

Análisis molecular del cromosoma X en familia con diagnóstico de síndrome X frágil

Carolina Monzó¹, Carola Guzmán Luján¹, Monserrat Aleu Pérez-Gramunt², Noelia Escartín Alarcón¹, Carlos Gil Santiago³, Laura Gandía Artigues¹, Francisco Martínez Castellano⁴, Goitzane Marcaida Benito¹, Raquel Rodríguez-López^{1*}

1. Laboratorio de Genética Molecular, Servicio de Análisis Clínicos, Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

2. Servicio de Pediatría, Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

3. Unidad de Docencia, Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

4. Unidad de Genética, Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

*Autor de correspondencia: Raquel Rodríguez-López

Laboratorio de Genética Molecular, Servicio de Análisis Clínicos

Consorcio Hospital General Universitario, Valencia, España

Correo electrónico: rodriguez_raqlop@gva.es

RESUMEN

El Síndrome del cromosoma X Frágil es la causa de discapacidad intelectual monogénica más frecuente, se origina por la expansión de tripletes de nucleótidos CGG en la región 5' no codificante del gen FMR1. Analizamos dicha región de susceptibilidad en los familiares de un paciente portador de una expansión en rango de mutación, con el objetivo de identificar otros portadores de alelos deletéreos y ofrecer consejo genético. Detectamos alelos en rango de premutación en la madre y una hermana (sólo de madre) del paciente, con 106 y 60 repeticiones respectivamente; las cuales no presentaban rasgo fenotípico alguno. La probabilidad de heredar un alelo premutado contraído cuando se transmite por vía materna es baja (aproximadamente del 0.76 %). Por ello, ante el hallazgo de un número de repeticiones menor en el descendiente de una mujer, se debe descartar como primera posibilidad que se trate de un alelo en mosaico producto de un alelo mutado no detectado; para ello es esencial emplear una técnica de máxima sensibilidad. En nuestro caso fue imposible obtener muestras para ADN de los progenitores paternos, por tanto procedimos al análisis de microsatélites en el cromosoma X para asignar los haplotipos que segregaban con los correspondientes alelos expandidos, tratando de describir su heredabilidad en el pedigree. Concluimos que la premutación que porta la hermana del paciente diagnosticado, fue heredada por su vía paterna y procede por tanto de un segundo alelo deletéreo, diferente al transmitido por su madre al hermano afectado. La estructura haplotípica identificada en ambos cromosomas portadores, la población de procedencia de los individuos y su heredabilidad por ramas paternas, sugiere que pudiesen compartir ancestro en generaciones previas.

Palabras clave: *Síndrome X Frágil, premutación, segregación, FMR1, microsatélites*

INTRODUCCIÓN

El Síndrome del cromosoma X Frágil (SXF; MIM#300624) es la causa hereditaria más prevalente de discapacidad intelectual, en el 98% de los casos se origina por expansión de tripletes de nucleótidos CGG en el extremo 5' no codificante del gen FMR1 (Fragile X Mental Retardation-1), situado en el cromosoma Xq27.3. Se considera que los alelos del gen FMR1 son estables cuando contienen hasta 45 repeticiones, el rango de los alelos considerados premutados y sin capacidad para inducir el fenotipo

MIM#300624 se establece entre 55 y 200 repeticiones, y cuando el alelo tiene más de 200 repeticiones se considera mutado y que produce la pérdida de función génica, desarrollándose el fenotipo del SXF (Kremer, 1991).

La mutación causal del SXF tiene patrón de herencia ligada al cromosoma X, modificado por la expansión de repeticiones CGG de alelos premutados (paradoja de Sherman). La expansión a mutación por herencia paterna se da muy raramente, normalmente los varones portadores de premutaciones con más de 80

repeticiones CGG pasan la premutación expandida en 2-54 repeticiones a la siguiente generación, mientras que las descendientes de portadores con menos de 80 CGGs, pueden recibir el alelo contraído en 2-20 CGGs (Nolin, 1996; Snow, 1993). En cambio la transmisión por vía materna se caracteriza por aumentar el número de repeticiones CGG de la premutación, siendo la probabilidad de expansión a mutación directamente proporcional con el tamaño de la premutación (Nolin, 2011). Se ha calculado que cada descendiente de una mujer portadora de premutación tiene sólo un ~0.76 % de probabilidad de heredar un alelo premutado contraído (con menor número de repeticiones) respecto al de su generación anterior (Brown, 1996; Nolin, 1996).

El fenotipo clásico del síndrome incluye discapacidad intelectual moderada (CI 35-40) o grave (CI 20-34), trastornos del comportamiento, déficit de atención, hiperactividad, comportamiento autista y movimientos repetitivos. Los pacientes tienen cara alargada con frente amplia, mandíbula prominente, orejas grandes, hiperlaxitud articular, pies planos, estrabismo y macroorquidismo en varones postpuberales (Loesch, 2004). Aunque los individuos portadores de premutación no desarrollan los signos del SXF, pueden desarrollar fallo ovárico prematuro (MIM #311360; Sullivan, 2011) y síndrome temblor-ataxia (MIM #300623; Jacquemont, 2004).

Tras diagnosticar a un paciente de SXF, se estudió la región de susceptibilidad del gen *FMR1* en sus familiares con el objetivo de identificar otros portadores de alelos deletéreos, definir el origen materno o paterno de las premutaciones identificadas y ofrecer consejo genético.

DESCRIPCIÓN DE LA FAMILIA

La familia de un paciente de 6 años, diagnosticado de SXF (analizado en otro centro y de cuya muestra no dispusimos) acudió a nuestro laboratorio aportando un informe en el que se refería la existencia de un alelo mutado con al menos 300 repeticiones CGG en el gen *FMR1*; era hijo de madre colombiana y padre español. Tras obtener consentimiento informado, se amplió el estudio a la familia del paciente (Fig. 1) y se extrajo ADN a partir de muestras de sangre en EDTA de abuela (I-2), madre (II-2), hermano mellizo (III-2) y hermana de diferente padre (III-1). No fue posible obtener muestras para ADN del abuelo materno, ni del padre o familia paterna de la hermana del paciente (III-1). Ambos estaban fallecidos desde la tercera década de la vida, residiendo el resto de los miembros de ambas familias en Colombia.

Es destacable la no existencia de signo o síntoma alguno de fallo ovárico en la madre (II-2) que, a la edad de 39 años nos refirió su sexto y último embarazo pasado los 35, habiendo sido dos de ellos gemelares. No hay antecedentes de síndrome de temblor-ataxia en la familia, aunque los portadores obligados de sendos alelos premutados, fallecieron a edades inferiores a las medias de aparición de tales signos en las series estudiadas.

Consejo genético

Se informó a la hermana (III-1) y a la madre (II-2) del paciente diagnosticado de SXF, de su riesgo del 50% de transmitir el cromosoma X con la expansión en el gen *FMR1* a cada descendiente. La diferencia de tamaño entre las premutaciones permitió calcular un riesgo de expansión hasta mutación completa del 2%

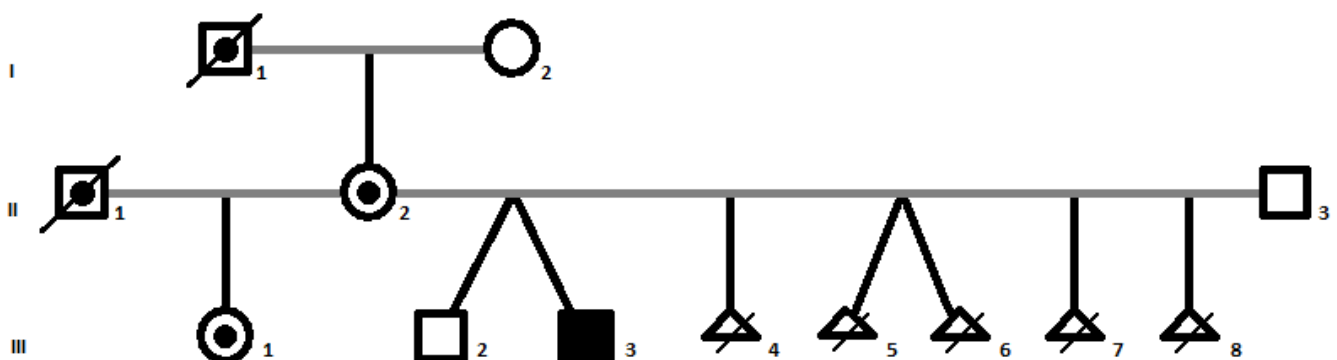


Fig. 1. Árbol genealógico de la familia analizada.

Tabla 1. Alelos del gen *FMR1*, número de repeticiones CGG y alelos de los marcadores microsatélites analizados en el cromosoma X de cada miembro analizado en la familia.

	Abuela (I-2)	Madre (II-2)	Hermano (III-2)	Hermana (III-1)	Localiza. Cr.
Nº de repeticiones CGG	29/28	29/106	29	29/60	
Tamaño de fragmentos CGG	316/313	317/550	315	315/412	
ZFYX (pb)	136.68_163.29	<u>163.68</u> <u>163.30</u>	163.68_160.36	<u>163.68</u> <u>163.68</u>	Xp22.2, Yp11.2
DXYS218 (pb)	243.29_247.23	<u>243.29</u> <u>243.38</u>	243.29_243.29	<u>243.29</u> <u>243.29</u>	Xp22.33, Yp11.32
DXYS267 (pb)	196.24_204.69	<u>196.24</u> <u>196.49</u>	196.24_192.53	<u>196.24</u> <u>196.24</u>	Xq21.31, Yp11.31
DXS1187 (pb)	147.62_163.5	147.62_151.66	147.62	147.62_139.48	Xq26.2
XHPRT (pb)	290.46_286.17	<u>290.46</u> <u>286.66</u>	290.46	<u>290.46</u> <u>286.39</u>	Xq26.2-q26.3
DXS2390 (pb)	335.57_339.31	335.57_327.61	335.57	335.57_331.49	Xq27.1-q27.2

En rojo, haplotipo asociado al alelo de 29 repeticiones CGG en la familia.

En azul, alelos teloméricos de madre e hija no coincidentes del brazo Xq.

En verde, marcadores situados en el brazo Xq, segundo alelo no detectable en varones al no tener regiones homólogas en el cromosoma Y.

Subrayado, marcadores que muestran las regiones cromosómicas con ancestro posiblemente común.

para la hermana (III-1) y del 98% para la madre (II-2), siempre en el caso de transmitir el cromosoma X deletéreo al descendiente (Nolin, 2011). A ambas se les ofreció la opción de diagnóstico prenatal o preconceptivo para sus futuros embarazos.

METODOLOGÍA Y RESULTADOS DEL ANÁLISIS MOLECULAR

Se amplificó la región 5' no codificante del gen *FMR1* mediante PCR, utilizando reactivos de ASURAGEN (Kit AmplideX *FMR1* PCR). La fluorescencia emitida por los fragmentos obtenidos se detectaron con el secuenciador ABI 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) tras electroforesis capilar, y fueron analizados con el software GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

El estudio de repeticiones CGG en la región 5' no codificante del gen *FMR1* en la familia del paciente diagnosticado, identificó a madre (II-2) y hermana (III-1) como portadoras de alelos deletéreos en el rango de premutación de 106 y 60 repeticiones respectivamente (Tabla 1).

Debido a la reducción del número de repeticiones en

el alelo premutado que portaba la hermana (III-1) respecto al de su madre (II-2) (y del paciente diagnosticado), hecho disonante con los mecanismos de herencia descritos, realizamos un análisis de segregación o ancestro de los alelos expandidos identificados en ambas. Ante la imposibilidad de estudiar el número de repeticiones CGG en las familias paternas de ambas portadoras, procedimos con un estudio indirecto mediante el análisis molecular de marcadores hipervariables del cromosoma X. Se utilizaron las mismas muestras de ADN extraídas a partir de las muestras de sangre en EDTA remitidas y el estudio se llevó a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa y fluorescente (QF-PCR). Se utilizó el kit de PCR múltiple Devyser Compact v3 para evaluar los marcadores genéticos hipervariables específicos de cromosoma X: DXS1187, DXS2390 y XHPRT, y marcadores genéticos hipervariables específicos de cromosomas X/Y: DXYS267, DXYS218 y ZFYX. Se utilizó el secuenciador ABI 3130 DNA Analyzer para detectar los fragmentos amplificados, y el software GeneMapper v.4.0 para evaluarlos.

Las señales de fluorescencia detectadas, correspondientes a los fragmentos amplificados, definen los tamaños de los alelos identificados para cada marcador analizado. Correlacionamos los haplotipos con

los alelos identificados en *FMR1* en el paciente, su hermano mellizo (III-2), su hermana mayor (III-1), su madre (II-2) y su abuela materna (I-2).

La comparación de resultados del estudio de marcadores microsatélites en el cromosoma X de la familia del paciente con SXF (Tabla 1) demostró que la combinación de alelos de los marcadores DXS1187 (147.62 pb), DXS2390 (335.57 pb), XHPRT (290.46 pb), DXYS267 (196.24 pb), DXYS218 (243.29 pb) y ZFYX (163.68 pb), segrega por vía materna con el alelo normal de 29 repeticiones CGG en la región promotora del gen *FMR1*. Este resultado permite concluir que ambas mujeres, portadoras de premutaciones de 60 y 106 repeticiones CGG, heredaron el alelo deletéreo por sus respectivas vías paternas, por tanto las premutaciones proceden de cromosomas X diferentes.

DISCUSIÓN

La frecuencia en población general de portadores de premutación en el gen *FMR1* es de 1:855 en hombres y 1:291 en mujeres (Hunter, 2014). Presentamos la identificación de dos alelos en rango de premutación segregando en cromosomas X diferentes de una misma familia (probabilidad de que ocurra esa situación al azar, 1:248805). Al igual que la madre (II-2) del paciente afectado de SXF, el padre de su única hermana sólo de madre procedía de la misma población pequeña y altamente endogámica colombiana. Sugerimos que la consanguinidad en dicha población pudiera haber facilitado la heredabilidad de segmentos cromosómicos amplios homocigotos, en los que se localizan alelos premutados en el gen *FMR1*, aumentando así su frecuencia en dicha población. Los cromosomas X que segregan con ambos alelos premutados de la madre (II-2) y la hermana (III-1), proceden de sus respectivos progenitores paternos y pertenecientes al mismo grupo poblacional referido; muestran alelos coincidentes para la combinación de marcadores XHPRT (286 pb), DXYS267 (196 pb), DXYS218 (243 pb) y ZFYX (163 pb), siendo además homocigotas para los alelos de los dos últimos, cuya localización es contigua y telomérica (brazo p) respecto al resto. Los marcadores señalan que los cromosomas X portadores de premutación de la madre

(II-2) y la hija (III-1), tienen cierta probabilidad de ser iguales desde el telómero del brazo p hasta la posición Xq26.2; en dicha posición el marcador DXS1187 muestra alelos diferentes para cada una. Estos hallazgos son compatibles con un ancestro común para ambos, apareciendo en esta generación como dos cromosomas derivados diferentes surgidos de una recombinación en este punto (que reconocen los marcadores DXS1187 y DXS2390, ambos bialélicos). En ese caso, ambas premutaciones del gen *FMR1* detectadas en la familia podrían haber surgido de un mismo alelo premutado cuyo tamaño habría podido ser modificado tanto por expansiones como por contracciones durante la herencia (Tabla 1).

AGRADECIMIENTOS

Carmina Serrano y Arturo Rodríguez Álvarez de la empresa Rafer Innovación Tecnológica para Laboratorio.

REFERENCIAS

- Brown WT, et al. *Reverse mutations in the fragile X syndrome*. Am J Med Genet. 1996; 64(2): 287-292.
- Hunter J, et al. *Epidemiology of fragile x syndrome: A systematic review and meta-analysis*. Am J Med Genet A. 2014; 164A(7): 1648-1658. doi: 10.1002/ajmg.a.36511.
- Jacquemont S, et al. *Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population*. JAMA. 2004; 29: 460-469. doi: 10.1001/jama.291.4.460.
- Kremer EJ, et al. *Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n*. Science. 1991; 252(5013): 1711-1714. doi: 10.1126/science.1675488
- Loesch DZ, et al. *Phenotypic variation and FMRP levels in fragile X*. Ment Retard Dev Disabil Res Rev. 2004; 10(1):31-41. doi: 10.1002/mrdd.20006
- Nolin SL, et al. *Familial transmission of the FMR1 CGG repeat*. Am J Hum Genet. 1996; 59(6): 1252-1261.
- Nolin SL, et al. *Fragile X analysis of 1112 prenatal samples from 1991 to 2010*. Prenat Diagn. 2011; 31:

925-31. doi: 10.1002/pd.2815

Snow K, et al. *Analysis of a CGG sequence at the FMR-1 locus in fragile X families and in the general population*. Am J Hum Genet. 1993; 53(6): 1217-1228.

Sullivan SD, et al. *FMR1 and the continuum of primary ovarian insufficiency*. Semin Reprod Med. 2011; 24(4): 299-307. doi: 10.1055/s-0031-1280915

Artículo recibido: 28 abril 2016

Artículo aceptado: 1 Junio 2016

Artículo publicado online: 3 Junio 2016

ABSTRACT

Fragile X Syndrome is the most common monogenic cause of intellectual disability. It originates by the expansion of the CGG triplet repeat in the 5' non-coding region of *FMR1* gene. We analyzed aforementioned region of susceptibility in relatives of a patient carrying an expansion in range of mutation, with the aim of identifying other carriers of deleterious alleles and offering genetic counseling. Alleles in range of premutation were found in the mother and sister (maternal half-sister) of the patient, with 106 and 60 repetitions respectively; none showed any phenotypic trait. The probability of inheriting a contracted premutated allele when maternally transmitted is low (approximately 0.76%). Therefore, given the finding of a lower number of repetitions in the offspring of a woman, the possibility of a mosaic allele product of a undetected mutated allele has to be ruled out in first stand; for this the employment of a technique of maximum sensitivity is essential. In our case it was impossible to obtain DNA samples from male parents; hence we proceeded with microsatellite analysis on the X chromosome to assign haplotypes segregating with the corresponding expanded alleles, trying to describe their heritability in the pedigree. We conclude that the premutation carried by the sister of the diagnosed patient, was inherited through her paternal route and therefore comes from a second deleterious allele, different from the one transmitted from her mother to her affected sibling. Haplotype structure identified in both carrier chromosomes, the individuals' population of origin and the heritability by paternal branches, suggests a shared ancestor in previous generations.