



Fundación JL Castaño
SEQC

SEQC^{ML}
Sociedad Española de Medicina de Laboratorio

2017-2018

APLICACIONES CLÍNICAS DE LAS TÉCNICAS ACTUALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Ed. Cont. Lab. Clin 37: 1 - 8

MICROSATÉLITES Y TP-PCR EN ENFERMEDADES POR EXPANSIÓN DE REPETICIONES DE ADN.

Clara Gómez González.

INGEMM. Hospital La Paz. Sección Genética Molecular.

Carmen Prior de Castro.

INGEMM. Hospital La Paz. Sección Genética Molecular.

1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

El genoma humano se compone de secuencias de copia única (ejemplo: genes que codifican proteínas) y secuencias repetidas. Los microsatélites o STR (siglas en inglés: *Short Tandem Repeats*) pertenecen al grupo de las secuencias repetidas. Son secuencias cortas de nucleótidos (mononucleótidos, dinucleótidos, trinucleótidos, hasta hexanucleótidos) que se repiten un número determinado de veces agrupadas en tándem en un locus cromosómico. Estas secuencias de repetición abarcan, generalmente, alrededor de 100 pares de bases (pb) y están distribuidas por todo el genoma, pudiendo estar localizadas en regiones codificantes y no codificantes.

Una característica importante de los microsatélites es que son secuencias polimórficas en la población. El número de repeticiones de un microsatélite puede variar de un individuo a otro. Además un mismo individuo puede presentar un microsatélite con un número de repeticiones distintas en cada alelo.

Actualmente se desconoce la función de los microsatélites en el genoma pero son de gran utilidad como marcadores moleculares en el ámbito de la genética. Además, algunos de ellos están implicados en enfermedades causadas por mutaciones dinámicas.

Las mutaciones dinámicas se caracterizan por la expansión o incremento en el número de repeticiones de un determinado microsatélite por encima de su intervalo normal y presentan inestabilidad intra e intergeneracional (las siguientes generaciones pueden experimentar un aumento o, en casos excepcionales, disminución en el número de repeticiones). El número de repeticiones en rango normal o estable de un microsatélite tiene siempre un umbral y a partir de dicho umbral, el microsatélite se vuelve inestable y adquiere un

tamaño de premutación o un tamaño patológico. El microsatélite con tamaño patológico o expandido afecta a la expresión o función de algún gen y ocasiona la enfermedad. El microsatélite con tamaño de premutación, generalmente no genera enfermedad (una excepción sería el síndrome del cromosoma X frágil, OMIM: #300624), pero sin embargo, al ser inestable puede aumentar de tamaño al transmitirse a la descendencia y alcanzar un intervalo patológico en futuras generaciones. El rango de normalidad, de premutación o patológico de las repeticiones de un microsatélite varía de unas enfermedades a otras.

1.1. Análisis de microsatélites

El análisis molecular de los microsatélites se basa en la determinación del número de repeticiones. Para ello, se lleva a cabo una amplificación mediante la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) de la región donde se localiza el microsatélite a estudio. A continuación, se analiza el tamaño de los fragmentos amplificados mediante electroforesis capilar. Para poder analizar el tamaño de los fragmentos, al menos uno de los cebadores de la PCR debe ir marcado con un fluoróforo, para que pueda ser detectado en la electroforesis capilar.

Por cada individuo se obtendrán, para un microsatélite dado, una de las siguientes posibilidades:

- Dos fragmentos de diferentes tamaños, en caso de que el sujeto presente un número de repeticiones distintas en cada alelo (heterocigoto). Figura 1A.
- O bien, un único fragmento, en caso de que el sujeto presente el mismo número de repeticiones en ambos alelos (homocigoto), o como ya veremos más adelante tenga un alelo normal y un alelo expandido que no se detecte por esta técnica. Figura 1B.

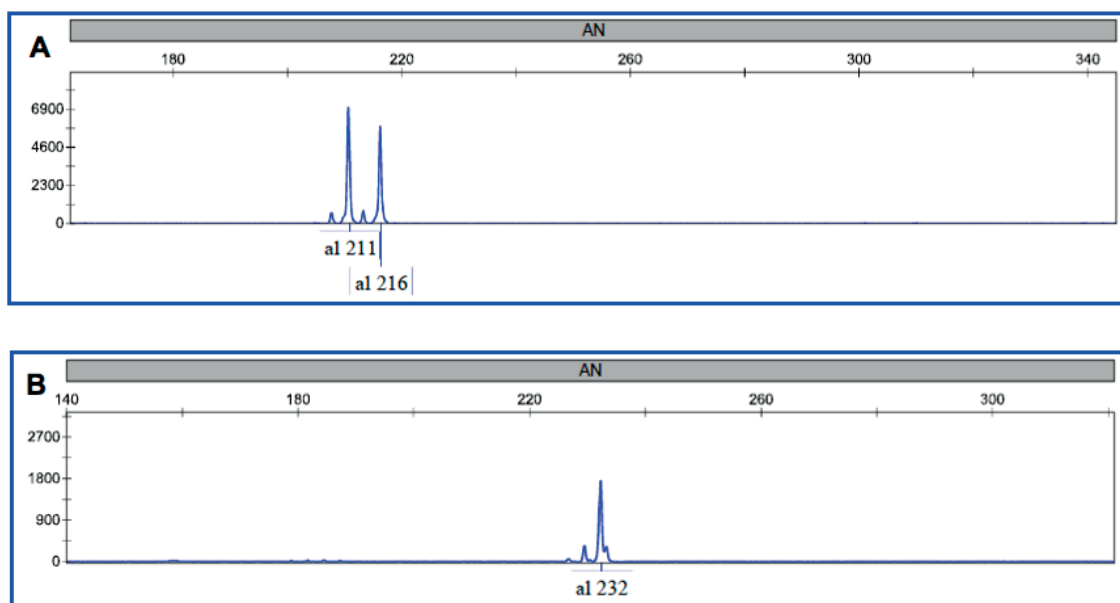


Figura 1: Resultado obtenido del análisis de los fragmentos amplificados mediante electroforesis capilar. A) Se observan dos amplicones con un tamaño de 211 y 216 nucleótidos, uno por cada alelo. B) Se observa un amplicón con un tamaño de 232 nucleótidos, lo que sugiere que ambos alelos tienen el mismo tamaño.

A partir del tamaño de los fragmentos obtenidos en nucleótidos mediante electroforesis capilar, se puede calcular el número de repeticiones del microsatélite. Tal y como se observa en la figura 2, los fragmentos obtenidos vienen dados por la pareja de cebadores que delimita la región que contiene el microsatélite.

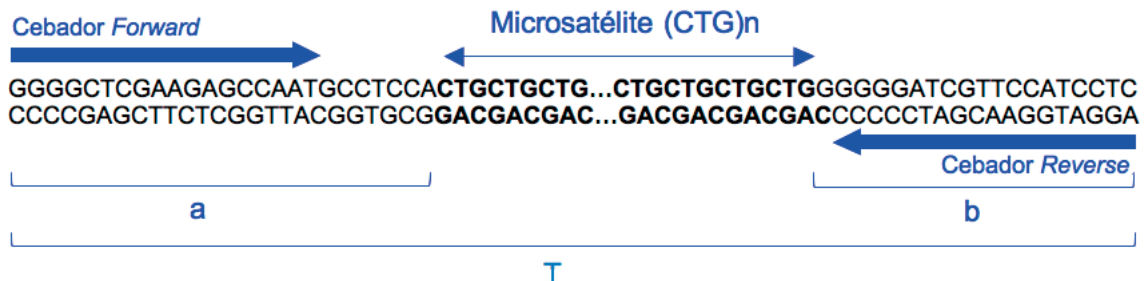


Figura 2: Secuencia con un microsatélite con repeticiones (CTG)_n, en la que se representan los cebadores flanqueantes *Forward* y *Reverse* y se marcan las variables (a, b) necesarias para el cálculo del número de repeticiones del microsatélite (n) a partir del tamaño de los fragmentos obtenidos por electroforesis capilar (T).

Conociendo el número de pb que flanquean la región microsatélite (a + b) y el número de nucleótidos que componen el microsatélite (en el caso de la figura 2 está compuesto por repeticiones de 3 nucleótidos CTG) se puede calcular el número de repeticiones del mismo mediante la siguiente fórmula:

$$n^{\circ} \text{ repeticiones } (n) = \frac{T - (a + b)}{3}$$

Esta fórmula es orientativa porque puede haber una pequeña desviación entre el número de repeticiones calculado y el real, por lo que conviene confirmar en la puesta a punto de la técnica, el número de repeticiones reales, mediante secuenciación Sanger.

1.2. TP-PCR

La técnica de TP-PCR (*Triplet Repeat Primed PCR*) fue desarrollada por Warner et al. en 1996 para detectar los alelos expandidos en la distrofia miotónica tipo 1 (DM1) (OMIM: #160900). El análisis molecular de microsatélites, mediante PCR convencional y electroforesis capilar, cuantifica el número de repeticiones de los alelos menores de 100-150 repeticiones, y mediante la TP-PCR seremos capaces de detectar si existe o no expansión. La técnica de TP-PCR se basa en una PCR que utiliza tres cebadores (figura 3):

- a) un cebador específico de una región flanqueante a las repeticiones que está marcado fluorescentemente en 5' (P1 o P2);
- b) un segundo cebador formado por la secuencia complementaria a las repeticiones (P4), que se continúa hacia el extremo 5' con una secuencia que no está presente en el genoma humano
- c) un tercer cebador, denominado universal, que es complementario de la secuencia que no está presente en el genoma humano (P3), que forma parte del segundo cebador.

Se lleva a cabo una PCR con las etapas convencionales: desnaturalización, annealing y elongación. El tiempo de elongación tiene que ser suficiente para permitir la completa extensión o elongación de los productos de mayor tamaño, por lo que es superior al de una PCR convencional.

La especificidad la determina el cebador P1 o P2. Un ratio 10:1 de la concentración de los cebadores P3:P4 permite que el cebador P4 se agote en los primeros ciclos de amplificación. Este cebador P4 se une a múltiples sitios dentro de las repeticiones (ej. CTG). El cebador P3, junto con P1 o P2, amplificará los productos generados por P4 y P1 o P2 en los primeros ciclos, dando lugar a una mezcla de productos de PCR (figura 3).

Los productos obtenidos mediante la TP-PCR se analizan mediante electroforesis capilar. En el caso de que exista expansión, se obtiene una imagen electroforética típica de escalera o cola de dragón (figura 4) con una periodicidad de 3 pares de bases (1 repetición), disminuyendo gradualmente la altura de los picos al aumentar el tamaño del número de repeticiones.

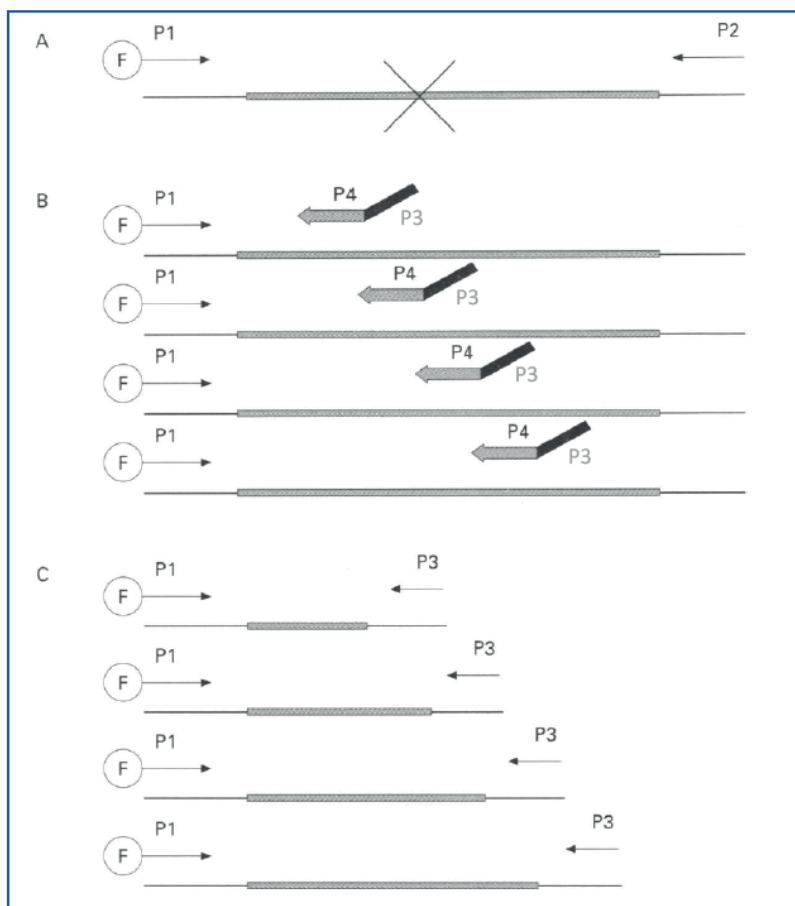


Figura 3: Principio del diseño de la TP-PCR. A) PCR convencional con cebadores flanqueantes de las repeticiones CTG (P1 y P2). B) En los primeros ciclos de amplificación, el cebador P4 se une a múltiples sitios a lo largo de las repeticiones CTG, dando lugar a una mezcla de productos de distintos tamaños. C) Los cebadores P3 y P1 amplifican los productos generados en los ciclos iniciales. Las cajas sombreadas representan las repeticiones (ej. CTG). F: Fluoróforo en posición 5' del cebador.

Tomada de Warner et al. J. Med Genet 1996; 33: 1022-1026.

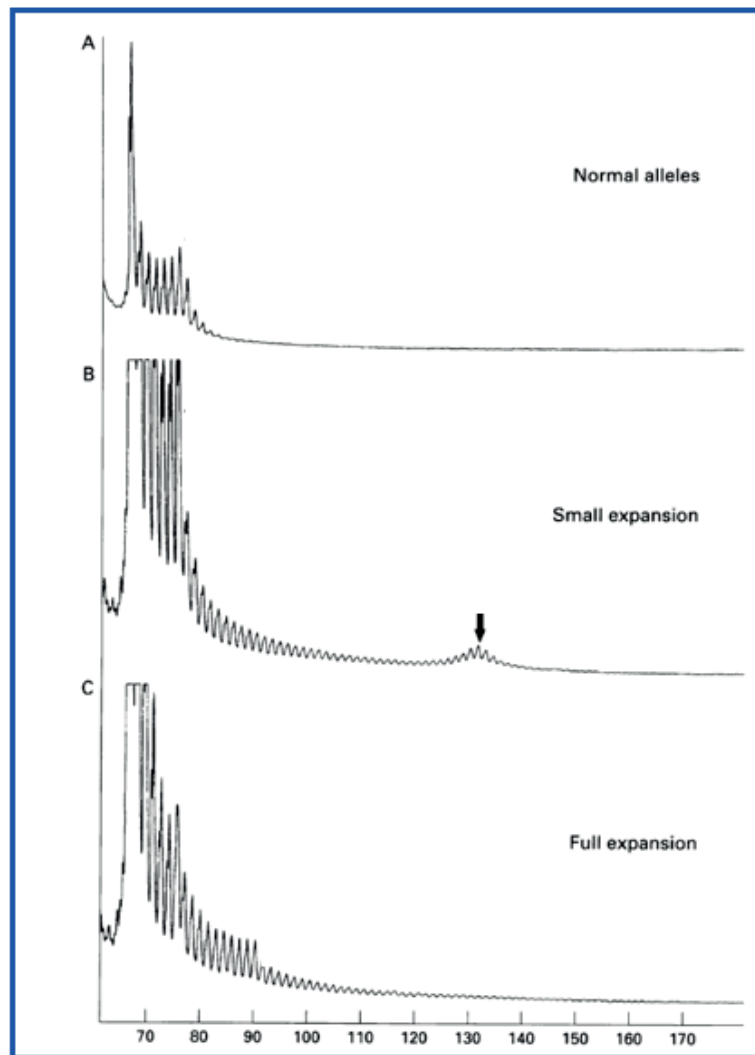


Figura 4: TP-PCR en una región de repeticiones CTG/CAG. A) Patrón de TP-PCR sin expansión. Individuo con 2 alelos normales. B) TP-PCR en una expansión de pequeño tamaño. C) TP-PCR para una expansión fuera de los límites detectables mediante la PCR convencional. Tomada de Warner et al. J. Med Genet 1996; 33: 1022-1026.

En algunos casos en los que el tamaño de la expansión está en el rango de 50 a 90 repeticiones, se puede observar la característica escalera con la periodicidad de 3 pares de bases que presenta una pequeña elevación (figura 4B) que nos da una idea del tamaño del alelo expandido.

Se han descrito algunos casos de pacientes con DM1 en los que existen interrupciones en la secuencia de repeticiones CTG (nucleótidos que se intercalan entre las repeticiones). Si se realiza la técnica en un único sentido se pueden obtener resultados de TP-PCR falsos negativos que no detectan la expansión de las repeticiones. Por este motivo, actualmente se recomienda hacer la TP-PCR bidireccional (dirección *forward*, P1, y *reverse*, P2), para evitar estos falsos negativos. En el caso que existan interrupciones en las repeticiones, la TP-PCR puede ser negativa en uno de los sentidos, únicamente detectando la expansión en el otro sentido (figura 5), aunque esto no es lo habitual.

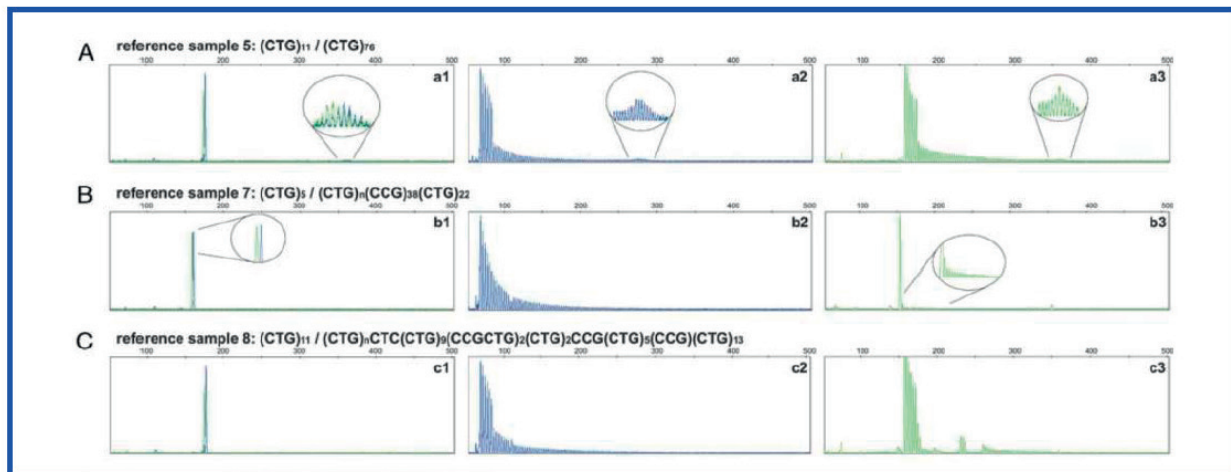


Figura 5: Ejemplos de casos de DM1 con expansiones con y sin interrupciones. La primera columna (a1, b1 y c1) representa la PCR convencional con cebadores flanqueantes P1 y P2. La columna del medio (a2, b2 y c2) muestra la TP-PCR forward. Y la columna de la derecha (a3, b3 y c3) la TP-PCR reverse.

Se representan alelos expandidos sin interrupciones (A) y con interrupciones (B y C).

Tomada de Radvansky et al. *Diagn Mol Pathol* 2011; 20:48-51.

2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

2.1. Diagnóstico molecular de enfermedades por expansión de repeticiones de ADN

El estudio de microsatélites mediante las técnicas de PCR y TP-PCR se emplea en el diagnóstico molecular de enfermedades causadas por mutaciones dinámicas. Ambas técnicas deben ser utilizadas de manera complementaria en la interpretación de los resultados. Nos podemos encontrar con distintas situaciones en un paciente:

- La presencia de dos picos en el estudio de microsatélites, nos indica que el paciente es heterocigoto para dos alelos de distinto tamaño menores de 100-150 repeticiones.
- Un resultado de microsatélites con un único pico, puede indicar:
 - a) que el paciente presenta dos alelos homocigotos de un determinado número de repeticiones menor de 100-150, si el resultado de la TP-PCR indica que no hay una gran expansión.
 - b) que es heterocigoto para un alelo menor de 100-150 repeticiones y uno expandido, si la TP-PCR indica que hay expansión.
- La ausencia de amplificación de microsatélites y una TP-PCR positiva se presenta en aquellos casos en los que el paciente presenta dos alelos expandidos.

Las enfermedades causadas por expansión de microsatélites pueden presentar herencia dominante o recesiva. En los casos con herencia autosómica dominante, con que uno de los alelos del microsatélite afectado se encuentre expandido se manifiesta o desarrolla la enfermedad. Dentro de este grupo de enfermedades se encuentran:

- La distrofia miotónica tipo 1 (OMIM: #160900): causada por la expansión del microsatélite (CTG)_n localizado en la región 3' no traducida (3'UTR) del gen *DMPK* (OMIM: #605377).
- El síndrome del X frágil (OMIM: #300624): causada por la expansión del microsatélite (CGG)_n localizado en la región 5' no traducida del gen *FMR1* (OMIM: #309550).
- Las ataxias espinocerebelosas autosómicas dominantes (SCAs: SCA1, OMIM: #164400; SCA2, #183090; SCA3: #109150; SCA6: #183086; SCA7: #164500): causadas por la expansión del microsatélite (CAG)_n localizado en la región exónica de los genes *ATXN1* (OMIM: #601556), *ATXN2* (#601517), *ATXN3* (#607047), *CACNA1A* (#601011), *ATXN7* (#607640), entre otros.
- La corea de Huntington (OMIM: #143100): causada por la expansión del microsatélite (CAG)_n localizado en el exón 1 del gen *HTT* (OMIM: #613004).

Algunas de las enfermedades por expansión de microsatélites presentan una herencia autosómica recesiva. Este es el caso de la ataxia de Friedrich (OMIM: #229300) causada por la expansión de los dos alelos del microsatélite (GAA)_n localizado en el intron 1 del gen *FXN* (OMIM: #606829); o bien, causada por la expansión (GAA)_n de un alelo y una mutación puntual en el otro alelo del gen *FXN*.

2.2. Otras aplicaciones

Dado que los microsatélites son polimórficos y son considerados marcadores moleculares, el análisis de estas secuencias repetidas también se aplica en otros campos, como en estudios de identidad genética (reconocimiento de parentesco en desastres, análisis de paternidad, etc), poblacionales y diagnósticos moleculares indirectos de enfermedades genéticas (estudio del alelo asociado a una enfermedad genética dentro de una familia).

3. LIMITACIONES DE LA TÉCNICA

La TP-PCR presenta como limitación que no permite cuantificar el número de las repeticiones de los alelos expandidos. Los microsatélites permiten cuantificar el número de repeticiones de los alelos menores de 100-150 repeticiones. Con la TP-PCR se detecta si existe o no expansión, pero no se puede cuantificar el número de repeticiones de la expansión. Para ello, hay que recurrir a técnicas como el Southern blot.

La TP-PCR debe ser bidireccional, porque si se realiza en un único sentido no se detectarían los alelos expandidos con interrupciones.

BIBLIOGRAFÍA

Luque J, Herraéz A. Organización del genoma eucariótico. En: Elsevier, ed. Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Madrid: 2002; 107-116.

Kamsteeg EJ, Kress W, Catalli C, Hertz JM, et. al. Best practice guidelines and recommendations on the molecular diagnosis of myotonic dystrophy types 1 and 2. Eur J Hum Genet 2012; 20(12): 1203-1208.

Warner JP, Barron LH, Goudie D, Kelly K, Dow D, Fitzpatrick DR, Brock DJ: A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. J Med Genet 1996; 33: 1022-1026.

Radvansky J, Ficek A, Minarik G, Palffy R, Kadasi L. Effect of unexpected sequence interruptions to conventional PCR and repeat primed PCR in myotonic dystrophy type 1 testing. Diagn Mol Pathol 2011; 20:48-51.

COMISIÓN DE GENÉTICA

Presidenta: Pilar Carrasco Salas.

Miembros: Concepción Alonso Cerezo, Ana Cuesta Peredo, Orland Diez Gibert, Begoña Ezquieta Zubicaray, Hada Macher Manzano, Jesús Molano Mateos, Josep Oriola Ambròs, Raquel Rodríguez López, Atocha Romero Alfonso, Ana M^a Sánchez de Abajo, María Santamaría González (*coordinadora*), Cristina Torreira Banzas.

EDUCACIÓN CONTINUADA EN EL LABORATORIO CLÍNICO COMITÉ DE EDUCACIÓN

D. Balsells, B. Battikhi , R. Deulofeu, M. Gassó, N. Giménez, A. Merino, A. Moreno, A. Peña, N. Rico, M. Rodríguez (*Presidente*), MC. Villà.

ISBN 978-84-697-4013-2 – Octubre 2017 (recibido para publicación Junio 2017).