

Técnicas de Biología Molecular aplicadas al Diagnóstico clínico. Distrofia muscular y talasemias

Pña Gallano. Unitat de Genètica Molecular.
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

Técnicas de biología molecular aplicadas al diagnóstico clínico: la distrofia muscular de Duchenne/Becker como modelo

La miopatía descrita por Duchenne de Boulogne hacia 1860 (1) o Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) es la enfermedad hereditaria ligada al cromosoma X más frecuente en el hombre, ya que afecta a 1 de cada 3.500 varones que nacen.

Está caracterizada por una degeneración progresiva de las fibras musculares esqueléticas que se manifiesta a la edad de 2-4 años. A la edad de 10 años la afectación de las extremidades inferiores es total, y aboca irreversiblemente en una muerte temprana (hacia la edad de 18-20 años) debido a una insuficiencia respiratoria y cardíaca. Una tercera parte de los casos resultan ser formas esporádicas o aisladas debidas a neomutaciones.

Al lado de esta forma muy severa, la Distrofia Muscular de Becker (DMB) descrita por Becker un siglo más tarde (2) se presenta como una forma más tardía, que evoluciona más lentamente y que se hace invalidante a lo largo de la vida adulta. La prevalencia de la DMB es 10 veces menor que la de la DMD.

La localización del gen responsable para ambas distrofias musculares se sitúa en el brazo corto del cromosoma X: Xp21 (3). Es hasta la actualidad el mayor gen descrito, alrededor de 74 exones repartidos en 2.300 kb, que codifica un mRNA de 14 kb, el cual se traduce en una proteína de 427 kdaltons (3.685 aa) llamada distrofina (4).

Hasta el año 1987 en que sólo se disponía de marcadores intragénicos y extragénicos al gen DMD/DMB, se estimaba que un 6% de los afectados presentaban una delección a nivel molecular (5). Solamente en estas familias podía realizarse un diagnóstico directo de portadoras y diagnóstico prenatal de tipo directo; en las restantes familias el análisis del ADN se llevaba a cabo estudiando esos marcadores para detectar FRLPs. A partir de esa fecha y gracias al empleo de los cADN como sondas para analizar el ADN de individuos afectados (4), se ha demostrado que aproximadamente el 50% de ellos presenta una delección en el gen DMD/DMB. En consecuencia, el diagnóstico directo ha tomado una relevancia mucho mayor (6).

El análisis directo se ha visto considerablemente simplificado con la técnica de la "PCR multiplex" (7,8) gracias a la cual puede detectarse rápidamente la existencia de delección en 18 exones del gen DMD/DMB.

En un estudio de las familias afectadas de la población española (9), se detectaron delecciones en el 41% de los pacientes afectados gracias a esta técnica, lo que representa más del 81% de las delecciones que se detectaban con los cADN. Estos datos resultaban similares a los de los estudios llevados a cabo en otras poblaciones (10). El análisis sistemático de los pacientes afectados de DMD y DMB ha mostrado que las delecciones son la mayor causa de disfuncionamiento del gen (las duplicaciones son muy escasas). El hecho de que hasta ahora solamente haya sido descrita una mutación puntual (11) que consiste en un cambio de guanina a timina en el exon 26, puede ser debido a que realmente este tipo de lesión molecular es prácticamente inexistente en DMD/DMB, o bien porque sobre un gen tan entrecortado (más de 74 exones), una pequeña delección que solo implique a una pequeña fracción de un exon corre el riesgo de pasar desapercibida. La talla de las delecciones varía mucho de un paciente a otro; se han descrito delecciones que abarcan desde 6.000kb a 0,5 kb. La zona del gen donde se produce la delección también es muy variable, y no parece existir correlación entre el emplazamiento y la extensión de la delección y el diferente grado de severidad fenotípica entre DMD y DMB. Tan sólo se da una

cierta homogeneidad en la región deletada en algunos casos de DMB (región p20) (12); no obstante, se han descrito DMD con deleciones en dicha región y muchos DMB tienen deleción en diferentes regiones del gen.

El establecimiento de la relación entre los dominios de la distrofina y la región del ADN delecionada, en un número elevado de pacientes DMD y DMB (13), permite deducir una cierta relación entre la gravedad del fenotipo en el paciente afectado por la distrofia muscular, y el dominio proteico y región del ADN delecionados. La estructura normal del dominio I de la distrofina debe ejercer un papel importante en la estabilidad de la misma, y las deleciones que se producen en esta zona deben de reducir dicha estabilidad, interrumpiéndose así las interacciones con otras proteínas del citoesqueleto. Esto se refleja en una bajada de los niveles de distrofina y en consecuencia en una mayor gravedad del fenotipo DMB al que se clasifica como DMB severo o forma intermedia. La gravedad fenotípica de los pacientes con deleciones que afectan el dominio II de la distrofina es muy variable. Esta región no sería homogénea respecto a su función y de ahí la heterogeneidad fenotípica según la zona dentro de este dominio que se ha delecionado. Han sido descritos casos de deleciones en la zona proximal de este dominio II (14) que originan cuadros clínicos que tan sólo presentan calambres, mialgia y debilidad muscular, cuadro clínico de escasísima gravedad no descrito en pacientes con deleciones en las otras zonas del dominio.

La pérdida de la zona central del dominio II causa, probablemente, un fenotipo muy leve ya que se han descrito casos de pacientes (15) con deleción en esta zona cuyo único síntoma era la elevación de la creatin kinasa. En la zona distal es donde se localizan la mayoría de las deleciones que originan los DMB clasificados como “típicos”.

El dominio III y la mitad proximal del dominio IV son aparentemente esenciales para la estabilidad de la proteína, ya que pacientes con pequeñas deleciones frameshift presentan invariablemente un fenotipo DMD. Por el contrario la pérdida de la zona más distal del dominio IV está asociada a DMB. El hecho de que el grupo carboxi terminal esté siempre presente en el ADN de los pacientes afectados de DMB, y que no lo esté en los afectados de DMD, indica que este grupo es esencial en la estabilidad de la distrofina. La delimitación exacta de las fronteras exón/intrón (16) ha permitido constatar que en el ADN de los pacientes afectados de DMB, la deleción elimina un número entero de codones con lo cual, se mantiene el código de lectura de la proteína. La trans-

cripción en este caso origina un mRNA que se traducirá en una distrofina de menor tamaño que la distrofina normal (distrofina semifuncional). En las deleciones que dan lugar a una DMD, la pérdida de los nucleótidos del ADN no es múltiplo de tres (codon) con lo cual se produce un desfase del código de lectura de la proteína y, en consecuencia, aparece un codon stop prematuro (UAA,UAG,UGA) y la distrofina deja de sintetizarse (ausencia de distrofina) (17). La reunión de los resultados del análisis de deleciones en pacientes DMD y DMB por parte de un nutrido grupo de laboratorios (Leiden, 1991) parece confirmar esta explicación al diferente grado de severidad de ambas distrofias.

Técnicas de biología molecular aplicadas al diagnóstico clínico: la β talasemia como modelo

A mediados del año 1990 se habían descrito 94 mutaciones puntuales distintas en el gen de la globina β . Estas mutaciones constituyen el conjunto más completo de anomalías moleculares capaces de ilustrar las diversas etapas y los distintos puntos cuya alteración puede afectar la biosíntesis de una proteína –cadena de globina β – a partir de un gen eucariota. Por esta razón las β talasemias han sido un excelente modelo de estudio para la elaboración de las distintas estrategias diagnósticas utilizadas en la actualidad para el análisis de las enfermedades hereditarias monogénicas.

En el año 1978, empleando la técnica descrita por Southern (18), Kan y Dozy (19) descubrieron el primer polimorfismo genotípico humano que posibilitaba la distinción de un gen normal de su homólogo deletéreo en base al estudio de los polimorfismos de restricción ligados al gen en estudio. En las, aproximadamente 60 kilobases, que ocupa el cluster de los genes de la globina de tipo β se han descrito 19 dianas de restricción polimórficas cuyo estudio simultáneo permite establecer unos determinados haplotipos. A pesar de que el número de posibles haplotipos teóricos es muy elevado, 2^{19} , solamente se ha descrito la existencia de un número muy reducido (alrededor de 10) haplotipos en las distintas poblaciones estudiadas (20). El estudio de la relación de estos haplotipos con la existencia de determinadas mutaciones del gen de la globina β evidenció el hecho de que éstas aparecen predominantemente ligadas a un particular haplotipo en las distintas poblaciones estudiadas (21). El empleo de los haplotipos del cluster de globinas tipo β permite efectuar un diagnóstico genotípico indi-

recto, que requiere además de un estudio familiar, el empleo de diversos enzimas de restricción y de distintas sondas.

La primera caracterización de genes talasémicos se realizó en sujetos de origen griego, italiano y turco, residentes en EE. UU. (22,23). La ampliación de estos estudios a otras poblaciones puso de manifiesto el hecho de que, predominantemente, cada tipo de población muestra un grupo homogéneo de mutaciones (24).

La gran mayoría de lesiones descritas en el gen de la globina β son mutaciones puntuales (afectan a un solo nucleótido). Cuando se trata de la inserción o delección de un nucleótido en las zonas exónicas del gen, se provoca una desviación en el marco de lectura del ARN-m con la aparición de un codon de terminación prematuro que conlleva siempre una expresión fenotípica de β talasemia.

La tecnología actual permite abordar el análisis genotípico de la β talasemia de una forma directa, identificando la mutación existente. La estrategia más adecuada consiste en efectuar, en primer lugar, un escrutinio de las mutaciones talasémicas más frecuentes descritas en la zona geográfica de la que es originario el paciente. De este modo se identifican un alto porcentaje de las anomalías. Cuando este escrutinio resulta negativo, o cuando el paciente en estudio pertenece a una etnia distinta a la habitualmente estudiada, es necesario recurrir al empleo de métodos que puedan evidenciar de forma rápida la mutación.

El escrutinio de las mutaciones más frecuentes en nuestra área (25), se realiza mediante PCR, Dot-Blot e hibridación con sondas ASO: se amplifica selectivamente un fragmento del gen de la globina mediante la técnica de PCR (26), este fragmento amplificado se fija en forma de dot-blot a un filtro de nylon y el filtro se hibrida con un oligonucleótido de síntesis (ASO) previamente marcado en su extremo 5' por fosforilación directa con ^{32}P δATP . Las técnicas más recientes de la Genética Molecular posibilitan el análisis rápido de fragmentos de varios cientos de pares de bases a la búsqueda de mutaciones en la secuencia nucleotídica, incluso puntuales, sin ningún conocimiento o sospecha previos de la mutación en cuestión. Las técnicas de DGGE y secuenciación forman parte de este tipo de metodología. La secuenciación "a ciegas" de todo el gen β , es una estrategia posible de realizar para detectar la mutación causante de la enfermedad puesto que se dispone de toda una batería de cebadores para efectuar

PCR a lo largo de dicho gen; no obstante, se trataría de una técnica excesivamente laboriosa, hecho que ha impulsado la realización de algunas modificaciones de este método para conseguir una mayor rapidez y eficacia.

La electroforesis en gradiente de desnaturalización (DGGE) permite la separación de fragmentos de ADN según su secuencia en el interior de una determinada región de ADN (27). Se basa en el siguiente principio: cuando un fragmento de ADN de doble hebra migra en un gel de poliacrilamida que contiene un gradiente paralelo y lineal de agentes desnaturalizantes (urea y formamida), llega a un punto determinado del gradiente en el que este ADN de doble hebra toma una configuración de hebra sencilla parcial, ligada a la desnaturalización de su dominio menos estable. Esta desnaturalización parcial produce una reducción de la movilidad electroforética del fragmento de ADN en cuestión, de manera que su posición final en el gel depende exclusivamente de la temperatura de fusión (T_m) del dominio menos estable y, por tanto, de la secuencia nucleotídica de este último. Estas variaciones en la migración electroforética detectan alrededor del 95% de las variaciones de secuencia, incluso puntuales, del dominio de fusión menos estable. Durante la amplificación de ADN de individuos heterocigotos, se crean cadenas de ADN en forma de heterodúplex debido a la existencia de una o más variaciones en su secuencia, cuyo patrón de migración electroforética en un gel con un gradiente de desnaturalización es más lento que el de las cadenas perfectamente complementarias (homodúplex). Durante la migración a través de este gel que tiene la capacidad de separar las cadenas de ADN, las moléculas que se desnaturalizan en primer lugar son las menos estables (heterodúplex), mientras que las moléculas en forma de homodúplex, que son las más estables, sufren más tardíamente dicha desnaturalización. La presencia de alteraciones en la movilidad electroforética de las muestras en estudio, pone de manifiesto la existencia de mutaciones. Una vez que se ha localizado el fragmento de migración anormal, es cuando la secuenciación de dicho fragmento (28,29) aparece como el medio más idóneo para caracterizar la mutación.

REFERENCIAS

- 1.- Duchenne G.B.A. Recherches sur la paralysie musculaire pseudohypertrophique ou paralysie myo-sclérosique. Arch Gén Med 1868, 11, 5-25:179-209;305-21;421-43;522-88.
- 2.- Becker PE. Dystrophia Musculorum Progressiva. Thieme-Verlag, Stuttgart, 1953.
- 3.- Davies K.E., Pearson P.L., Harper P.S. *et al.* Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome. Nucl Acids Res 1983, 11:2303-2312.
- 4.- Koenig M., Hoffman E.P., Bertelson CJ *et al.* Complete cloning of the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. Cell 1987, 50:509-517.
- 5.- Kunkel L.M. *et al.* Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. Nature 1986, 322:75-77.
- 6.- Baiget M., del Río E., Gallano P. Empleo del cADN de la distrofina para el diagnóstico directo de portadoras de distrofia muscular de Duchenne. Neurología 1989, 8:268-275.
- 7.- Chamberlain J.S., Gibbs R.A., Ranier J.E., Caskey C.T. Multiplex PCR for the Diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy. In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, edited by Innis M, Gelfand D., Sninsky J., White T. Orlando Academic Press 1990, pp272-281.
- 8.- Beggs A.H., Kunkel L.M. Improved Diagnosis of Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. J Clin Invest 1990, 85:613-619.
- 9.- Gallano P., del Río E., Rodríguez M.J., Tizzano E., Baiget M. Análisis directo del gen de la distrofina mediante PCR multiplex. XVII Congreso Nacional de Genética Humana, Prensa. Univ. Edit., PM 330/91, pp 283-284.
- 10.- Beggs A.H., Koenig M., Boyce F.M., Kunkel L.M. Detection of 98% of DMD/BMD Gene Deletions by Polymerase Chain Reaction. Hum. Genet. 1990, 86:45-48.
- 11.- Bulman D.E., Suman B.G., Bebhuck K.G., Worton R.G., Ray P.N. Point mutation in the human dystrophin gene: identification through western blot analysis. Genomics 1990, 10, 457-460.

- 12.– Den Dunnen J.T., Grootsholten P.M., Bakker E., Blondin L.A. *et al.* Topography of the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) Gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases Reveals 115 Deletions and 13 Duplications. *Am. J. Hum. Genet.* 1989, 45:835-847.
- 13.– Beggs A.H., Hoffman E.P., Snyder J.R. *et al.* Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker Muscular Dystrophy: dystrophin gene and protein studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 1276-1280.
- 14.– Gospe S.M., Lazaro R.P., Lava N.S. *et al.* Familial X-linked myalgia and cramps: a nonprogressive myopathy associated with a deletion in the dystrophin gene. *Neurology* 1989, 39, 1277-1280.
- 15.– Greenberg C.R., Jacobs H.K., Halliday W., Wrogemann. Three years' experience with neonatal screening for Duchenne/Becker muscular dystrophy: gene analysis, gene expression and phenotype prediction. *Am. J. Med. Genet.* 1991, 39:68-75.
- 16.–Koenig M., Beggs A.H., Moyer M. *et al.* The molecular basis for Duchenne versus Becker Muscular Dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am. J. Hum. Genet.* 1989, 45:498-506.
- 17.– Monaco A.P., Bertelson C.J., Liechti-Gallati *et al.* An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1988, 2:90- 95.
- 18.– Southern E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975, 98:503-517.
- 19.– Kan Y.W., Dozy A.M. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human β -globin structural gene:relationship to sickle mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978, 75:5631-5635.
- 20.– Antonarakis S.E., Boehmn C.D., Giardina P.J.V., Kazazian H.H. Nonrandom association of polymorphic restriction sites in the beta-globin gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982, 79:137- 140.
- 21.– Orkin SH, Kazazian HH, Antonarakis SE *et al.* Linkage of beta-thalassemia mutations and beta-globin gene polymorphism in the beta-globin gene cluster. *Nature* 1982, 296:267-269.
- 22.– Orkin S.H., Goff S.C. Nonsense and frameshift mutations in β thalassemia detected in cloned beta globin genes. *J. Biol. Chem.* 1981, 156:9782-9784.

- 23.– Orkin S.H., Kazazian H.H., Antonarakis S.E., Oster H., Goff S.C., Sexton JP. Abnormal RNA processing due to the exon mutation of the β -globin gene. *Nature* 1982, 300:768-769.
- 24.– Kazazian H.H., Orkin S.H., Markham A.F., Chapman C.R., Youssoufian H.A., Waber P.G. Quantitation of the close association between DNA haplotypes and specific β -thalassemia mutations in Mediterraneans. *Nature* 1984, 310:152-156.
- 25.– Amselem S., Nunes V., Vidaud M. *et al.* Determination of the spectrum of beta-thalassemia genes in Spain by use of dot-blot analysis of amplified beta-globin DNA. *Am. J. Hum. Genet.* 1988, 43:95-100.
- 26.– Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988, 239:487-494.
- 27.– Losekoot M., Fodde R., Harteveld C.L., van Heeren H., Giordano P.C., Bernini L.F. Denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing of PCR amplified genomic DNA: a rapid and reliable diagnostic approach to beta thalassemia. *British J. Haematol.* 1990, 76:269-274.
- 28.– Gyllenstein U.B., Erlich H.A. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction; its application to the direct sequencing of the HLS-DQ locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, 85:7652-7656.
- 29.– Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977, 74: 5463- 5467.