



## Mutaciones dinámicas

- César A. Parra, MD . Tobías Mojica, Ph.D. Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá, D. C.

El descubrimiento de repeticiones amplificadas de trinucleótidos variables en número, en pacientes con distrofia miotónica, síndrome de X-frágil, corea de Huntington y enfermedad de Kennedy, al igual que alteraciones en dinucleótidos del DNA microsatélite en pacientes con carcinoma proximal de colon, ha dado origen al concepto de mutaciones dinámicas. Esto representa una nueva avenida en teoría genética contemporánea que explica fenómenos como la anticipación y la paradoja de Sherman que se salen del patrón mendeliano clásico.

### INTRODUCCION

El éxito de los estudios de Gregorio Mendel en la formulación de su teoría de la herencia mendeliana radicó en la elección de caracteres de gen simple que no estaban ligados. Sin embargo, estudios genéticos recientes han indicado la existencia de enfermedades hereditarias que exhiben características diferentes al patrón mendeliano y que han sido clasificadas en grupos tan variados como: herencia poligénica, multifactorial, mitocondrial, impronta genómica, elementos transponibles, genes superpuestos. Ahora surge también la noción de mutaciones dinámicas.

**Generalidades.** Se han documentado bien las secuencias repetidas de nucleótidos, en regiones heterocromáticas (DNA satélite), en donde cambios mutacionales no producen cambios fenotípicos notables (1). El hallazgo de que el triplete de nucleótidos (CGG) próximo al gen FMR-1 se encuentra amplificado en pacientes con síndrome X-Frágil (2-5) motivó la búsqueda de dichas secuencias en el GENBANK (Tabla 1) confirmando la existencia de tripletes repetidos en varios genes. El descubrimiento posterior de amplificaciones en las secuencias repetidas de los genes DM-1 IT-15 y AR en los pacientes con distrofia miotónica (2, 3) corea de Huntington (6, 7) y enfermedad de Kennedy (2, 3) respectivamente, confirmó la existencia de una nueva clase de mutaciones con características propias.

La tasa de mutación se considera lenta y por esta razón se ha creado el término de mutaciones dinámicas para describir el

incremento progresivo en la tasa de mutación como consecuencia de la amplificación del número de repeticiones observadas en estas patologías (2).

**Tabla 1.** Repeticiones (ccg)<sub>n</sub> en humanos. Listado de algunos genes humanos con repeticiones (CCG)<sub>n</sub> y la posición relativa de las mismas en el gen, obtenidos mediante búsqueda en el GENBAN (2).

GEN y/o PROTEINA	NUMERO DE COPIAS	POSICION EN EL GEN
zfn 6 (zing finger)	8. 3. 3	5' no transcrito
CENP-B (centrómetro)	5	5' no transcrito
Proteasa neutra dep. Ca <sup>++</sup>	10. 6	Región codificadora
c-abl (proto-oncogen)	11	5' no transcrito
CAM III (calmodulina)	6	5' no transcrito
Breakpoint cluster region	7	5' no transcrito
Early growth response 2	5	Región codificadora
Ferritina	5	5' no transcrito

**Características.** Las características no consideradas en teoría mendeliana y que eventualmente pueden ser utilizadas en el tamizaje de nuevas enfermedades del grupo de las mutaciones dinámicas son: la paradoja de Sherman (2, 4) en el síndrome de X-frágil, el fenómeno de anticipación (2, 4) en la distrofia miotónica y la corea de Huntington.

La paradoja de Sherman se refiere a la existencia de varones transmisores normales (NTM) en una entidad con patrón de herencia recesivo ligado a X. Hasta 20% de los varones portadores de la mutación son fenotípicamente normales mientras que 30% de las mujeres portadoras heterocigotas pueden manifestar algunos rasgos del síndrome (2, 4, 8). El fenómeno de anticipación se refiere al incremento de la expresividad de generación en generación y a la tendencia de presentación en edades cada vez más tempranas observando los descendientes de un individuo afectado.

Otra característica común es el desequilibrio de ligamiento observado entre marcadores polimórficos del DNA y los genes correspondientes en pacientes con mutaciones dinámicas (2, 6, 7) sugiriendo la existencia de secuencias específicas del DNA en proximidad de los tripletes repetidos que de alguna

manera alteran su estabilidad y condicionan la aparición de la mutación en generaciones posteriores. La existencia de secuencias fundadoras que predisponen la aparición posterior de la mutación, se observa claramente en la población (de descendencia europea) venezolana con corea de Huntington (6).

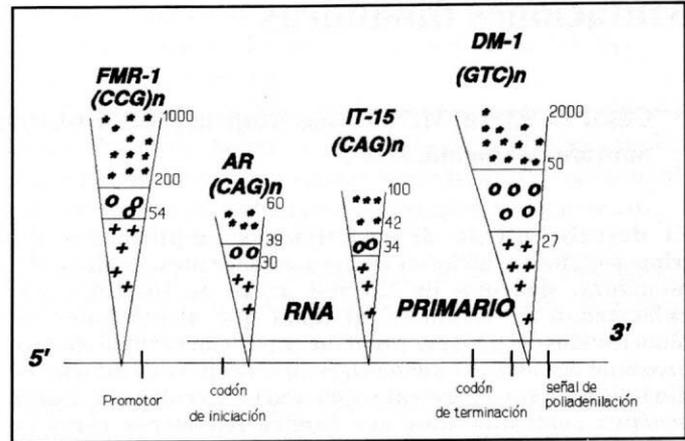
Es interesante observar que el secuenciamiento de los genes en pacientes que padecen alguna de las cuatro patologías descritas sólo ha demostrado alteraciones en el número de copias de trinucleótidos (2).

**Distrofia Miotónica (DM):** esta enfermedad neuro-muscular con patrón de herencia autosómico dominante tiene una incidencia de 1:8000 en la población general y es la distrofia muscular más frecuente en el adulto (2, 9). Se observa una expresividad variable con formas leves de distrofia muscular y cataratas hasta la forma congénita con retraso mental hipoplasia e hipotonía muscular severas y una alta tasa de muerte perinatal. La expresión en las madres de pacientes con DM es generalmente subclínica observándose un fenómeno marcado de anticipación en generaciones posteriores (10).

Los estudios iniciales de ligamiento ubicaron un gen en la posición 19q: bandas 13.2-13.3 en donde posteriormente se aisló el gen denominado MT-PK (miotonin-proteín-quinasa). Esta proteína se expresa en múltiples tejidos pero en mayor concentración en músculo esquelético y cardíaco. De acuerdo al estudio de la secuencia del gen se observa un dominio quinasa, uno transmembrana y una secuencia de proteína estructural de músculo. El hallazgo de disminución en la fosforilación de proteínas musculares al igual que de alteraciones en los canales iónicos de Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> y Ca<sup>++</sup>; sugieren que la proteína cumple funciones transductoras de señales en músculo (3).

A pesar de su carácter dominante no se han encontrado productos anormales del gen sino una disminución en la expresión del mismo. De esta manera se considera que el fenotipo es dosis dependiente (3). El secuenciamiento del gen en los pacientes reveló la presencia de secuencias repetidas GCT (Figura 1) en el extremo 3' transcrito y no traducido del gen a 500bp de la señal de poliadenilación (2, 3, 11). Los individuos normales presentan entre cinco y 27 copias mientras que en los pacientes con DM el número de copias es siempre superior a 50 (Figura 1). El número de copias muestra variaciones étnicas en donde los europeos tienen un rango entre cinco y 11 copias y los japoneses una media de 13 copias (1, 12). Se ha observado que en portadores asintomáticos de la DM el número de repeticiones oscila entre 27 y 50 (premutaciones): pero posteriormente durante la meiosis masculina o femenina ocurre un incremento en el número de

copias explicando el fenómeno de anticipación en generaciones sucesivas. Se postula que la herencia de la mutación por vía materna conlleva una mayor expresividad del fenotipo debido a un fenómeno de impronta que hace del alelo materno un gen más activo transcripcionalmente (3).



**Figura 1.** Ubicación de las secuencias repetidas de trinucleótidos en relación con los genes. \*\*\*: Mutaciones. ooo: Premutaciones. +++: Normal. Adaptación de la (Ref 2).

**Síndrome X-frágil:** es una enfermedad que se hereda de forma recesiva ligada a X y presenta la paradoja de Sherman. Tiene una incidencia aproximada de 1:2500 hombres. Clínicamente se caracteriza por el hallazgo de retardo mental, orejas prominentes y macrorquidia. Históricamente se comenzó a diagnosticar por la presencia de sitios frágiles en el cromosoma X (Xq 27.3), al cultivar las células en un medio pobre en folatos.

El gen FMR-1 (nemónico del inglés: Fragile-X Mental Retardation) fue recientemente aislado por la técnica de híbridos somáticos (ratón-hombre) mediante clonación en Yacs (cromosoma artificial de levadura) de un sitio de ruptura (Xq 27,3) específico de los pacientes con X-frágil (4). El RNAm se detecta en múltiples tejidos pero se encuentra en mayor concentración en cerebro y testículos (4). El estudio de la secuencia del gen no muestra homología con ninguna proteína conocida de manera que hasta el momento se desconoce su función. El estudio del gen muestra la presencia de repeticiones CGG (Figura 1) en la región 5' no transcrita del gen (2-4). En individuos normales el número de copias está entre seis y 54 mientras que en los pacientes el número de copias es superior a 299 (Figura 1). No se han encontrado variaciones étnicas del número de copias. Las madres portadoras presentan un número de copias que oscila entre 54 y 200 (premutación) y tienen una tendencia marcada a la amplificación durante la meiosis femenina. La expresión del fenotipo está dada por la metilación de una isla CpG ubicada en el extremo 5' del gen, que es facilitada por el incremento en el número de copias GCT: explicando la existencia de varones

portadores asintomáticos (200 copias o más) que carecen de dicha metilación (5, 8, 13).

**Corea de Huntington:** es una entidad propia de la edad adulta caracterizada por una degeneración neuronal progresiva, especialmente en el *putamen* y el caudado, con un patrón de herencia autosómico dominante. Se calcula una incidencia de 1:10000 con predilección por la población de origen europeo. Clínicamente se caracteriza por la instauración progresiva de alteraciones psiquiátricas y cognitivas acompañadas de movimientos coreicos.

Estudios iniciales de ligamiento ubicaron el gen en el cromosoma 4 (4p16.3) en proximidad al marcador D4S10 (6, 7). Recientemente fue clonado un gen denominado IT-15, que se cree puede ser el causante de la corea de Huntington (6, 7). Este gen con un tamaño aproximado de 210 Kb codifica una proteína de función desconocida de 348 Kd denominada Huntintonina. El estudio de la secuencia del gen, indica la presencia de un dominio de unión al DNA en el extremo amino terminal. Es precisamente en el extremo 5' del gen donde están ubicadas las repeticiones CAG (Figura 1) que se transcriben a RNA, pero se ignora aún si son traducidas. El número de copias en individuos normales fluctúa entre 11 y 34 mientras que en los pacientes con la enfermedad de Huntington se encuentran entre 42 y 100 copias (Figura 1) (6). Se ha encontrado que la amplificación del número de copias ocurre únicamente vía meiosis paterna con un claro fenómeno de anticipación.

En los pacientes con la enfermedad de Huntington hay niveles normales de RNAm de manera que el efecto no se da por inactivación del gen sino por cambios en la inestabilidad del RNA o en la función de la proteína. El gen IT-15 se encuentra ubicado en una zona de alrededor de 2.2 Mb con desequilibrio de ligamiento. Estudios de desequilibrio de ligamiento entre pacientes con la enfermedad de Huntington y marcadores de DNA en 4p16.3 sugieren la existencia de múltiples mutaciones ancestrales diferentes aún cuando un 35% de los pacientes comparte los marcadores.

**Enfermedad de Kennedy:** también denominada atrofia muscular espino-bulbar, es una entidad con patrón de herencia recesivo ligado a X que se manifiesta clínicamente durante la cuarta década de la vida con la aparición de fasciculaciones y debilidad muscular, acompañados de manifestaciones piramidales, cerebrales y disfagia. También se puede encontrar infertilidad, ginecomastia e hiperlipoproteinemia. Las mujeres portadoras manifiestan poco o ningún síntoma.

Por estudios de ligamiento se ubicó el gen en el cromosoma X (Xp11-12) donde se encuentra el gen del receptor de andrógenos

(AR), cuya inactivación ya se había correlacionado previamente con el síndrome de resistencia a andrógenos (3). Dentro del exón 1 del gen AR, muy cercano al codon de iniciación se encuentra una serie de repeticiones CAG (Figura 1) con una gran variabilidad étnica del número de copias. En sujetos normales el número de copias que varía entre 13 y 30 mientras en los pacientes con la enfermedad de Kennedy las repeticiones van de 39 a 60 (Figura 1) (2, 3). Se ha encontrado que la estabilidad meiótica de las repeticiones CAG es mayor que en las otras entidades descritas y que aunado al estrecho margen de nueve copias que separa los individuos normales de los afectados: explica el por qué no se han encontrado los fenómenos de anticipación y paradoja de Sherman en esta entidad (2). Debido a que el triplete se traduce como glutamina, se cree que amplificaciones superiores a 60 copias inactivan la proteína manifestándose como un fenotipo de resistencia a andrógenos. No se han encontrado portadores de premutaciones (30-39 copias). Al igual que para las otras mutaciones dinámicas descritas se cree que existen secuencias polimórficas del DNA en desequilibrio de ligamiento con el gen que condicionan la inestabilidad del mismo, facilitando la amplificación CAG en meiosis posteriores.

**Origen y acción de las mutaciones dinámicas:** el fenómeno de la amplificación por recombinación meiótica ha sido descartado teniendo en cuenta que en pacientes con X-frágil se ha encontrado amplificación mitótica de las secuencias (3, 5).

El hallazgo reciente (14, 15) de inestabilidad en las secuencias repetidas (CA)<sub>n</sub>(GT)<sub>n</sub> de los microsátelites en los cromosomas 5q, 15q, 17p y 18q en pacientes con carcinoma proximal de colon plantea la posibilidad de un mecanismo propio en la replicación del DNA con secuencias repetidas.

La observación *in vitro* de que el producto de la amplificación por PCR de oligonucleótidos con repeticiones CA produce fragmentos con diferentes tamaños, sugiere un fenómeno de entrecruzamiento de la polimerasa entre diferentes cadenas en síntesis (1), pudiendo ser parte del mecanismo de amplificación en las mutaciones dinámicas. El efecto de un cromosoma fundador ancestral observado en las cuatro entidades estaría de acuerdo con la presencia de haplotipos o secuencias específicas en desequilibrio de ligamiento con los genes, que condicionarán una inestabilidad de las repeticiones, permitiendo la amplificación durante generaciones posteriores (2). La existencia de dichas secuencias repetidas en múltiples genes y posiciones hace pensar que tienen una función biológica importante aún desconocida que hace que sean conservadas evolutivamente (2). A pesar de que las mutaciones dinámicas tengan probablemente un origen común, el mecanismo de acción varía de acuerdo a la posición de las repeticiones dentro de los genes produciendo inactivación de genes (FMR-1),

cambios en la estabilidad de los RNAs (DM-1. IT5?) y productos protéicos anormales (AR).

## CONCLUSIONES

El descubrimiento de las mutaciones dinámicas abre un campo interesante de estudio en la genética clínica y predice la

existencia de múltiples patologías asociadas con dicho fenómeno. La existencia de secuencias repetidas de DNA en una gran cantidad de genes y de DNA microsatélite que pueden ser alterados durante procesos de replicación meiótica y mitótica, plantea la existencia de mecanismos propios en la replicación de dichas secuencias y posibilidades en la dinámica de los genomas.

## REFERENCIAS

1. Verma R, Dosik H. Human chromosomal heteromorfism. Nature and clinical significance. *Int Rev Cytol.* 1980; 62: 361-383.
2. Richards R, Sutherland GR. Dynamic mutations: a new class of mutations causing human disease. *Cell* 1992; 70: 709-712.
3. Caskey CT, Pizzuti A, Fu YH, Fenwick RG, Nelson D. Triplet repeat mutations in human diseases. *Science* 1992; 256: 784-789.
4. Verkert K A, Pieretti M, Sutcliffe J, Fu Y, Kohl D, Pizzuti A. et al. Identification of a gene FMR-1 containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variations in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 65: 905-914.
5. Migeon BR. Concerning the role of X inactivation and DNA methylation in fragile X syndrome. *Am J Med Gen* 1992; 43: 291-298.
6. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993; 71: 971-983.
7. Goodfellow PN. Planting Alfalfa and cloning the Huntington's disease gene. *Cell* 1993; 72: 817-818.
8. Malmgren H, Steen-Bondenson M, Gustavson K, Seemanova E, Holmgren G, Oberle I et al. Methylation and mutation patterns in the fragile X-syndrome. *Am J med Gen* 1992; 43: 268-278.
9. Editorial: Instability versus predictability: the molecular diagnosis of myotonic dystrophy. *J Med Gen* 1992; 29: 761-765.
10. Hunter A, Tsilfidis C, Mettler G, Jacob P, Mahadevan M, Surh L et al. The correlation of the age of onset with CTG trinucleotide repeat amplification in myotonic dystrophy. *J Med Gen* 1992; 29: 774-779.
11. Brunner H, Nillesen W, Van Oost B, Jansen G, Wieringa B, Ropers H, Smeets H. Presymptomatic diagnosis of myotonic dystrophy. *J Med Gen* 1992; 29: 780-784.
12. Davies J, Yamagata H, Shelbourne P, Buxton J, Ogihara T, Nokelainen P et al. Comparison of the myotonic dystrophy associated CTG repeat in European and Japanese populations. *J Med Gen* 1992; 29: 766-769.
13. Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Oberlé I, Mandel J. On some technical aspects of direct DNA diagnosis of the fragile X syndrome. *Am J Med Gen* 1992; 43: 197-207.
14. Aaltonen L, Peltomaki P, Leach F, Sistonen P, Pykkanen L, Mecklin J et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 812-816.
15. Thibodeau S, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816-819.