération en génération fut Benedict en 1842. Sans le savoir, il stimula un grand champ d'étude de la fin du XX<sup>e</sup> siècle (Leske, 1983). C'est en 1993 que le locus *GLC1A* a été cartographié au chromosome 1q21q31 par l'analyse génétique de nombreuses familles atteintes de GJAO (Sheffield et al., 1993). Par la suite, quelques équipes sont venues confirmer ce locus par l'ajout d'une dizaine de familles et, par le fait même, confiné le locus à 1q21-q25 (Johnson et al., 1996b; Meyer et al., 1996; Morissette et al., 1995; Sunden et al., 1996). En 1995, l'étude d'une grande famille canadienne-française confirma que le locus *GLC1A* était responsable de la forme juvénile et chronique de glaucome primaire à angle ouvert (Morissette et al., 1995). Le gène *TIGR* (Trabecular meswork Inducible Glucorticoid Response gene) a été cloné en 1997 par l'équipe de Sheffield après quelques années de recherche (Stone et al., 1997).

Parallèlement en 1993, une équipe de San Francisco travaillait avec des cellules de trabéculum en culture afin de déterminer les protéines induites par les glucocorticoïdes. Chez les glaucomateux, le taux de glucocorticoïde est plus élevé, ce qui induit environ 4 à 5 % des gènes des cellules du trabéculum (Wordinger and Clark, 1999). Cette équipe démontra qu'une glycoprotéine de 66 kDa, le produit du gène *TIGR*, était induite lors du traitement de cellules trabéculaires en culture

(Polansky et al., 1989). Ainsi, le gène *TIGR* rapporté par l'équipe de Sheffield par localisation génétique et la protéine induite par les glucocorticoïdes proposée par Nguyen s'avère être un des gènes impliqués dans le GPAO (Polansky et al., 1997; Stone et al., 1997). Une autre équipe, de façon indépendante clona le gène *MYOC*, pour son homologie à la myosine, dans le cilium des cellules photoréceptrices de l'œil, sans toutefois l'associer au glaucome (Kubota et al., 1997).

Le gène *TIGR/MYOC* humain est composé de trois exons et d'une région promotrice de 5 KB (Figure 5). Les extrémités introns-exons respectent la règle d'épissage GT/AG (Kubota et al., 1998) et un seul transcrit est détecté par analyse de type Northern. Son cadre de lecture ouvert a 1512 acides nucléiques et code pour une protéine de 504 acides aminés. L'ARN<sub>m</sub> de 2,3 kB est exprimé fortement dans plusieurs tissus dont le trabéculum, le corps ciliaire, l'iris, le cœur, les muscles squelettiques (Ortego et al., 1997) et le cerveau (Swiderski et al., 1999). Chez la souris, l'expression du gène a été associée à des régions spécialisées du cerveau dont, en particulier, la barrière hémato-encéphalique située dans les troisième et quatrième ventricules. Ce tissu composé de cellules épendymales est spécialisé dans la synthèse et la réabsorption des liquides cérébro-spinaux et a une importante production d'ARNm *TIGR/MYOC*. Ce tissu ressemble au corps ciliaire et au réseau trabéculaire où l'humeur aqueuse est synthétisée et réabsorbée (Swiderski et al., 1999). *TIGR/MYOC* est retrouvé également à des niveaux d'expression plus faible ou indétectable dans la cornée, le cristallin, l'épithélium rétinien pigmenté et dans la rétine (Ortego et al., 1997). Comme le gène est exprimé dans plusieurs types de

tissus oculaires et non-oculaires, il joue probablement un rôle biologique plus général dont les mutations jusqu'ici rapportées n'affectent que l'œil en particulier.



**Figure 5 : Gène *TIGR/MYOC*.**

La région promotrice de *TIGR/MYOC* possède une boîte CAT et une séquence consensus TATA en position -103 à -99 en amont du triplet d'initiation à la traduction. Lorsque l'on compare l'ADN<sub>c</sub> à l'ADN génomique, il existe une homologie jusqu'à -43 en amont du codon d'initiation. Ceci implique que la transcription du gène débute entre la position -103 à -43 (Kubota et al., 1998). Cette région promotrice contient également 13 éléments de réponse aux hormones dont sept GREs qui sont des éléments de réponse aux glucocorticoïdes (Nguyen et al., 1998). Un élément de réponse aux glucocorticoïdes est un consensus de six paires de bases inversées et séparées par trois paires de bases quelconques. La séquence parfaite est : 5'AGAACA(N)<sub>3</sub> TGTTCT3' (Lodish and Darnell, 1995). Ces différents éléments GREs pourraient expliquer la spécificité d'expression tissulaire du gène *TIGR/MYOC* (Diamond et al., 1990). Des études sur des glaucomateux non apparentés supportent également l'importance de la régulation du promoteur puisqu'il existe des variations de séquences dans la région promotrice du gène (Nguyen et al., 1998). Dans la partie 3' non codante, trois sites de polyadénylation sont présents aux positions 1714, 1864 et 2006 du cadre de lecture ouvert (Fingert et al., 1998).

Les études réalisées sur les familles liées au locus *GLC1A* ont permis d'associer une trentaine de mutations responsables des différentes pathologies familiales observées (Tableau 2). Il ressort de ces études que la majorité des mutations observées sont situées dans le troisième exon du gène. Cet exon a une homologie de séquence de 77,7% avec l'olfactoméline, une protéine extracellulaire retrouvée dans l'épithélium olfactif (Snyder et al., 1991). Ces observations suggèrent l'importance de la

conservation des acides aminés dans cette région afin de maintenir la fonction de la protéine au niveau du trabéculum. De toutes ces mutations observées, seulement deux se trouvent dans le premier exon, la Gln19His et la Arg82Cys (Alward et al., 1998). Cet exon a une homologie de séquence de 77,6% avec la chaîne lourde de la myosine de *Dictyostelium discoideum*. La forte concentration de mutations associées à l'exon trois suggère une liaison importante de celui-ci dans le mécanisme pathologique du glaucome. Comme la fonction de l'olfactoméline est encore inconnue à ce jour, elle ne fournit pas d'information pertinente pour l'étude de la protéine TIGR/MYOC. Cependant, vu la forte concentration de mutations localisées dans ce domaine d'homologie, l'étude du rôle biologique de l'olfactoméline aidera sûrement à comprendre la fonction de TIGR/MYOC.

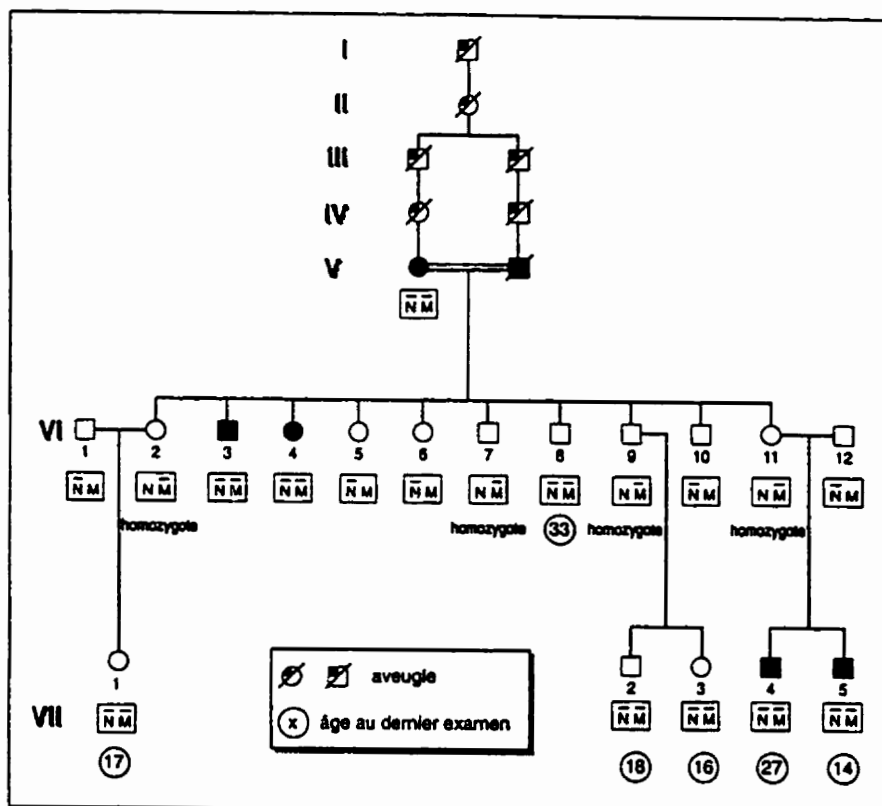
**Tableau 2 : Principales mutations associées au glaucome primaire à angle ouvert dans le gène *TIGR/MYOC*.**

Mutation	Référence	Mutation	Référence
Gln19His	(Alward et al., 1998)	Asp380Ala	(Stoilova et al., 1998)
Arg82Cys	(Alward et al., 1998)	Ins396	(Alward et al., 1998)
Gly246Arg	(Adam et al., 1997)	Lys398Arg	(Stoilova et al., 1998)
Gly252Arg	(Suzuki et al., 1997)	Arg422His	(Alward et al., 1998)
Trp286Arg	(Alward et al., 1998)	Lys423Glu	(Morissette et al., 1998)
Thr293Lys	(Alward et al., 1998)	Val426Phe	(Mansergh et al., 1998)
Gln337Arg	(Stoilova et al., 1997)	Tyr437His	(Alward et al., 1998)
Pro361Ser	(Alward et al., 1998)	Ala445Val	(Alward et al., 1998)
Gly364Val	(Alward et al., 1998)	Arg470Cys	(Alward et al., 1998)
Gly367Arg	(Suzuki et al., 1997)	Ile477Ser	(Adam et al., 1997)
Gln368X	(Alward et al., 1998)	Asn480Lys	(Adam et al., 1997)
Pro370Leu	(Adam et al., 1997)	Ile499Phe	(Adam et al., 1997)
Thr377Met	(Alward et al., 1998)	Lys500Arg	(Alward et al., 1998)
Asp380Gly	(Alward et al., 1998)	Ser502Pro	(Adam et al., 1997)



### 1.2.2. Histoire dans une famille canadienne-française nombreuse

L'étude dans une famille canadienne-française nombreuse, la famille GV-001, a permis en 1995 à l'équipe de Morissette, Raymond et le groupe Réseau Glaucome Québec de faire un lien entre GCAO et le GJAO au locus *GLC1A* (Morissette et al., 1995). Peu après l'identification du gène *TIGR/MYOC* par l'équipe de Sheffield *et al.* en 1997, cette famille regroupant plus de 600 individus ayant un fondateur malade, permit d'identifier des individus homozygotes pour une nouvelle mutation (Morissette et al., 1998). Dans cette famille, l'acide aminé lysine 423 était substitué pour un acide glutamique (K423E) et la maladie ségrègue de façon autosomale dominante. L'étude détaillée du pedigree a permis d'identifier plus d'une dizaine de mariages consanguins, dont un entre des cousins du second degré porteur de la mutation K423E (Figure 6). Selon la génétique mendélienne, environ 75% de la fratrie aurait dû être atteinte de glaucome puisqu'il s'agit d'une forme autosomique dominante. Sur l'ensemble des dix frères et sœurs, seulement deux souffraient toutefois de glaucome. L'analyse génétique a permis d'identifier quatre homozygotes porteurs de la mutation qui étaient asymptomatiques, bien qu'âgés de plus de 40 ans (Morissette et al., 1998).



**Figure 6 : Pedigree du branchon GV510 de la famille GV-001 porteuse de la mutation K423E.**

D'après Morissette *et al.*, (Morissette *et al.*, 1998)

Une réversion de la mutation, une seconde mutation dans *TIGR/MYOC* inversant la K423E et un effet d'empreinte parentale furent éliminés par étude des haplotypes. De plus, un des homozygotes de ce noyau a eu deux enfants malades porteurs de l'haplotype commun. Cet homozygote transmet donc une mutation fonctionnelle (Morissette et al., 1998). Pour comprendre ce phénomène, l'étude de la protéine *TIGR/MYOC* est essentielle. Le modèle présenté veut que deux polypeptides *TIGR/MYOC* mutés interagissent entre eux via un motif de glissière de leucines et complètent le phénotype. Ainsi, un allèle muté A' et un allèle sauvage A s'associent pour former un complexe défectueux AA' alors que le complexe A'A' est fonctionnel. Ce concept d'interaction entre deux polypeptides a déjà été observé chez les organismes inférieurs tels la drosophile et la levure (Crick and Orgel, 1964; Fincham, 1966) et est analogue au mécanisme d'interférence métabolique proposé par Johnson en 1980 (Johnson, 1980). Ce phénomène observé à travers cette grande famille de plus de 600 individus est un nouveau modèle de complémentation homoallélique chez l'humain proposé par l'équipe de Morissette *et al.* L'étude des interactions protéiques observées entre les polypeptides *TIGR/MYOC* et/ou avec d'autres permettra de mieux comprendre et prouver ce modèle de complémentation.

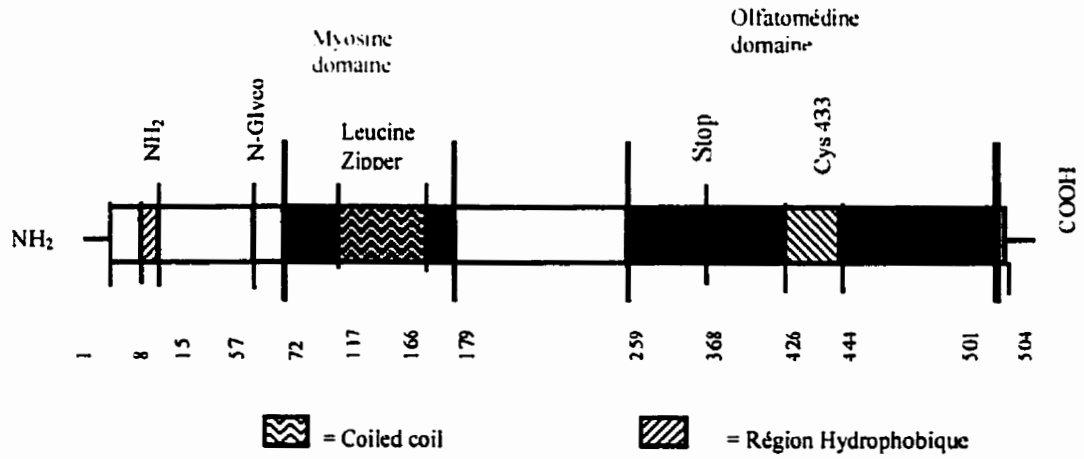
### 1.2.3. Étude de la structure protéique TIGR

Tel que déjà établi, le produit du gène *TIGR/MYOC* est une protéine acide de 504 acides aminés (Figure 7). La protéine possède une grande homologie de séquence avec l'olfactomédine et la myosine. Le domaine d'homologie à l'olfactomédine est situé dans la partie C-terminale entre les acides aminés 259 et 501. L'homologie entre *Rana catesbeiana* est telle que 56 des 179 acides aminés sont conservés et 83

sont des substitutions conservatives portant l'homologie à 77,7% (Kubota et al., 1997). Dans ce même domaine, la cystéine 433 fait partie d'un groupe de dix acides aminés qui sont conservés chez les espèces inférieures jusqu'à *C. elegans*. L'olfactoméline est une protéine sécrétée au niveau du tractus olfactif dont la fonction est encore inconnue (Snyder et al., 1991). L'implication de cette cystéine au niveau de la dimérisation de TIGR/MYOC et de l'olfactoméline n'a pas encore été démontrée (Nguyen et al., 1998).

Le second domaine d'homologie est situé entre les acides aminés 72 à 179. Ce domaine est similaire à la chaîne lourde de la myosine de *Dictyostelium discoideum* où 20 des 67 acides aminés sont similaires et 32 sont des substitutions conservatrices portant l'homologie à 77,6% (Kubota et al., 1997). Le domaine d'homologie à la myosine contient deux motifs de boudin emboudinés (coiled coil) entre les acides aminés 71 à 85 et 117 à 116. Le premier motif contient trois résidus leucines répétés à toutes les sept positions alors que le second en contient huit (Ortego et al., 1997). Le second motif de huit leucines forme une hélice alpha apolaire et ressemble au motif de glissière de leucines sans le domaine basique de liaison à l'ADN (Treisman et al., 1995). Dans ce motif de glissière de leucines, cinq résidus arginines sont répétés tous les onze acides aminés. Lorsque le motif leucine est représenté comme une roue hélicoïdale, les cinq résidus arginines se retrouvent à l'opposé des huit résidus leucines, formant ainsi une région chargée positivement favorisant l'interaction protéique (Ortego et al., 1997). Cette partie N-terminale de la protéine sera donc un élément clef pour tester la formation d'oligomères supportant le

modèle de complémentation homoallélique. D'ailleurs, dans la littérature, de plus en plus de modèles d'interactions protéiques reposent sur ce motif de boudin emboudinés : les SNARE's, les myosines et quelques récepteurs membranaires (Atkinson and Stewart, 1991; Chakerian et al., 1991; Sutton et al., 1998). La formation de complexes oligomériques de la protéine TIGR/MYOC a déjà été démontrée en utilisant un agent de réaction de couplage, le glutaraldéhyde, sur des extraits protéiques totaux (Nguyen et al., 1998). L'équipe de Nguyen *et al.* proposa donc que la protéine pouvait former des dimères et peut-être même des tétramères



**Figure 7 : Structure de la protéine TIGR/MYOC**

Par la bio-informatique, la protéine TIGR/MYOC a été caractérisée par différents groupes de recherche. Cette caractérisation permet de formuler des hypothèses sur sa structure, son rôle biologique ainsi que sur son rôle dans le glaucome. La protéine a un poids moléculaire théorique de 57 kDa et a un point isoélectrique de 5,44. Ces valeurs furent utiles pour confirmer le produit du gène *GLC1A*. En effet, l'équipe de Nguyen *et al* travaillait à l'époque sur des cellules du trabéculum en culture (HTM) induite au dexaméthasone, une forme de glucocorticoïde synthétique. Ces cellules induites produisaient des protéines de nature inconnue sur gel SDS-PAGE 2D entre 52 à 56 kDa et 66 kDa. Le point isoélectrique observé variait entre 5.4 et 5.8 (Polansky *et al.*, 1985; Polansky *et al.*, 1997). L'équipe, à partir du gène *TIGR/Myoc* cloné par l'équipe de Sheffield en 1997 grâce à des séquences EST (Stone *et al.*, 1997), développa un anticorps à partir de la protéine TIGR/MYOC recombinante surproduite dans des cellules Sf9. Il s'avéra que le gène *TIGR/MYOC* localisé par l'équipe de Sheffield était en fait la protéine induite dans les HTM caractérisés par l'équipe Nguyen *et al.* (Nguyen *et al.*, 1998; Polansky *et al.*, 1997).

La protéine possède deux sites d'initiation de la traduction, un premier situé à la position +1 et le second à la position +15 de l'ARN<sub>m</sub>. Elle contient également un signal potentiel de clivage, Val-Ala /Arg-Thr (von Heijne, 1983), qui se situe entre la position 32 et 33 de la séquence protéique . Selon les résultats de Nguyen *et al* par séquençage en N-terminal de la protéine, le doublet observé à 55 kDa est une forme utilisant le premier méthionine alors que l'autre forme serait clivée de façon post-traductionnelle. Quant à la bande observée à 66 kDa, il s'agit d'une forme glycosilée

d'un des doublets de 55 kDa (Nguyen et al., 1998). Il n'ont pas fait le séquençage de cette bande mais l'ont identifiée en utilisant un inhibiteur de la N-glycosylation, la tunicamycine. La protéine comporte des sites de O-glycosylation et un site unique de N-glycosylation. La glycosylation de type O est l'ajout d'un oligosaccharide à l'oxygène d'une sérine, d'une thréonine ou d'une hydroxylysine au niveau du réticulum ou du cytosol (Lodish and Darnell, 1995). La N-glycosylation est l'attachement d'un oligosaccharide à l'azote d'une asparagine sur une séquence spécifique, Asp-X-Ser/Thr où X peut être n'importe quel acide aminé à l'exception d'une proline. La réaction commence au niveau du réticulum endoplasmique pour prendre fin dans l'appareil de Golgi (Hubbard and Ivatt, 1981). Les oligosaccharides liés à l'oxygène sont plus courts et plus diversifiés que ceux liés à l'azote, ces derniers étant de nature beaucoup plus complexe.

Deux régions hydrophobes ont été identifiées dans la séquence de TIGR/MYOC. La première se situe entre les acides aminés 8 à 28, alors que la seconde est dans la partie C-terminale de la protéine, entre les acides aminés 425 à 445. La longueur et le degré d'hydrophobicité de ces régions ne permettent pas de confirmer si ces domaines sont transmembranaires ou non (Fingert et al., 1998) (Figure 7). En immunofluorescence, la protéine a d'ailleurs été localisée dans le cytoplasme des cellules comme étant associée aux microtubules. Cette association aux microtubules a été localisée dans la partie N-terminale de la protéine entre les acides aminés 1 à 124 (Mertts et al., 1999).



L'étude du gène *TIGR/MYOC* se fait également chez la souris et le rat où les ADN homologues ont été clonés. L'organisation génomique est conservée chez les deux espèces et une grande homologie existe entre les séquences. Chez le rat, seulement le clonage de l'ADNc a été réalisé. L'homologie entre la séquence humaine et celle de *Rattus norvegicus* au niveau protéique est de 81%. Chez la souris, les études sont plus nombreuses vu la possibilité de créer un jour des souris transgéniques afin de développer un modèle animal de glaucome. L'homologie, dans ce cas, est de 82% pour la structure nucléique et protéique. L'orthologue *Mus musculus* possède seulement 490 des 504 acides aminés humains, les résidus 1 à 14 étant absents (Fingert et al., 1998). L'expression du gène chez l'adulte est similaire entre les espèces. Toutefois, l'expression observée chez la souris a été mieux définie au cerveau (Swiderski et al., 1999). Le site de clivage, le motif glissière de leucines et le site de glycosilation sont conservés chez la souris (Tomarev et al., 1998). Toutefois, d'autres motifs tels la séquence de direction au peroxisome, Ser-Lys-Met à la position 502-504 (Subramani, 1993) et des sites de phosphorylation sont absents chez la souris. Ceci suggère donc un rôle plus ou moins important de ces sites dans la fonction du gène (Fingert et al., 1998). Il est également intéressant de noter que plusieurs des mutations ayant été associées au glaucome sont des acides aminés conservés entre la souris et l'homme (Fingert et al., 1998).

### **1.3. But et intérêt du projet de recherche**

La découverte d'individus homozygotes par l'équipe de Morissette et Raymond en 1998 a soulevé un nouveau modèle de ségrégation génétique chez l'humain : la complémentation homoallélique (Morissette et al., 1998). Ce nouveau modèle

demande une étude approfondie des interactions protéiques qui existent dans la protéine TIGR/MYOC. Comme la protéine possède deux motifs de boudin emboudinés, un de trois et un de huit résidus leucines répétés, celle-ci devrait former des complexes moléculaires, soit avec elle-même ou avec d'autres polypeptides. Pour faire l'étude de ces interactions protéiques, la protéine sera produite de façon transitoire dans les cellules COS-7 à partir de l'ADNc sous-cloné dans un vecteur d'expression eucaryotique. Par la réaction de polymérase en chaîne, le motif glissière de leucines contenant les huit leucines sera excisé de la protéine et celle-ci sera analysée sur gel SDS-PAGE. Sans ce motif de dimérisation, la protéine devrait migrer sous forme de monomère uniquement. Une réaction de couplage avec le glutaraldéhyde sera réalisée sur la protéine TIGR<sup>wt</sup> et TIGR<sup>K423E</sup> afin de confirmer que ce motif est impliqué dans l'oligomérisation de la protéine. La protéine sera également produite dans un système de production *in vitro*, les réticulocytes, et analysée par immunobuvardage afin de démontrer que la protéine forme avec elle-même des homodimères, soit pour le type sauvage et le type mutant pour la K423E.

Dans une seconde partie du projet, nous nous sommes intéressés à la formation d'hétérodimères TIGR/MYOC entre polypeptides sauvages (Wt) et mutés (K423E). Grâce à un système à double épitopes, les complexes Wt/K423E seront immunoprécipités et analysés par immunobuvardage. Une seconde approche sera utilisée, c'est-à-dire l'utilisation d'une protéine tronquée de 137 acides aminés. Ce clone sera construit en remplaçant l'acide aminé glutamine 368 par un codon d'arrêt, il s'agit d'une mutation que l'on retrouve dans plus de 1% des cas de glaucome

associé au gène *TIGR/MYOC*. S'il y a formation d'hétérodimères entre la protéine sauvage et celle tronquée, un complexe de poids moléculaire intermédiaire sera détectable par immunobuvardage. Ces deux expériences nous confirmeront l'hypothèse de complémentation homoallélique sur une base structurale mais non fonctionnelle.

Comme la protéine migre sous trois isoformes distincts, un doublet de 57 kDa et une bande de 60 kDa, nous ferons l'étude de la glycosylation de la protéine. Celle-ci possède plusieurs sites pour la O-glycosylation et un pour la N-glycosylation. Pour ce faire, des digestions glycosidiques spécifiques du type O et N seront réalisées sur la protéine *TIGR/MYOC* recombinante ainsi que celle isolée à partir de trabéculums humains. Les cellules COS-7 seront également traitées avec de la tunicamycine, un inhibiteur de la N-glycosylation, afin de confirmer qu'il s'agit bien d'un type N. Ensuite, par mutagenèse dirigée, l'unique site de N-glycosylation à la position Asn 57 sera détruit. Cette protéine mutante nous permettra de vérifier si la glycosylation des polypeptides *TIGR/MYOC* est essentielle à la formation des dimères et des complexes de haut poids moléculaire observés en condition non-réductrice.

L'étude du produit du gène *TIGR/MYOC* permettra de mieux comprendre la nature pathologique du glaucome ainsi que le rôle que joue ce gène dans l'élévation de la pression intraoculaire chez les patients atteints de GAO.

## **CHAPITRE II                    STRUCTURAL EVIDENCE FOR METABOLIC INTERFERENCE TO ACCOUNT FOR AUTOSOMAL DOMINANT HETEROZYGOTE-SPECIFIC INHERITANCE OF GLAUCOMA.**

### **AVANT-PROPOS**

Ce chapitre constitue le manuscrit d'un article qui sera soumis pour publication dans la revue *PNAS*.

J'ai effectué les expériences sur la glycosilation des isomères TIGR/MYOC ainsi que celles démontrant que le motif de glissière de leucines est impliqué dans la dimérisation de la protéine. J'ai également participé, avec Steve Moisan M.Sc., à la construction des clones TIGR<sup>wt</sup> et TIGR<sup>K423E</sup> contenant les épitopes c-myc et histidine. J'ai ensuite participé aux expériences d'immunobuvardage afin de démontrer qu'il existe des hétérodimères TIGR *in vitro*. Les expériences avec les réticulocytes ont été entièrement réalisées par Steve Moisan M.Sc..

J'aimerais mentionner également que l'ADNc complémentaire de *TIGR/MYOC* construit avant mon arrivée n'est pas identique à *TIGR/MYOC* sauvage. L'acide glutamique 96 était une glycine. J'ai moi-même corrigé cette mutation et cela a pour effet d'éliminer la bande de plus haut poids moléculaire des dimères lorsque traités à

la tunicamycine. Une bande s'ajoute en plus dans les complexes de haut poids moléculaire. Je suis présentement à refaire l'ensemble des clones que nous possédons afin de répéter ces expériences. Cette mutation, bien que présente, ne change en rien le présent ouvrage puisqu'il y a toujours formation de dimères TIGR.

**Structural evidence for metabolic interference to account for autosomal dominant heterozygote-specific inheritance of glaucoma**

Steve Moisan<sup>1\*</sup>, Marc-André Rodrigue<sup>1\*</sup>, Stéphane Gobeil<sup>1</sup>, Isabelle Fleury<sup>1</sup>, Jean Morissette<sup>2</sup>, Vincent Raymond<sup>1</sup>.

\*These authors contributed equally to this work.

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Endocrinology, CHUL Research Center, T3-67, 2705 Laurier Blvd., Québec City, Province of Québec, G1V 4G2, Canada.

<sup>2</sup>Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL) Research center, Québec city, Québec, G1V 4G2, Canada.

Correspondance should be addressed to V.R., email:

[vincent.raymond@crchul.ulaval.ca](mailto:vincent.raymond@crchul.ulaval.ca)

## 2.1. Résumé

Les mutations dans le 3<sup>ème</sup> exon de *TIGR/MYOC* causent un glaucome primaire à angle ouvert (GPAO) qui ségrègue de façon autosomique dominante (AD) (Shields et al., 1996; Stone et al., 1997). Il s'agit d'une maladie oculaire caractérisée par une neuropathie du nerf optique résultant en une perte progressive du champ visuel conduisant généralement à la cécité si la maladie n'est pas traitée. Une d'elle, la *TIGR<sup>K423E</sup>*, est la première qui manifeste une dominance autosomique spécifique de l'hétérozygote chez l'humain (Morissette et al., 1998). L'interférence métabolique propose qu'un allèle sauvage A et qu'un allèle muté A' ne donnent pas de phénotype observable lorsqu'elles sont à l'état d'homozygote. Toutefois, lorsque les deux allèles se retrouvent à l'état d'hétérozygote AA', elles donnent un phénotype muté qui résulte d'une interférence entre la protéine sauvage et celle mutée (Johnson, 1980).

Nous montrons ici que les polypeptides *TIGR/MYOC* existent sous deux formes de monomères migrant à 57 kDa et 60 Kda. La bande de 60 kDa est un isomère N-glycosilé au résidu Asn 57. En conditions non-réductrices, *TIGR/MYOC* est détectée sous deux complexes majeurs migrant à 120 kDa et 240 kDa. Lors de co-transfections de l'ADNc *TIGR<sup>K423E</sup>* et WT, il y a formation de complexes identiques à ceux observés avec le *TIGR<sup>wt</sup>* seul. Un système à double épitopes confirme que les complexes de 120 kDa sont composés d'hétérodimères *TIGR<sup>wt</sup>/TIGR<sup>K423E</sup>*. Par délétion et par un mécanisme de réaction de couplage, nous démontrons que le motif de glissière de leucines est essentiel à la dimérisation de la protéine. La protéine *TIGR<sup>Gln368X</sup>* est tronquée de 137 acides aminés en C-terminale et à un poids

moléculaire de 82 kDa. En co-transfection avec TIGR<sup>wt</sup>, il y a formation d'un complexe intermédiaire qui migre à 98 kDa. Ce complexe est un hétérodimère wt/Gln368X. Ces résultats supportent le modèle de complémentation homoallélique proposé pour le glaucome.



## Abstract

Mutations in the 3<sup>rd</sup> exon of *TIGR/myocilin* cause autosomal dominant (AD) primary open-angle glaucoma (POAG), a major ocular disorder characterized by an optic neuropathy and a progressive loss of the visual fields that often leads to blindness (Shields et al., 1996; Stone et al., 1997). One of them: TIGR<sup>K423E</sup>, was the first mutation that has been shown to manifest autosomal heterozygote-specific dominance in humans (Morissette et al., 1998). Metabolic interference proposed a wild-type allele A and a mutant allele A' such that homozygosity for either allele has no phenotypic consequence, but the heterozygous state AA' leads to a deleterious defect due to interference between the protein products of the two different alleles (Johnson, 1980).

Here we show that TIGR<sup>wt</sup> polypeptide generated two peptides migrating at approximately 57 and 63 kDa. The 63 kDa isoform resulted from N-glycosylation of the smaller peptide at Asn-57. Under non-reducing conditions, TIGR<sup>wt</sup> was detected as 2 major complexes migrating at about 120 and 240 kDa. Co-transfection of a TIGR<sup>K423E</sup> cDNA with its wt counterpart produced complexes identical to those observed when the wt construct was transfected alone. Double epitope tagging experiments confirmed that the 120 kDa complex observed in co-transfections resulted from heterodimerization between TIGR<sup>wt</sup> and TIGR<sup>K423E</sup> polypeptides. Deletion and cross-linking assays revealed that TIGR NH2-terminal leucine zipper

was essential for dimerization. TIGRGln368Stop, that yielded a truncated protein, generated smaller 82 kDa homodimers. Interestingly, co-transfection of wt and Gln368Stop cDNAs generated 3 complexes, one of these migrated at approximately 98 kDa and consisted of wt/Gln368Stop heterodimers. These results support metabolic interference to account for autosomal heterozygote specific glaucoma.

## 2.2. Introduction

Glaucoma encompasses a complex of ocular disease entities characterized by an optic neuropathy and a progressive loss of the visual fields (Shields et al., 1996). The disorder is one of the leading causes of blindness worldwide (Thylefors and Negrel, 1994). Of all the different glaucomas, primary open-angle glaucoma (POAG) occurs most frequently, affecting more than 1 to 2% of the caucasian population over 40 years of age. (Johnson et al., 1996b; Lichter, 1994). The disorder shows genetic heterogeneity (Raymond, 1997), (Sarfaraizi, 1997; Wirtz et al., 1999).

In 1997, the disease gene located at *GLC1A* on chromosome 1q was identified as the trabecular meshwork-inducible glucocorticoid response (*TIGR*) gene (Nguyen et al., 1998; Polansky et al., 1997; Stone et al., 1997), also known as *myocilin* (Kubota et al., 1997). The *TIGR* gene encodes a protein of 504 amino acids which function still remains to be characterized. Except for a nonsense variant at codon 46 that may be associated with autosomal recessive POAG, these *TIGR* mutations convey the disorder as an autosomal dominant trait (Adam et al., 1997; Alward et al., 1996; Fingert et al., 1999; Kennan et al., 1998; Mansergh et al., 1998; Morissette et al.,

1998; Richards et al., 1998; Stone et al., 1997; Wiggs et al., 1998).

We have been studying a huge family in which 98 heterozygotic carriers of a TIGR lysine to glutamic acid mutation at codon 423 (K423E) displayed autosomal dominant POAG (Morissette et al., 1998). Four mutant homozygotes did not manifest any of the symptoms of glaucoma in the pedigree. Recent ophthalmological investigations confirmed that these individuals, now aged between 40 and 52 years old, remained unaffected. Meiotic reversion, parent-of-origin dependent effects and reduced penetrance of the mutant allele were ruled-out in these asymptomatic mutant homozygotes. *TIGR*<sup>K423E</sup> therefore appeared to be the first mutation that caused an autosomal dominant heterozygote-specific phenotype in humans. Although similar forms of segregation have been explained by inter-allelic complementation in lower eukaryotes (Fincham, 1966), the molecular basis of autosomal dominant heterozygote-specific inheritance has not yet been defined in humans.

Metabolic interference proposed a one locus mechanism with a wild-type allele A and a mutant allele A' such that homozygosity for either allele has no phenotypic consequence, but the heterozygous state AA' leads to a deleterious defect due to interference between the protein products of the two different alleles (Johnson, 1980). Interestingly, analysis of TIGR polypeptide revealed a leucine zipper containing seven leucine motifs with no basic domain in its NH<sub>2</sub>-terminal (Nguyen et al., 1998) and a cysteine at position 433 conserved by the several members of the olfactomedin family

(Morissette et al., 1998). Since these structures were potentially involved in mediating TIGR-TIGR protein interactions, we tested metabolic interference as a model to account for autosomal dominant heterozygote-specific inheritance of glaucoma

### 2.3. Results and discussion

COS-7 cells were transiently transfected with expression vectors encoding either the TIGR wild-type (wt) or TIGR<sup>K423E</sup> gene products (Fig 1 A) and newly synthesized proteins were analysed by immunoblotting using a specific polyclonal antibody (Polansky et al., 1997). In cells transfected with the TIGR<sup>wt</sup> cDNA construct, pRcTIGRwt, immunoreactivity was detected as two high MW complexes migrating at between 110 and 125 kDa and, at approximately 230 kDa (Fig. 1 B, lane 4, Fig. 2A, lane 1). Several bands constituted the 110-130 kDa complex while only one or two bands were recognized in the 220 kDa complex. Following addition of the reducing agent dithiothreitol (DTT) to the extracts, both complexes were resolved into two lower MW forms migrating at approximately 57 and 60 kDa (Fig. 1 B, lane 3). A highly similar pattern of migration was observed when the TIGR<sup>K423E</sup> cDNA construct, pRcTIGRK423E, was transfected (Fig. 1 B, lane 5 and Fig 4 A, lane 6 and 7). TIGR and TIGR<sup>K423E</sup> 57 kDa isoforms most likely displayed unprocessed monomers as their peptide masses were both estimated at 56.9 kDa. Under non-reducing conditions, immunoblotting of protein extracts obtained from human trabecular meshwork (HTM) tissues showed that TIGR polypeptides also formed two high MW complexes in ocular tissues (Fig. 1 B, lane 1). Under reducing conditions, HTM TIGR polypeptides were resolved into the same 57 and 60 kDa isoforms as observed in cultured cells as well as a smaller, approximately 53 kDa, TIGR polypeptide resulting from internal cleavage or utilization of a second initiation site for translation (Fig. 1B, lane 2) (Nguyen et al., 1998).

TIGR polypeptide contains several potential sites for N- and O- glycosylation (Nguyen et al., 1998). To assess the involvement of this post-translational processing mechanism in generating the different TIGR isoforms, COS-7 cells were transfected with TIGR<sup>wt</sup> cDNA for a 12 hr period prior to a 36 hr incubation with the antibiotic tunicamycin, an inhibitor of the dolichol-dependant N-glycoside sugar chain biosynthesis. Western analysis under non-reducing conditions revealed that the inhibitor did not hinder oligomerization of TIGR peptides even if it prevented the addition of carbohydrates to several of the proteins present in the 110-130 kDa complex (Fig 2 A, lanes 1 and 2). Incubation with tunicamycin also decreased the strength of the signal observed at 220 kDa (Fig. 2 A, lane 2, and data not shown). The nature of the oligosaccharide links was then investigated by treating the cell extracts with specific glycosidases prior to protein analysis under reducing conditions. As depicted in figure 2B, lane 4, treatment with O-glycosidase did not alter the migration pattern of the 57 or 60 kDa TIGR isoforms. On the other hand, PNGaseF: a specific N-glycosidase that releases asparagine-linked oligosaccharides, removed all carbohydrates from the polypeptide backbone of the 60 kDa monomer leaving intact only the 57 kDa isoform (Fig 2 B, lane 3). Incubation of COS-7 cells with tunicamycin showed that the inhibitor prevented synthesis of the 60 kDa monomer, further supporting that oligosaccharides were linked to the 57 kDa isoform by an N-glycoside chain (Figure 2B, lane 2 ). Similar results were obtained when HTM tissues were treated with these two glycosidases demonstrating that TIGR polypeptides were also partially N-glycosylated in ocular tissues (Fig 2 C). Since the peptide harbored only one potential site for N-glycosylation at Asn57, we then mutated this amino acid to a tyrosine residue. Transfection and analysis of this recombinant revealed that

TIGR<sup>Asn57Tyr</sup> generated only one isoform migrating at the 57 kDa position (Fig. 2 D, lane 4), confirming that the lower TIGR<sup>wt</sup> monomer was an unglycosylated polypeptide while its 60 kDa counterpart was an N-linked glycoprotein. When the transfected TIGR<sup>Asn57Tyr</sup> gene product was analysed under non-reducing conditions, the polypeptide generated three distinct oligomers (Fig 2 A, lane 3). Two of these oligomers displayed MW of approximately 114 kDa and 132 kDa, identical in size to the oligomers generated by TIGR<sup>wt</sup> when transfected in cells grown in the presence of tunicamycin (Fig 2 A, compare lanes 2 and 3). TIGR<sup>wt</sup> or TIGR<sup>Asn57Tyr</sup> 114 kDa oligomers displayed MWs twice the size of their respective monomers and most likely represented homodimers. On the other hand, the two 132 kDa oligomers may depict TIGR<sup>wt</sup> or TIGR<sup>Asn57Tyr</sup> homodimers interacting with additional peptide(s). Alternatively, a single TIGR monomer may interact with other proteins to generate these 132 kDa complexes.

These results above showed that N-glycosylation was not essential for TIGR polypeptides to undergo oligomerization but such process may require extraneous proteins to occur. To investigate if TIGR monomers generated homomultimers without interacting with additional proteins, TIGR<sup>wt</sup> and TIGR<sup>K423E</sup> cDNAs were added to an *in vitro* reticulocyte lysate system in which transcription of the cognate DNA was coupled to translation of its mRNA. Following protein extraction and immunoblotting, we observed that both TIGR<sup>wt</sup> and TIGR<sup>K423E</sup> polypeptides produced monomers migrating at about 57 kDa. Both polypeptides also formed homodimers migrating at the expected 114 kDa position (Fig 3 A).

To test if TIGR-TIGR dimerization also occurred in cultured cells, we next constructed an expression vector encoding the Q368Stop mutation (Fig 1A). TIGR<sup>Q368Stop</sup> variant is the most common mutation associated with adult-onset primary open-angle glaucoma, carried by more than 1% of all POAG patients (Alward et al., 1998; Stone et al., 1997). Since this mutant cDNA should yield a truncated polypeptide of approximately 41 kDa harboring an intact leucine zipper, we hypothesized that, upon simultaneous transfection of TIGR<sup>wt</sup> and TIGR<sup>Q368Stop</sup> cDNAs in COS-7 cells, interaction between the wt construct and the TIGR<sup>Q368Stop</sup> recombinant would generate a novel heterodimer of intermediate size. To facilitate analysis of the complexes, tunicamycin was added to the culture medium for the last 36 hr of the incubation period. As depicted in figure 3 B, when TIGR<sup>wt</sup> and TIGR<sup>Q368Stop</sup> recombinants were transfected alone, they formed homodimers migrating, respectively, at between 110-130 kDa and at about 80 kDa (Fig 3 B, lanes 1 and 3). As previously observed, the higher MW TIGR isoform migrating above the 114 kDa band at approximately 130 kDa may be a dimer interacting with an additional protein. Interestingly, in cells transfected simultaneously with both cDNAs, a novel immunoreactive complex was produced at approximately 98 kDa (Fig 3 B, lane 2). This newly generated complex most likely resulted from heterodimerization of one TIGR<sup>wt</sup> monomer with its Q368Stop counterpart. These results therefore showed that TIGR polypeptides did not require extraneous proteins to undergo oligomerization either *in vitro* or in cultured cells. Moreover, since TIGR<sup>Q368Stop</sup> did not encode cysteine 433, these data demonstrated that this c-terminal cysteine was not essential to induce TIGR dimerization. This residue and/or other cysteines may, however, increase stabilization



of the dimers as DTT was required to resolve the high MW complexes into their monomeric isoforms.

Previous experiments have shown that purified TIGR polypeptides underwent complex formation following a 2 hr *in vitro* treatment with glutaraldehyde (Nguyen et al., 1998), a cross-linking agent which has been used extensively to study leucine zippers interactions. To further confirm the role of TIGR leucine zipper in the dimerization process, we constructed pRc/TIGR $\Delta$ zip: an expression vector in which TIGR leucine zipper has been deleted (Fig 1 A). Expression of pRc/TIGR $\Delta$ zip in COS-7 cells and analysis under non-reducing conditions revealed the production of two low MW TIGR monomers migrating at a rate slightly faster than the estimated peptide mass of 51 kDa for an unprocessed TIGR <sup>$\Delta$ zip</sup> monomer (Fig 3 C, lane 2). Experiments performed with PNGaseF and O-glycosidase demonstrated that the higher MW band represented the N-glycosylated isoform of TIGR <sup>$\Delta$ zip</sup> while the lower MW band represented an unprocessed TIGR <sup>$\Delta$ zip</sup> monomer (results not shown). We then performed glutaraldehyde cross-linking experiments (Abdella et al., 1979). COS-7 cells were transfected with either pRc/TIGRwt or pRc/TIGR $\Delta$ zip and the lysates treated with DTT to reduce TIGR oligomers into their monomeric forms prior to addition of the cross-linking agent for increasing periods of time. As shown in Fig. 3 D, lanes 2 to 5, the wild-type TIGR construct started forming high molecular weight complexes as early as 2 minutes after addition of glutaraldehyde. Twenty minutes following addition of the linking agent, all wt monomers had undergone dimerization. On the other hand, both glycosylated and non-glycosylated TIGR <sup>$\Delta$ zip</sup> polypeptides

failed to generate such complexes even 20 min after addition of the glutaraldehyde (Fig 3D, lanes 6 to 9). These results therefore confirmed that the TIGR leucine zipper was essential for dimerization *in vitro* (Tong et al., 1997).

The majority of TIGR mutations causing glaucoma have been detected within the olfactomedin homology domain (Rozsa et al., 1998). Since these variants may change TIGR conformation thereby altering TIGR protein-protein interactions, we next assessed the role of the K423E mutation on complex formation. Increasing concentrations of *TIGR*<sup>K423E</sup> cDNA were transfected in the presence of decreasing amount of the wild-type construct. After cell lysis and protein analysis, we observed that the pattern of immunoreactivity was identical to that detected when transfections were performed with pRcTIGR alone at all concentrations tested, thereby indicating that *TIGR*<sup>K423E</sup> gene products did not disrupt the formation of the two high MW complexes (Fig. 4A, lanes 2 to 6).

To further investigated if *TIGR*<sup>wt</sup> can form heterodimers with its *TIGR*<sup>K423E</sup> counterpart, we realized an immunoprecipitation with a double tag system. Cos-7 cells were transfected alone or in combination with *TIGR*<sup>wt-His</sup> and *TIGR*<sup>K423E-Myc</sup> cDNA (Fig 1). Immunoprecipitation was first realized with an antibody raised against myc epitope on a crude transfected protein extract and then followed by a western blot analysis with an antibody raised against His tag. Transfection alone proved the specificity of antibody against their own epitope (Fig 4B lane 1 and 2). When they were co-

transfected together, a complex made of heterodimers was detected (Fig 4B lane 3). These results supported the metabolic interference model proposed above where heterodimer  $TIGR^{wt}/TIGR^{K423E}$  were represent as a nonfunctional complex.

Taken together, the results of our experiments have shown that  $TIGR^{wt}$  polypeptides formed homodimers in reticulocyte lysates as well as in COS-7 cells consistent with metabolic interference (Johnson, 1980) to account for unaffected  $TIGR^{K423E}$  mutant homozygotes. Our results therefore demonstrate that TIGR can form *in vivo* heterodimers between a wt and a mutant allele as well as homodimers made of two wt or two mutant alleles. Our model may explain x-linked inheritance with male sparing, as observed, for example, in a large pedigree suffering from epilepsy (Ryan et al., 1997), and unusual forms of autosomal dominant inheritance not yet reported, like disorders occurring in all members of large sibships with both normal parents. Our results showing that  $TIGR^{wt}$  and  $TIGR^{K423E}$  polypeptides formed homomultimers are also consistent with the model of interallelic complementation proposed by Crick and Orgel in 1964 (Crick and Orgel, 1964). These data further suggest that heterodimer formation between a normal and a mutated TIGR polypeptide may be an important aspect of TIGR disease-causing mutations.

Figure 1

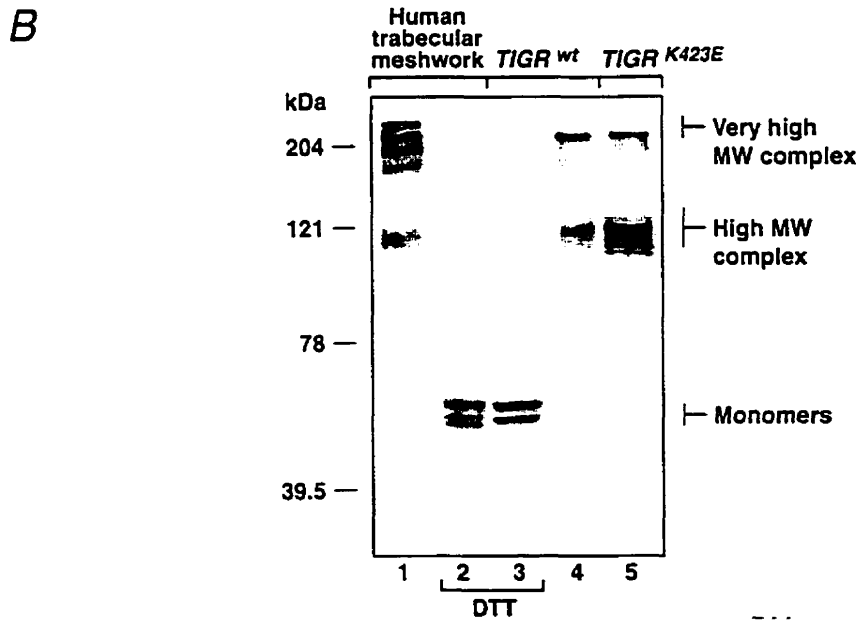
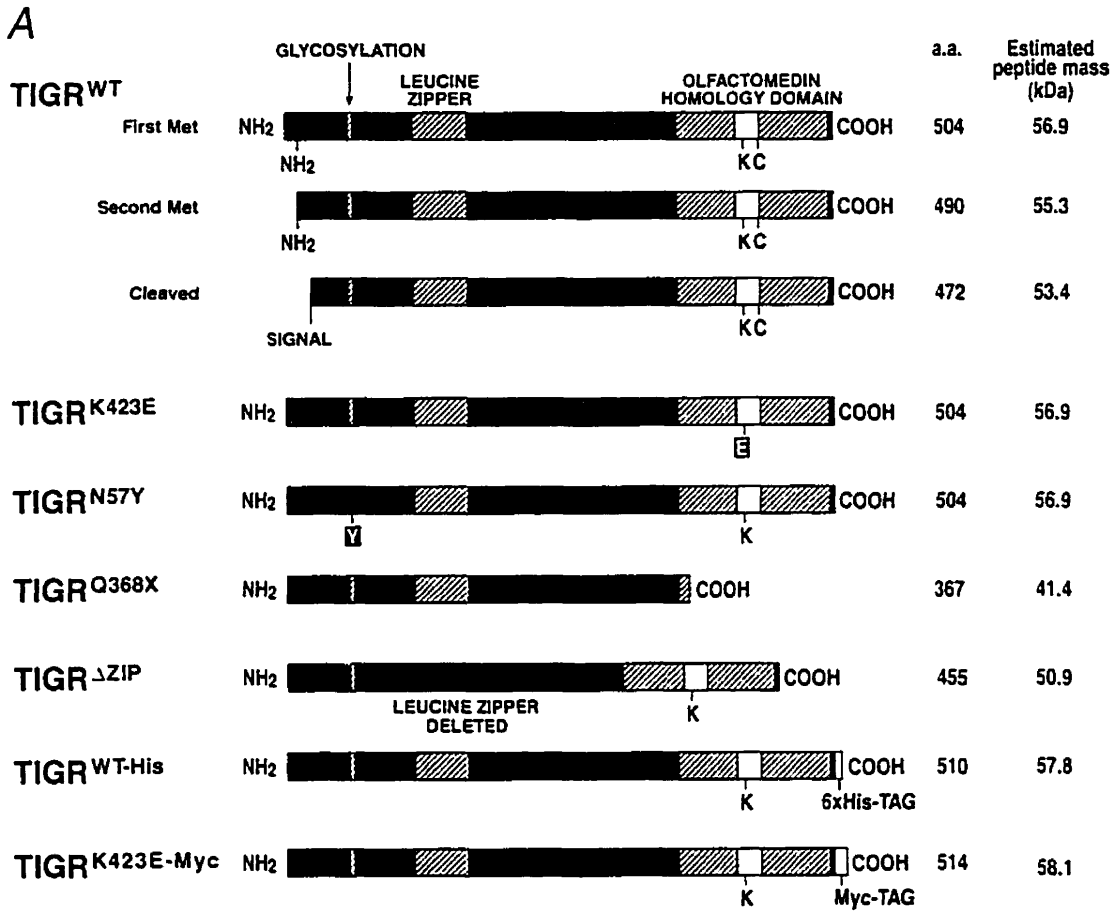


Figure 2

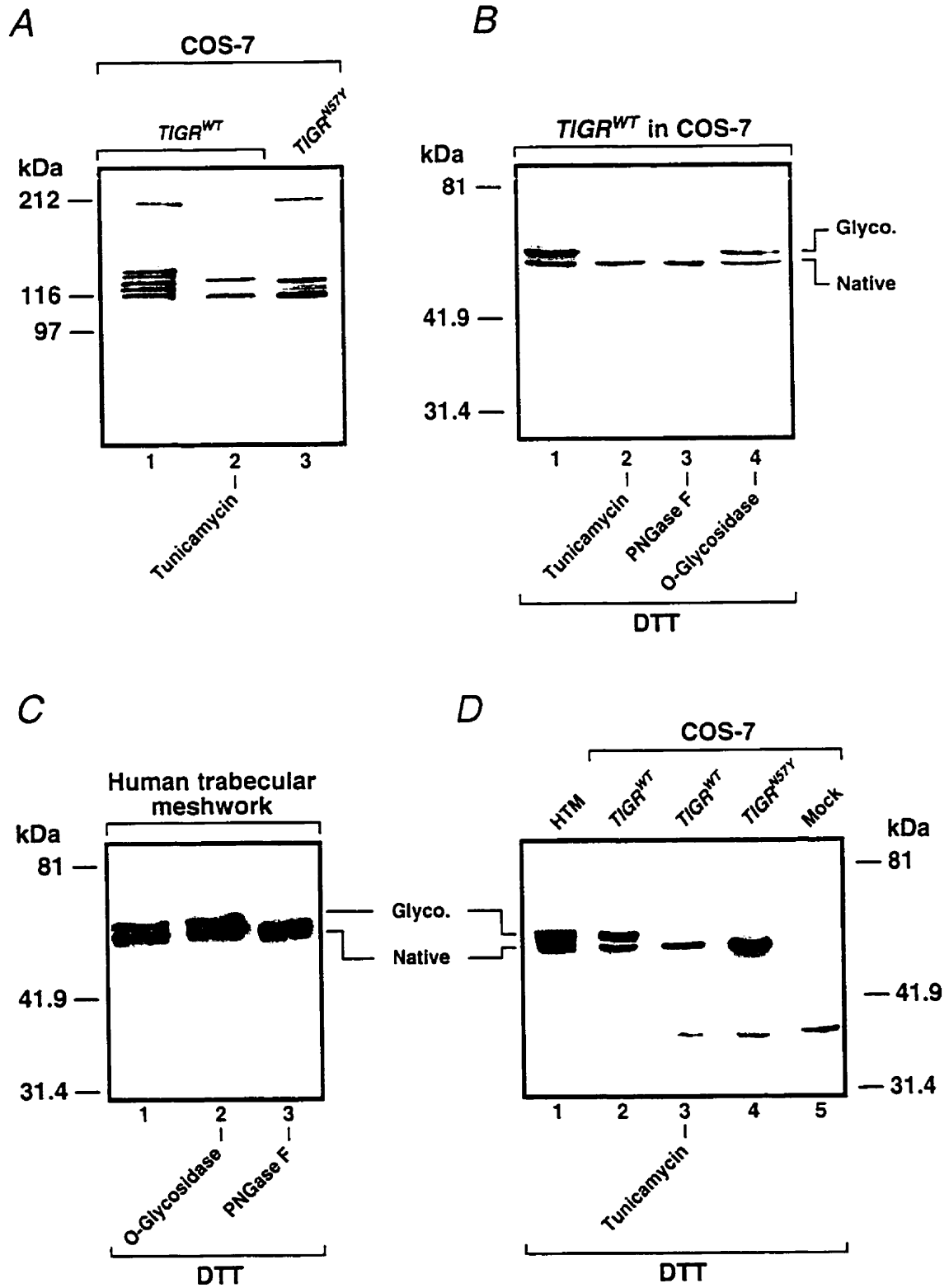


Figure 3

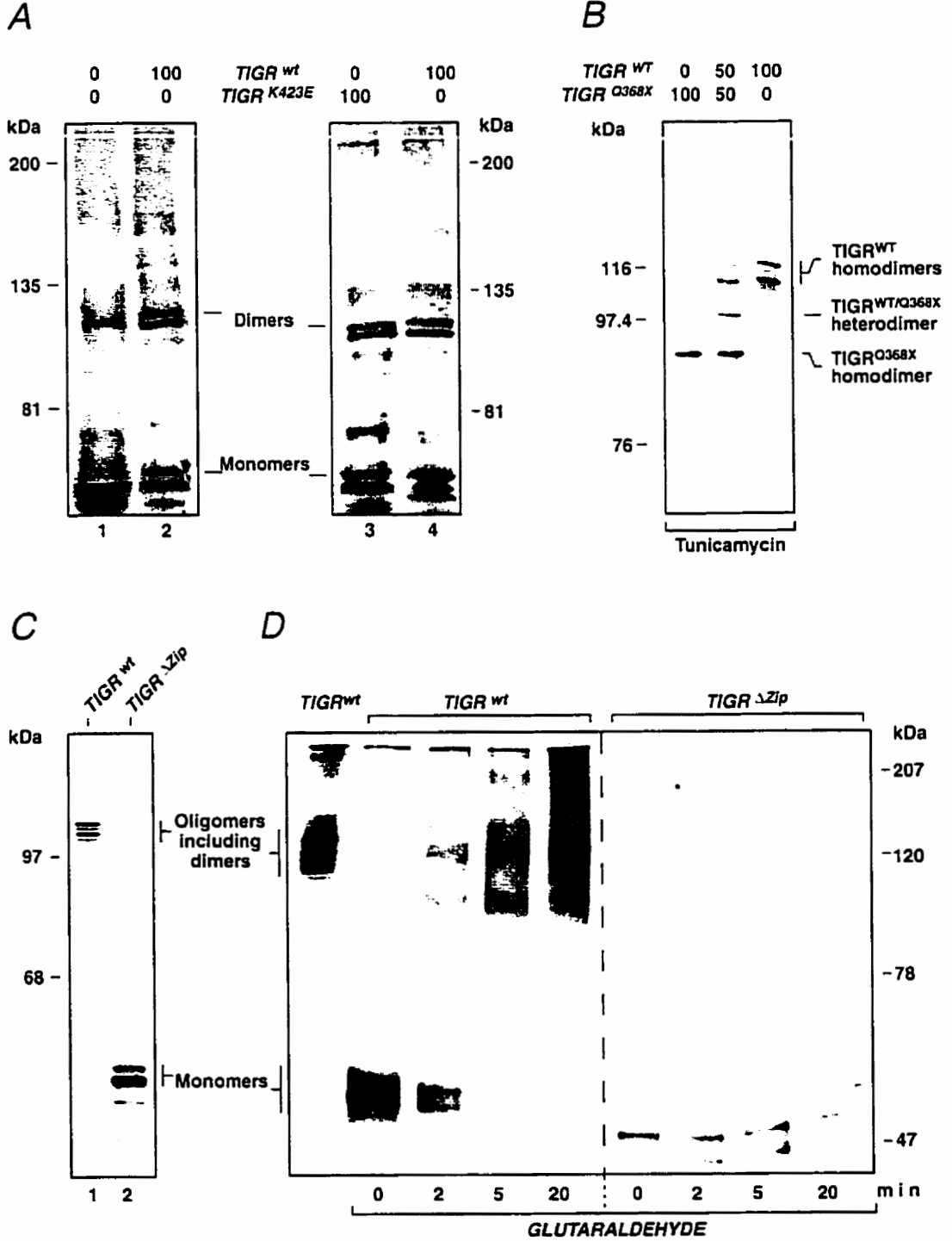
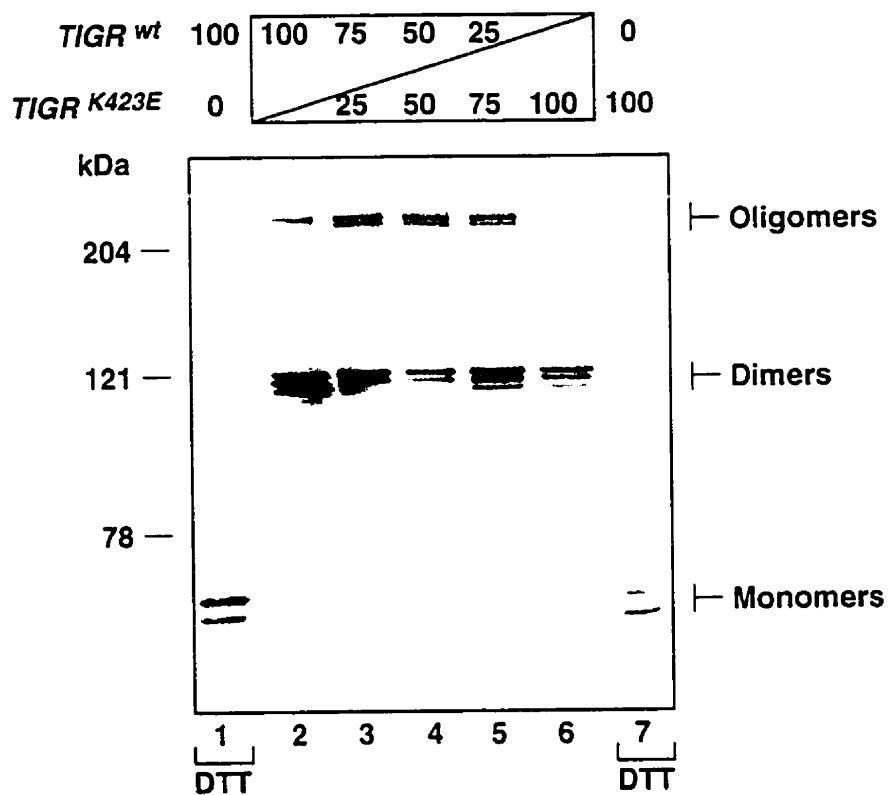
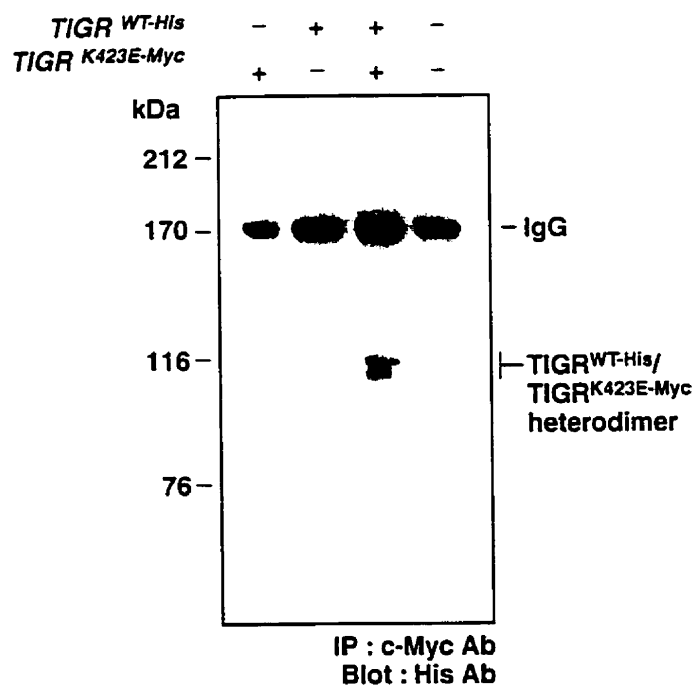


Figure 4

A



B



**Figure 1** Antibody detection of TIGR gene products. **a**, The schematic structure of human TIGR/MYOC proteins and diagrams of the clones used in this work. **b**, Human trabecular meshwork (HTM) tissues (lane 1) showing two high molecular mass complexes of TIGR, one at approximately 120 kDa thought to be dimers and one at 240 kDa. Under reducing conditions (lane 2), TIGR/MYOC were resolved into a 57 kDa doublet protein and a 60 kDa glycoprotein. Recombinant TIGR/MYOC (lane 3 and 4) and TIGR<sup>K423E</sup> (Lane 5) protein were also resolved with a similar pattern of migration under reducing and non-reducing conditions.

**Figure 2** Western blot analysis of post-translational glycosylation of TIGR/MYOC isoforms in COS-7 cells. **a**, Under non-reducing (lane 2) conditions, tunicamycin did not hinder oligomerization of TIGR but greatly decreased the amount of high molecular weight complexes. Inhibition of TIGR/MYOC glycosylation did not alter oligomerization of these complexes of 240 kDa (lane 3). **b**, The nature of the oligosaccharide link was determined by treating the cells with specific glycosidases. Treatment with O-glycosidase (lane 4) did not alter the migration, whereas PNGase F (lane 3) and tunicamycin (lane 2) removed all carbohydrates from the backbone. **c**, Similar results were observed when HTM tissues were treated. **d**, TIGR<sup>Asn57Tyr</sup> transfection revealed that the protein is N-glycosylated at Asn 57, the only potential site for this process (lane 4).



**Figure 3** TIGR/MYOC dimerization and oligomerization in COS-7 cells and in a reticulocyte lysate system. **a**, TIGR<sup>wt</sup> (left and right panel, lane 2). and TIGR<sup>K423E</sup> (right panel, lane 1) proteins were produced in a *in vitro* reticulocyte lysate system giving a monomer of about 57 kDa and a dimer of about 120 kDa. **b**, Transfection of TIGR<sup>wt</sup> (lane 1) and TIGR<sup>Q368X</sup> (lane 3) in presence of tunicamycin in COS-7 cells formed homodimers migrating respectively at 120 kDa and 80 kDa. When their respective cDNAs were co-transfected, they formed a heterodimer at about 98 kDa (lane 3). **c**, TIGR<sup>ΔZip</sup> (lane 2) in non-reducing conditions were migrated as a monomeric form at about 51 kDa. **d**, TIGR<sup>wt</sup> (left) and TIGR<sup>ΔZip</sup> (right) were transfected in COS cells and reduced protein lysates were treated with 0,01% glutaraldehyde for the time indicated.

**Figure 4** TIGR<sup>wt</sup> formed alone or in combination with TIGR<sup>K423E</sup> oligomer. **a**, Co-transfection with increased concentration of TIGR<sup>K423E</sup> cDNA and decreased concentration of TIGR<sup>wt</sup> construct were analysed by western blot. **b**, Co-transfection followed by a double immunoprecipitation (anti-Myc followed by anti-His) revealed that TIGR<sup>wt-His</sup> and TIGR<sup>K423E-Myc</sup> formed heterodimer complexes (lane 3). Lane 1 and 2 are transfections alone and lane 4 a control with no transfection.

## 2.4. Methods

**Construction of the expression vectors.** To create an eukaryotic expression vector encoding the wild-type *TIGR* cDNA, a 1831 bp *HindIII/NotI* fragment encompassing 36 bp of the 5' untranslated region, the full-length 1512 bp ORF and 188 bp of the 3' untranslated region of *TIGR*<sup>wt</sup> cDNA was purified from p*TIGR*<sup>wt</sup> and subcloned directionnaly into the *HindIII/NotI* sites of plasmid pRcCMV (Invitrogen). This new construct was named pRc-TIGR and produced high constitutive levels of mRNA due to the presence of CMV enhancer-promotor sequences. Full-length TIGR mutants were generated by site-directed mutagenesis of pRc-TIGR using the QuickChange™ mutagenesis kit (Stratagene). Tagged *TIGR* was made by using the overlap extension method in combinaison with polymerase chain reaction (Ho et al., 1989). Overlapping oligonucleotides used to construct *TIGR* tagged his (pRc-TIGR/his-tag) were 5'-TTT-TCC-TTT-TGC-GGC-CGC-TCA-ATT-CAG-ATC-CTC-TTC-TGA-GAT-GAG-TTT-TTG-TTC-CAT-CTT-GGA-GAG-CTT-GAT-GTC-ATA-AGT-3' and to construct *TIGR* tagged myc (pRc-TIGR/myc-tag) 5'-TTT-TCC-TTT-TGC-GGC-CGC-TCA-GTG-ATG-ATG-GTG-GTG-ATG-CAT-CTT-GGA-GAG-CTT-GAT-GTC-ATA-AGT-3' (overlapping sequence underlined). Flanking oligonucleotides used for construction of both his and myc were 5'-CCC-ACT-GCT-TAA-CTG-GCT-TAT-CG-3'. The resultant PCR product was cut with *HindIII* and *NotI* and cloned into pRc-TIGR cut with the same two restriction endonucleases. The tag was placed at the C-terminus of the *TIGR* cDNA just 5' of the stop codon (see Fig. 1). To clone pRc-TIGR/ $\Delta$ zip, two overlapping oligonucleotides, 5'-CGC-CTG-CTA-GCC-AGG-AGG-TTG-GAA-AGC-AGC-AGC-CAG-GAG-3' and 5'-GCA-GGG-CTA-GCC-CCT-CCT-GGG-TCT-CCT-GGG-GCC-TGG-CAG-3', located respectively just before and after the leucine

zipper, were used to create a 147-base pair deletion corresponding to the leucine zipper consensus sequence (see Fig.2). The PCR product was cut with *NheI* (new restriction site created at each end) and recircularized. All constructions were verified by sequencing the inserts bidirectionally between the *HindIII* and *NotI* sites.

**Transfections.** COS-7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)(Gibco BRL) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL) and antibiotics (100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Gibco BRL)) at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator. Cells were plated at a density of 1 x 10<sup>6</sup> cells per 100 x 20 mm dishes. Twenty-four h later, transient transfection was performed using the FUGENE 6 transfection (Roche) according to the manufacturer's protocol. Cells were lysed 48 h after transfection.

**Reticulocyte lysate transcription-translation coupled system.** *In vitro* transcription/translation was performed using the TNT<sup>®</sup> Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega) according to the manufacturer's protocol. As both pRc-TIGR and pRc-TIGR/K423E constructs carried the T7 RNA promoter, no additional DNA modifications were done before testing. Reactions contained 0.5  $\mu$ g of each plasmid and a complete amino acid mixture instead of <sup>35</sup>S-methionine. Canine Pancreatic Microsomal Membranes (Promega) (2.5  $\mu$ l (2EQ/ $\mu$ l)/ 25  $\mu$ l reaction) were added to the samples to optimize cotranslational processing. The samples were incubated for 90 min at 30 °C before protein analysis by Western blotting.

**Protein extraction, SDS-PAGE and Western blotting.** Confluent cells expressing wild-type or mutated *TIGR* cDNA from dishes were washed twice with PBS, scraped and dissolved in 1 ml of ice cold lysis buffer (10 mM tris-HCl; 0.25% (v/v) triton X-100, pH 7.5) containing the Complete™, EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail (Boehringer Mannheim). Human trabeculum meshwork (HTM) tissues were dissected from donor eyes and lysed in 0,5 ml of cold lysis buffer. Protein concentration was estimated, by Bradford's methods and dissolved in SDS-PAGE sample buffer and dithiothreitol (DTT; 0.1 mM) was added to selected. SDS-PAGE was performed according to Laemmli. Protein were transferred onto nitrocellulose (0.45  $\mu$ m pore size; Amersham Pharmacia Biotech), using a Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell apparatus (Bio-Rad). and incubated overnight at 4 °C with purified TIGR polyclonal antibodies (Polansky et al., 1997).

**Immunoprecipitation.** Forty-eight hours after transfection, cells were washed, scraped and solubilized in a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40 and 0.5% sodium deoxycholate and they were incubated with anti-myc antibodies (Invitrogen) overnight with protein G-agarose beads (Boehringer Mannheim) according to the manufacturer. The immune complexes were then subjected to SDS-PAGE.

**Cross-linking in the cell lysates.** Cell lysates were prepared as described above in presence of DTT (0.1 mM for 10 min at 4°C), and incubated in 0.01% glutaraldehyde, 50 mM triethanolamine (pH 8.2) and 100 mM NaCl, using 20-50  $\mu$ l of lysate of COS-7 cells transfected with DNA constructs, corresponding respectively to 20  $\mu$ g (pRc-TIGR and pRc-TIGR/K423E) and 70  $\mu$ g (pRc-TIGR/ $\Delta$ zip) of total proteins. Aliquots were removed at the times indicated, and the reaction was terminated by boiling the mixture in SDS-PAGE sample buffer. The samples were resolved by Western blotting as described above.

**Glycosidases and tunicamycin treatments.** To totally prevents the *N*-glycosylation *in vitro*, tunicamycin (1  $\mu$ g/ml medium) was added in the COS-7 culture medium 24 h after transfection. Respectively to hydrolyse the possible *O*-glycans or *N*-glycans present in TIGR, *O*-glycosidase (1mU/20  $\mu$ g proteins; incubated at 37 °C for 1 h; Boehringer Mannheim) or PNGase F (500U/20  $\mu$ g proteins; according to the manufacturer's protocol; New England BioLabs) was added into selected cell lysates.

## 2.5. References

**Abdella, P. M., Smith, P. K., and Royer, G. P. (1979).** *A new cleavable reagent for cross-linking and reversible immobilization of proteins.* Biochem Biophys Res Commun, **87**:734-42.

**Adam, M. F., Belmouden, A., Binisti, P., Brezin, A. P., Valtot, F., Bechetoille, A., Dascotte, J. C., Copin, B., Gomez, L., Chaventre, A., Bach, J. F., and Garchon, H. J. (1997).** *Recurrent mutations in a single exon encoding the evolutionarily conserved olfactomedin-homology domain of TIGR in familial open-angle glaucoma.* Hum Mol Genet, **6**:2091-7.

**Alward, W. L., Fingert, J. H., Coote, M. A., Johnson, A. T., Lerner, S. F., Junqua, D., Durcan, F. J., McCartney, P. J., Mackey, D. A., Sheffield, V. C., and Stone, E. M. (1998).** *Clinical features associated with mutations in the chromosome 1 open-angle glaucoma gene (GLC1A) [see comments].* N Engl J Med, **338**:1022-7.

**Alward, W. L., Johnson, A. T., Nishimura, D. Y., Sheffield, V. C., and Stone, E. M. (1996).** *Molecular genetics of glaucoma: current status.* J Glaucoma, **5**:276-84.

**Crick, F., and Orgel, L. (1964).** *The theory of inter-allelic complementation.* J Mol Biol, **8**:161-5.

**Fincham, J. (1966).** *Genetic complementation*, New York : Benjamin WA,

**Fingert, J. H., Heon, E., Liebmann, J. M., Yamamoto, T., Craig, J. E., Rait, J., Kawase, K., Hoh, S. T., Buys, Y. M., Dickinson, J., Hockey, R. R., Williams-Lyn,**

- D., Trope, G., Kitazawa, Y., Ritch, R., Mackey, D. A., Alward, W. L., Sheffield, V. C., and Stone, E. M. (1999).** *Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations.* Hum Mol Genet, **8**:899-905.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989).** *Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction [see comments].* Gene, **77**:51-9.
- Johnson, A. T., Richards, J. E., Boehnke, M., Stringham, H. M., Herman, S. B., Wong, D. J., and Lichter, P. R. (1996b).** *Clinical phenotype of juvenile-onset primary open-angle glaucoma linked to chromosome 1q.* Ophthalmology, **103**:808-14.
- Johnson, W. G. (1980).** *Metabolic interference and the + - heterozygote. a hypothetical form of simple inheritance which is neither dominant nor recessive.* Am J Hum Genet, **32**:374-86.
- Kennan, A. M., Mansergh, F. C., Fingert, J. H., Clark, T., Ayuso, C., Kenna, P. F., Humphries, P., and Farrar, G. J. (1998).** *A novel Asp380Ala mutation in the GLC1A/myocilin gene in a family with juvenile onset primary open angle glaucoma.* J Med Genet, **35**:957-60.
- Kubota, R., Noda, S., Wang, Y., Minoshima, S., Asakawa, S., Kudoh, J., Mashima, Y., Oguchi, Y., and Shimizu, N. (1997).** *A novel myosin-like protein (myocilin) expressed in the connecting cilium of the photoreceptor: molecular cloning, tissue expression, and chromosomal mapping.* Genomics, **41**:360-9.
- Lichter, P. R. (1994).** *Genetic clues to glaucoma's secrets. The L Edward Jackson Memorial Lecture. Part 2.* Am J Ophthalmol, **117**:706-27.

**Mansergh, F. C., Kenna, P. F., Ayuso, C., Kiang, A. S., Humphries, P., and Farrar, G. J. (1998).** *Novel mutations in the TIGR gene in early and late onset open angle glaucoma.* Hum Mutat, **11**:244-51.

**Morissette, J., Clepet, C., Moisan, S., Dubois, S., Winstall, E., Vermeeren, D., Nguyen, T. D., Polansky, J. R., Cote, G., Anctil, J. L., Amyot, M., Plante, M., Falardeau, P., and Raymond, V. (1998).** *Homozygotes carrying an autosomal dominant TIGR mutation do not manifest glaucoma [letter].* Nat Genet, **19**:319-21.

**Nguyen, T. D., Chen, P., Huang, W. D., Chen, H., Johnson, D., and Polansky, J. R. (1998).** *Gene structure and properties of TIGR, an olfactomedin-related glycoprotein cloned from glucocorticoid-induced trabecular meshwork cells.* J Biol Chem, **273**:6341-50.

**Polansky, J. R., Fauss, D. J., Chen, P., Chen, H., Lutjen-Drecoll, E., Johnson, D., Kurtz, R. M., Ma, Z. D., Bloom, E., and Nguyen, T. D. (1997).** *Cellular pharmacology and molecular biology of the trabecular meshwork inducible glucocorticoid response gene product.* Ophthalmologica, **211**:126-39.

**Raymond, V. (1997).** *Molecular genetics of the glaucomas: mapping of the first five "GLC" loci [editorial; comment].* Am J Hum Genet, **60**:272-7.

**Richards, J. E., Ritch, R., Lichter, P. R., Rozsa, F. W., Stringham, H. M., Caronia, R. M., Johnson, D., Abundo, G. P., Willcockson, J., Downs, C. A., Thompson, D. A., Musarella, M. A., Gupta, N., Othman, M. I., Torrez, D. M., Herman, S. B., Wong, D. J., Higashi, M., and Boehnke, M. (1998).** *Novel trabecular meshwork*



*inducible glucocorticoid response mutation in an eight-generation juvenile-onset primary open-angle glaucoma pedigree. Ophthalmology, 105:1698-707.*

**Rozsa, F. W., Shimizu, S., Lichter, P. R., Johnson, A. T., Othman, M. I., Scott, K., Downs, C. A., Nguyen, T. D., Polansky, J., and Richards, J. E. (1998).** *GLC1A mutations point to regions of potential functional importance on the TIGR/MYOC protein. Mol Vis, 4:20.*

**Ryan, S. G., Chance, P. F., Zou, C. H., Spinner, N. B., Golden, J. A., and Smietana, S. (1997).** *Epilepsy and mental retardation limited to females: an X-linked dominant disorder with male sparing [see comments]. Nat Genet, 17:92-5.*

**Sarfarazi, M. (1997).** *Recent advances in molecular genetics of glaucomas. Hum Mol Genet, 6:1667-77.*

**Shields, M., Ritch, R., and Krupin, T. (1996).** "Classifications of the glaucomas." *The glaucomas, R. Ritch, M. Shields, and T. Krupin, eds., Mosby, St Louis, 717-725.*

**Stone, E. M., Fingert, J. H., Alward, W. L. M., Nguyen, T. D., Polansky, J. R., Sunden, S. L. F., Nishimura, D., Clark, A. F., Nystuen, A., Nichols, B. E., Mackey, D. A., Ritch, R., Kalenak, J. W., Craven, E. R., and Sheffield, V. C. (1997).** *Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma [see comments]. Science, 275:668-70.*

**Thylefors, B., and Negrel, A. D. (1994).** *The global impact of glaucoma. Bull World Health Organ, 72:323-6.*

- Tong, Q., Xing, S., and Jhiang, S. M. (1997).** *Leucine zipper-mediated dimerization is essential for the PTC1 oncogenic activity.* J Biol Chem, **272**:9043-7.
- Wiggs, J. L., Allingham, R. R., Vollrath, D., Jones, K. H., De La Paz, M., Kern, J., Patterson, K., Babb, V. L., Del Bono, E. A., Broomer, B. W., Pericak-Vance, M. A., and Haines, J. L. (1998).** *Prevalence of mutations in TIGR/Myocilin in patients with adult and juvenile primary open-angle glaucoma [letter].* Am J Hum Genet, **63**:1549-52.
- Wirtz, M. K., Samples, J. R., Rust, K., Lie, J., Nordling, L., Schilling, K., Acott, T. S., and Kramer, P. L. (1999).** *GLC1F, a new primary open-angle glaucoma locus, maps to 7q35-q36.* Arch Ophthalmol, **117**:237-41.

### CHAPITRE III CONCLUSION GÉNÉRALE

La mutation K423E associée au troisième exon du gène *TIGR/MYOC* est responsable d'un glaucome qui ségrègue selon un mode de dominance spécifique à l'hétérozygote. Afin de supporter ce mode de transmission génétique qui se comporte comme une mutation dominante négative, nous avons dû caractériser par immunobuvardage le produit du gène. Ce mode de transmission génétique qui a déjà été observé chez les organismes inférieurs, s'applique lorsque l'interaction entre les produits des deux allèles est possible.

Comme le démontrent les résultats obtenus avec les réticulocytes, deux polypeptides *TIGR/MYOC* s'associent pour former des homodimères de 120 kDa. Des complexes de très haut poids moléculaire à 240 kDa sont également observés dans les tissus oculaires et lors de transfections dans les cellules Cos-7. La structure responsable de ces interactions entre polypeptides est un motif de glissière de leucines. Ce motif forme une hélice alpha apolaire qui contient huit résidus leucines et 5 résidus arginines alignés de part et d'autre de l'hélice. Ce type de motif a été cité dans la littérature comme permettant l'interaction entre polypeptides. En éliminant ce motif de la protéine *TIGR/MYOC*, la formation des dimères et des complexes de haut poids moléculaire n'est plus possible. Nous possédons donc maintenant une protéine qui a les caractéristiques essentielles à l'interférence métabolique que nous proposons.

En condition réductrice, la protéine se retrouve sous forme de monomères migrant à 55 et 63 kDa. Dans le trabéculum humain, un doublet est observé à 55 kDa et résulte de l'utilisation d'un site de clivage situé entre les acides aminés 32-33 (Nguyen et al., 1998). Or, dans notre système, nous ne retrouvons qu'une seule bande. Ainsi, dans les cellules Cos-7, le site de clivage n'est pas utilisé. La bande de 63 kDa est une forme glycosilée du doublet des peptides observés à 55 kDa. Nous avons identifié la glycosilation comme étant de type N sur l'asparagine 57 par des digestions enzymatiques spécifiques et par mutagénèse dirigée. La protéine est probablement stabilisée par des ponts disulfures extra-moléculaires puisqu'elle résiste à de fortes concentrations de SDS.

Cette glycosilation n'est pas essentielle à la dimérisation de la protéine et la formation des complexes de haut poids moléculaire. Cependant, lorsque les cellules sont traitées avec de la tunicamycine, il n'y a plus formation de complexes à 240 kDa. Ce qui nous suggère que les protéines impliquées dans la formation des complexes de haut poids moléculaire doivent être N-glycosilées. Cette caractéristique sera intéressante pour faire l'identification des protéines présentes dans ce complexe. L'immunoprécipitation ou encore une purification de la protéine TIGR/MYOC permettraient d'identifier les protéines composant ce complexe de 240 kDa.

Lors de transfection TIGR<sup>K423E</sup>, il y a formation de dimères comme pour la protéine sauvage. Nous pouvons donc croire qu'il est possible qu'il y ait interaction entre les

deux polypeptides. Par co-transfection de l'ADNc de TIGR<sup>wt</sup> et TIGR<sup>K423E</sup>, ceux-ci forment effectivement des dimères. La formation d'hétérodimères entre deux polypeptides est-elle possible? En effet, lors d'immunoprécipitation à l'aide d'un système à double épitopes, il y a formation d'un complexe TIGR<sup>wt</sup>/TIGR<sup>K423E</sup>. Ce complexe *in vivo*, c'est-à-dire chez les glaucomateux, ne serait pas fonctionnel dû à un effet dominant négatif de la mutation K423E sur le peptide sauvage. Pour le complexe TIGR<sup>K423E</sup>/TIGR<sup>K423E</sup>, il serait tout à fait fonctionnel. Cela explique pourquoi nous avons quatre individus homozygotes, pour cette mutation, qui ne souffrent pas de glaucome. Cette mutation a pour effet de nuire au complexe dimérique à l'état d'hétérozygotie. Il s'agit d'un modèle de complémentation homoallélique qui existe chez les organismes inférieurs et qui a été proposé par Crick en 1964 (Crick and Orgel, 1964).

D'autres résultats avec une protéine tronquée, la Q368X, appuient ce principe de formation d'hétérodimères. La protéine TIGR<sup>Q368X</sup> qui a un poids moléculaire de 41 kDa forme, en co-transfection, un complexe de 80 kDa qui correspond à un hétérodimère TIGR<sup>wt</sup>/TIGR<sup>Q368X</sup>. Même si cette mutation permet la formation d'hétérodimères *in vitro*, il n'existe pas d'homozygote connu à ce jour pour cette mutation. Nous pouvons cependant croire que les gens seraient probablement atteints de glaucome puisque la protéine est tronquée de 137 acides aminés. Toutefois, cette mutation se comporte anormalement, c'est-à-dire qu'il existe des malades porteurs de l'haplotype complet sans avoir la mutation Q368X. D'autres par

contre, possèdent cette mutation et l'haplotype complet sans être malades (Raymond *et al.* données non publiées).

Bien que les dernières publications associent la protéine TIGR/MYOC aux microtubules, sa fonction demeure toujours inconnue. Nos résultats reposent donc sur une base strictement structurale de la protéine. Comme perspective, il serait intéressant de vérifier si les hétérodimères TIGR<sup>wt</sup>/TIGR<sup>K423E</sup> sont non-fonctionnels et si les homodimères TIGR<sup>K423E</sup>/TIGR<sup>K423E</sup> sont fonctionnels. Cette expérience sera possible seulement lorsque nous connaîtrons la fonction de *TIGR/MYOC* au niveau du trabéculum. Une telle explication confirmerait le modèle de complémentation homoallélique que nous proposons. Comme fonction hypothétique, la protéine TIGR/MYOC serait impliquée au niveau du transport des vésicules intracellulaires ou encore dans la réorganisation des structures du cytosquelette. La nature exacte des composantes du complexe de haut poids moléculaire reste également à être définie. Pour ce faire, l'isolation du complexe s'avère essentiel afin d'identifier par des techniques telles le spectre de masse ou le séquençage en N-terminal, les protéines impliquées dans cette structure quaternaire. Sa caractérisation pourrait nous aider à élucider la fonction de TIGR/MYOC et demeure fondamentale dans la compréhension de la relation entre le gène *TIGR/MYOC* et le glaucome primaire à angle ouvert.

## RÉFÉRENCES

**Adam, M. F., Belmouden, A., Binisti, P., Brezin, A. P., Valtot, F., Bechetoille, A., Dascotte, J. C., Copin, B., Gomez, L., Chaventre, A., Bach, J. F., and Garchon, H. J. (1997).** *Recurrent mutations in a single exon encoding the evolutionarily conserved olfactomedin-homology domain of TIGR in familial open-angle glaucoma.* Hum Mol Genet, **6**:2091-7.

**Alward, W. L., Fingert, J. H., Coote, M. A., Johnson, A. T., Lerner, S. F., Junqua, D., Durcan, F. J., McCartney, P. J., Mackey, D. A., Sheffield, V. C., and Stone, E. M. (1998).** *Clinical features associated with mutations in the chromosome 1 open-angle glaucoma gene (GLC1A) [see comments].* N Engl J Med, **338**:1022-7.

**Anderson, D. A. (1995).** "Glaucoma, its terminology and fundamental nature." Optic nerve in glaucoma, S. M. Drance and D. A. Anderson, eds., Kugler, Amsterdam, 1-14.

**Atkinson, S. J., and Stewart, M. (1991).** *Molecular basis of myosin assembly: coiled-coil interactions and the role of charge periodicities.* J Cell Sci Suppl, **14**:7-10.

**Chakerian, A. E., Tesmer, V. M., Manly, S. P., Brackett, J. K., Lynch, M. J., Hoh, J. T., and Matthews, K. S. (1991).** *Evidence for leucine zipper motif in lactose repressor protein.* J Biol Chem, **266**:1371-4.

**CNIB. (1990).** *Statistical information on the the client population of the CNIB,* Canadian National Institute for the Blind.,

**Cote, G., Audet, J., Dugre, J., and Perron, J. (1968).** *[A study of familial glaucoma].* Can J Ophthalmol, **3**:330-6.

- Craig, J. E., and Mackey, D. A. (1999).** *Glaucoma genetics: where are we? Where will we go?* *Curr Opin Ophthalmol*, **10**:126-34.
- Crick, F., and Orgel, L. (1964).** *The theory of inter-allelic complementation.* *J Mol Biol*, **8**:161-5.
- Danyluk, A. W., and Paton, D. (1992).** *Diagnosis and management of glaucoma.* *Clin Symp*, **43**:2-32.
- Diamond, M. I., Miner, J. N., Yoshinaga, S. K., and Yamamoto, K. R. (1990).** *Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element.* *Science*, **249**:1266-72.
- Fincham, J. (1966).** *Genetic complementation*, New York : Benjamin WA,
- Fingert, J. H., Ying, L., Swiderski, R. E., Nystuen, A. M., Arbour, N. C., Alward, W. L., Sheffield, V. C., and Stone, E. M. (1998).** *Characterization and comparison of the human and mouse GLC1A glaucoma genes.* *Genome Res*, **8**:377-84.
- Flanagan, J. G. (1998).** *Glaucoma update: epidemiology and new approaches to medical management.* *Ophthalmic Physiol Opt*, **18**:126-32.
- Hubbard, S. C., and Ivatt, R. J. (1981).** *Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides.* *Annu Rev Biochem*, **50**:555-83.
- Johnson, A., Alward, W., and Sheffield V, S. E. (1996a).** *Glaucoma*, R. Ritch, M. Shields, and T. Krupin, eds., Mosby, St Louis, 39-54.



**Johnson, A. T., Richards, J. E., Boehnke, M., Stringham, H. M., Herman, S. B., Wong, D. J., and Lichter, P. R. (1996b).** *Clinical phenotype of juvenile-onset primary open-angle glaucoma linked to chromosome 1q.* Ophthalmology, **103**:808-14.

**Johnson, W. G. (1980).** *Metabolic interference and the + - heterozygote. a hypothetical form of simple inheritance which is neither dominant nor recessive.* Am J Hum Genet, **32**:374-86.

**Kaufman, P. L., and Mittag, T. W. (1994).** "Glaucoma." Textbook of ophthalmology, S. M. Podos and M. Yanoff, eds., Mosby, St Louis, 1.1-1.78.

**Kubota, R., Kudoh, J., Mashima, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Hejtmancik, J. F., Oguchi, Y., and Shimizu, N. (1998).** *Genomic organization of the human myocilin gene (MYOC) responsible for primary open angle glaucoma (GLC1A).* Biochem Biophys Res Commun, **242**:396-400.

**Kubota, R., Noda, S., Wang, Y., Minoshima, S., Asakawa, S., Kudoh, J., Mashima, Y., Oguchi, Y., and Shimizu, N. (1997).** *A novel myosin-like protein (myocilin) expressed in the connecting cilium of the photoreceptor: molecular cloning, tissue expression, and chromosomal mapping.* Genomics, **41**:360-9.

**Leske, M. C. (1983).** *The epidemiology of open-angle glaucoma: a review.* Am J Epidemiol, **118**:166-91.

**Lodish, H. F., and Darnell, J. E. (1995).** *Molecular cell biology*, 3rd, Scientific American Books : Distributed by W.H. Freeman and Co., New York, 1 (various pagings).

- Mansergh, F. C., Kenna, P. F., Ayuso, C., Kiang, A. S., Humphries, P., and Farrar, G. J. (1998).** *Novel mutations in the TIGR gene in early and late onset open angle glaucoma.* Hum Mutat, **11**:244-51.
- Mertts, M., Garfield, S., Tanemoto, K., and Tomarev, S. I. (1999).** *Identification of the region in the N-terminal domain responsible for the cytoplasmic localization of Myoc/Tigr and its association with microtubules.* Lab Invest, **79**:1237-45.
- Meyer, A., Bechetoille, A., Valtot, F., Dupont de Dinechin, S., Adam, M. F., Belmouden, A., Brezin, A. P., Gomez, L., Bach, J. F., and Garchon, H. J. (1996).** *Age-dependent penetrance and mapping of the locus for juvenile and early-onset open-angle glaucoma on chromosome 1q (GLC1A) in a French family.* Hum Genet, **98**:567-71.
- Morissette, J., Clepet, C., Moisan, S., Dubois, S., Winstall, E., Vermeeren, D., Nguyen, T. D., Polansky, J. R., Cote, G., Anctil, J. L., Amyot, M., Plante, M., Falardeau, P., and Raymond, V. (1998).** *Homozygotes carrying an autosomal dominant TIGR mutation do not manifest glaucoma [letter].* Nat Genet, **19**:319-21.
- Morissette, J., Cote, G., Anctil, J. L., Plante, M., Amyot, M., Heon, E., Trope, G. E., Weissenbach, J., and Raymond, V. (1995).** *A common gene for juvenile and adult-onset primary open-angle glaucomas confined on chromosome 1q [see comments].* Am J Hum Genet, **56**:1431-42.
- Nguyen, T. D., Chen, P., Huang, W. D., Chen, H., Johnson, D., and Polansky, J. R. (1998).** *Gene structure and properties of TIGR, an olfactomedin-related*

*glycoprotein cloned from glucocorticoid-induced trabecular meshwork cells.* J Biol Chem, **273**:6341-50.

**Ortego, J., Escribano, J., and Coca-Prados, M.** (1997). *Cloning and characterization of subtracted cDNAs from a human ciliary body library encoding TIGR, a protein involved in juvenile open angle glaucoma with homology to myosin and olfactomedin.* FEBS Lett, **413**:349-53.

**Osborne, N. N., Ugarte, M., Chao, M., Chidlow, G., Bae, J. H., Wood, J. P., and Nash, M. S.** (1999a). *Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma.* Surv Ophthalmol, **43 Suppl 1**:S102-28.

**Osborne, N. N., Wood, J. P., Chidlow, G., Bae, J. H., Melena, J., and Nash, M. S.** (1999b). *Ganglion cell death in glaucoma: what do we really know?* Br J Ophthalmol, **83**:980-986.

**Polansky, J., Palmberg, P., Matulich, D., Lan, N., Hajek, S., Hajek, A., Becker, B., and Baxter, J.** (1985). *Cellular sensitivity to glucocorticoids in patients with POAG. Steroid receptors and responses in cultured skin fibroblasts.* Invest Ophthalmol Vis Sci, **26**:805-9.

**Polansky, J. R., Fauss, D. J., Chen, P., Chen, H., Lutjen-Drecoll, E., Johnson, D., Kurtz, R. M., Ma, Z. D., Bloom, E., and Nguyen, T. D.** (1997). *Cellular pharmacology and molecular biology of the trabecular meshwork inducible glucocorticoid response gene product.* Ophthalmologica, **211**:126-39.

- Polansky, J. R., Kurtz, R. M., Alvarado, J. A., Weinreb, R. N., and Mitchell, M. D. (1989).** *Eicosanoid production and glucocorticoid regulatory mechanisms in cultured human trabecular meshwork cells.* *Prog Clin Biol Res*, **312**:113-38.
- Polansky, J. R., and Nguyen, T. D. (1998).** *The TIGR gene, pathogenic mechanisms, and other recent advances in glaucoma genetics.* *Curr Opin Ophthalmol*, **9**:15-23.
- Quigley, H. A., Hohman, R. M., Addicks, E. M., Massof, R. W., and Green, W. R. (1983).** *Morphologic changes in the lamina cribrosa correlated with neural loss in open-angle glaucoma.* *Am J Ophthalmol*, **95**:673-91.
- Raymond, V. (1997).** *Molecular genetics of the glaucomas: mapping of the first five "GLC" loci [editorial; comment].* *Am J Hum Genet*, **60**:272-7.
- Sheffield, V. C., Stone, E. M., Alward, W. L., Drack, A. V., Johnson, A. T., Streb, L. M., and Nichols, B. E. (1993).** *Genetic linkage of familial open angle glaucoma to chromosome 1q21-q31.* *Nat Genet*, **4**:47-50.
- Shields, M., Ritch, R., and Krupin, T. (1996).** "Classifications of the glaucomas." *The glaucomas*, R. Ritch, M. Shields, and T. Krupin, eds., Mosby, St Louis, 717-725.
- Snyder, D. A., Rivers, A. M., Yokoe, H., Menco, B. P., and Anholt, R. R. (1991).** *Olfactomedin: purification, characterization, and localization of a novel olfactory glycoprotein.* *Biochemistry*, **30**:9143-53.

- Stoilova, D., Child, A., Brice, G., Crick, R. P., Fleck, B. W., and Sarfarazi, M.** (1997). *Identification of a new 'TIGR' mutation in a family with juvenile-onset primary open angle glaucoma.* *Ophthalmic Genet*, **18**:109-18.
- Stoilova, D., Child, A., Brice, G., Desai, T., Barsoum-Homsy, M., Ozdemir, N., Chevrette, L., Adam, M. F., Garchon, H. J., Pitts Crick, R., and Sarfarazi, M.** (1998). *Novel TIGR/MYOC mutations in families with juvenile onset primary open angle glaucoma.* *J Med Genet*, **35**:989-92.
- Stone, E. M., Fingert, J. H., Alward, W. L. M., Nguyen, T. D., Polansky, J. R., Sunden, S. L. F., Nishimura, D., Clark, A. F., Nystuen, A., Nichols, B. E., Mackey, D. A., Ritch, R., Kalenak, J. W., Craven, E. R., and Sheffield, V. C.** (1997). *Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma [see comments].* *Science*, **275**:668-70.
- Subramani, S.** (1993). *Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle.* *Annu Rev Cell Biol*, **9**:445-78.
- Sunden, S. L., Alward, W. L., Nichols, B. E., Rokhlina, T. R., Nystuen, A., Stone, E. M., and Sheffield, V. C.** (1996). *Fine mapping of the autosomal dominant juvenile open angle glaucoma (GLC1A) region and evaluation of candidate genes.* *Genome Res*, **6**:862-9.
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., and Brunger, A. T.** (1998). *Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution [see comments].* *Nature*, **395**:347-53.

- Suzuki, Y., Shirato, S., Taniguchi, F., Ohara, K., Nishimaki, K., and Ohta, S.** (1997). *Mutations in the TIGR gene in familial primary open-angle glaucoma in Japan [letter]*. *Am J Hum Genet*, **61**:1202-4.
- Swiderski, R. E., Ying, L., Cassell, M. D., Alward, W. L., Stone, E. M., and Sheffield, V. C.** (1999). *Expression pattern and in situ localization of the mouse homologue of the human MYOC (GLC1A) gene in adult brain*. *Brain Res Mol Brain Res*, **68**:64-72.
- Tomarev, S. I., Tamm, E. R., and Chang, B.** (1998). *Characterization of the mouse Myoc/Tigr gene*. *Biochem Biophys Res Commun*, **245**:887-93.
- Treisman, J. E., Lai, Z. C., and Rubin, G. M.** (1995). *Shortsighted acts in the decapentaplegic pathway in Drosophila eye development and has homology to a mouse TGF-beta-responsive gene*. *Development*, **121**:2835-45.
- Trope, G. E.** (1997). *Glaucoma : a patient's guide to the disease*, University of Toronto Press, Toronto, xviii, 66.
- Vogel, R., Crick, R. P., Newson, R. B., Shipley, M., Blackmore, H., and Bulpitt, C. J.** (1990). *Association between intraocular pressure and loss of visual field in chronic simple glaucoma [see comments]*. *Br J Ophthalmol*, **74**:3-6.
- von Heijne, G.** (1983). *Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites*. *Eur J Biochem*, **133**:17-21.
- Wilson, R., and Martone, J.** (1996). "Epidemiology of chronic open-angle glaucoma." *The glaucomas*, R. Ritch, M. Shields, and T. Krupin, eds., Mosby, St Louis.

**Wordinger, R. J., and Clark, A. F. (1999).** *Effects of glucocorticoids on the trabecular meshwork: towards a better understanding of glaucoma.* *Prog Retin Eye Res*, **18**:629-67.

## ANNEXE A : SÉQUENCE CODANTE DE *TIGR/MYOC*

+1

ATG AGG TTC TTC TGT GCA CGT TGC TGC AGC TTT GGG CCT GAG ATG  
 met arg phe phe cys ala arg cys cys ser phe gly pro glu met  
 +1

CCA GCT GTC CAG CTG CTG CTT CTG GCC TGC CTG GTG TGG GAT GTG  
 pro ala val gln leu leu leu leu ala cys leu val trp asp val

91

GGG GCC AGG ACA GCT CAG CTC AGG AAG GCC AAT GAC CAG AGT GGC  
 gly ala arg thr ala gln leu arg lys ala asn asp gln ser gly  
 31

CGA TGC CAG TAT ACC TTC AGT GTG GCC AGT CCC AAT GAA TCC AGC  
 arg cys gln tyr thr phe ser val ala ser pro asn glu ser ser

181

TGC CCA GAG CAG AGC CAG GCC ATG TCA GTC ATC CAT AAC TTA CAG  
 cys pro glu gln ser gln ala met ser val ile his asn leu gln  
 61

AGA GAC AGC AGC ACC CAA CGC TTA GAC CTG GAG GCC ACC AAA GCT  
 arg asp ser ser thr gln arg leu asp leu glu ala thr lys ala

271

CGA CTC AGC TCC CTG GAG AGC CTC CTC CAC CAA TTG ACC TTG GAC  
 arg leu ser ser leu glu ser leu leu his gln leu thr leu asp  
 91



CAG GCT GCC AGG CCC CAG GAG ACC CAG GAG GGG CTG CAG AGG GAG  
gln ala ala arg pro gln glu thr gln glu gly leu gln arg glu

361

CTG GGC ACC CTG AGG CGG GAG CGG GAC CAG CTG GAA ACC CAA ACC  
leu gly thr leu arg arg glu arg asp gln leu glu thr gln thr  
121

AGA GAG TTG GAG ACT GCC TAC AGC AAC CTC CTC CGA GAC AAG TCA  
arg glu leu glu thr ala tyr ser asn leu leu arg asp lys ser

451

GTT CTG GAG GAA GAG AAG AAG CGA CTA AGG CAA GAA AAT GAG AAT  
val leu glu glu glu lys lys arg leu arg gln glu asn glu asn  
151

CTG GCC AGG AGG TTG GAA AGC AGC AGC CAG GAG GTA GCA AGG CTG  
leu ala arg arg leu glu ser ser ser gln glu val ala arg leu

541

AGA AGG GGC CAG TGT CCC CAG ACC CGA GAC ACT GCT CGG GCT GTG  
arg arg gly gln cys pro gln thr arg asp thr ala arg ala val  
181

CCA CCA GGC TCC AGA GAA GTT TCT ACG TGG AAT TTG GAC ACT TTG  
pro pro gly ser arg glu val ser thr trp asn leu asp thr leu

631

GCC TTC CAG GAA CTG AAG TCC GAG CTA ACT GAA GTT CCT GCT TCC  
ala phe gln glu leu lys ser glu leu thr glu val pro ala ser  
211

CGA ATT TTG AAG GAG AGC CCA TCT GGC TAT CTC AGG AGT GGA GAG  
gly ile leu lys glu ser pro ser gly tyr leu arg ser gly glu

721

GGA GAC ACC GGA TGT GGA GAA CTA GTT TGG GTA GGA GAG CCT CTC  
gly asp thr gly cys gly glu leu val trp val gly glu pro leu  
241

ACG CTG AGA ACA GCA GAA ACA ATT ACT GGC AAG TAT GGT GTG TGG  
thr leu arg thr ala glu thr ile thr gly lys tyr gly val trp

811

ATG CGA GAC CCC AAG CCC ACC TAC CCC TAC ACC CAG GAG ACC ACG  
met arg asp pro lys pro thr tyr pro tyr thr gln glu thr thr  
271

TGG AGA ATC GAC ACA GTT GGC ACG GAT GTC CGC CAG GTT TTT GAG  
trp arg ile asp thr val gly thr asp val arg phe val phe glu

901

TAT GAC CTC ATC AGC CAG TTT ATG CAG GGC TAC CCT TCT AAG GTT  
tyr asp leu ile ser gln phe met gln gly tyr pro ser lys val  
301

CAC ATA CTG CCT AGG CCA CTG GAA AGC ACG GGT GCT GTG GTG TAC  
his ile leu pro arg pro leu glu ser thr gly ala val val tyr

991

TCG GGG AGC CTC TAT TTC CAG GGC GCT GAG TCC AGA ACT GTC ATA  
ser gly ser leu tyr phe gln gly ala glu ser arg thr val ile  
331

AGA TAT GAG CTG AAT ACC GAG ACA GTG AAG GCT GAG AAG GAA ATC  
arg tyr glu leu asn thr glu thr val lys ala glu lys glu ile

1081

CCT GGA GCT GGC TAC CAC GGA CAG TTC CCG TAT TCT TGG GGT GGC  
pro gly ala gly tyr his gly gln phe pro tyr ser trp gly gly  
361

TAC ACG GAC ATT GAC TTG GCT GTG GAT GAA GCA GGC CTC TGG GTC  
tyr thr asp ile asp leu ala val asp glu ala gly leu trp val

1171

ATT TAC AGC ACC GAT GAG GCC AAA GGT GCC ATT GTC CTC TCC AAA  
ile tyr ser thr asp glu ala lys gly ala ile val leu ser lys  
391

CTG AAC CCA GAG AAT CTG GAA CTC GAA CAA ACC TGG GAG ACA AAC  
leu asn pro glu asn leu glu leu glu gln thr trp glu thr asn

1261

ATC CGT AAG CAG TCA GTC GCC AAT GCC TTC ATC ATC TGT GGC ACC  
ile arg lys gln ser val ala asn ala phe ile ile cys gly thr  
3. 423

TTG TAC ACC GTC AGC AGC TAC ACC TCA GCA GAT GCT ACC GTC AAC  
leu tyr thr val ser ser tyr thr ser ala asp ala thr val asn

1351

TTT GCT TAT GAC ACA GGC ACA GGT ATC AGC AAG ACC CTG ACC ATC  
phe ala tyr asp thr gly thr gly ile ser lys thr leu thr ile  
451

CCA TTC AAG AAC CGC TAT AAG TAC AGC AGC ATG ATT GAC TAC AAC  
pro phe lys asn arg tyr lys tyr ser ser met ile asp tyr asn

1441

CCC CTG GAG AAG AAG CTC TTT GCC TGG GAC AAC TTG AAC ATG GTC  
pro leu glu lys lys leu phe ala trp asp asn leu asn met val  
481

1486

ACT TAT GAC ATC AAG CTC TCC AAG ATG TGA  
thr tyr asp ile lys leu ser lys met  
496