

Artículo original

Diagnóstico de la delección $\Delta F508$ en el gen CFTR a través de mutagénesis dirigida mediada por PCR

Dres. MARIA ROQUE*, MARIANA CASTELLANOS*, CLARA POTT GODOY*,
EDUARDO PUSIOL** y LUIS S. MAYORGA*

RESUMEN

Introducción. La fibrosis quística se hereda en forma autosómica recesiva y se caracteriza por la obstrucción de conductos, principalmente en pulmón, páncreas y tracto genital. La enfermedad es causada por diferentes mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), siendo la frecuencia de enfermos de 1 cada 2.000-2.500 nacidos vivos y de heterocigotas portadores, de 1 cada 20-25 nacidos vivos. Para determinar la mutación más frecuente en el gen CFTR, que es la delección de tres pares de bases (CTT) denominada $\Delta F508$, hemos desarrollado la metodología del mutagénesis dirigida mediante PCR o PSM.

Población. Siete individuos considerados posibles portadores de la mutación, por tener manifestación clínica o pertenecer a una familia con algún afectado, dieron su consentimiento para utilizar su ADN en la puesta a punto del método. Dos familias solicitaron el estudio genético. Una, con cinco integrantes, uno de ellos de 18 años con el diagnóstico clínico de FQ y otra con 8 integrantes, uno de ellos de 4 años de edad, con un diagnóstico clínico dudoso de FQ.

Materiales y métodos. Se obtuvo ADN genómico a partir de sangre total y el mismo se amplificó por PCR con cebadores específicos para el exón 10. Luego, el producto de amplificación se incubó con la enzima de restricción Mbol a 37°C.

Resultados. Para amplificar el exón 10 del CFTR se utilizó un cebador 5' que introduce parte de la secuencia del sitio de corte para la enzima Mbol; ésta es completada en el alelo sano por el triplete CTT, pero no en el alelo afectado. El cebador 3' se eligió para contar con un control interno de actividad enzimática. Este análisis genético nos permitió detectar la mutación en cinco individuos, uno de ellos homocigota.

Conclusiones. La metodología es simple, específica, sensible y de bajo costo, evita corridas electroforéticas de alta resolución para detectar la diferencia de tres pares de bases del producto de amplificación y no requiere hibridación con oligonucleótidos aleloespecíficos.

Palabras clave: fibrosis quística, mutagénesis dirigida mediante PCR, sitio de restricción.

SUMMARY

Introduction. Cystic fibrosis is a recessive autosomic genetic disease characterised by the obstruction of ducts in lung, pancreas and the genital apparatus. This disease is caused by different mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene (CFTR). The frequency of affected patients is 1 in 2,000-2,500 live births and the carrier frequency is 1 in 20-25 live births. In order to detect the most frequent mutation in the CFTR gene, the three base pair deletion known as $\Delta F508$, the PSM (PCR-mediated site-directed mutagenesis) methodology was developed.

Population. Seven patients gave their consent to use their DNA for the set-up of the method. All of them were considered possible carriers of a mutation. Two families asked for the genetic analysis. One, with an 18 years old girl with clinical CF diagnosis. The other, with a 4 years old patient with a suspected CF clinical diagnosis.

Methods. DNA was obtained from blood, and amplified by PCR with specific primers for exon 10. After this, the amplification product was incubated with the restriction enzyme Mbol at 37°C.

Results. A forward primer was used that abuts the mutation $\Delta F508$ and introduces a restriction site for the endonuclease Mbol only in the normal allele. The recognition sequence is completed with the sequence CTT, absent in the mutated allele. The reverse primer was chosen to include a constitutive restriction site in both alleles in the PCR product. This restriction site serves as a control for enzyme activity. This genetic analysis allowed the detection of the mutation in five patients, one of them homozygous.

Conclusions. This methodology, that obviates the need of high-resolution gel electrophoresis to detect the $\Delta F508$ deletion or the use of allele-specific oligonucleotide hybridisation, is simple, specific and sensitive.

Key words: Cystic fibrosis, PCR-mediated site-directed mutagenesis, restriction site.

Arch. argent. pediatr 2000; 98(5): 304

INTRODUCCION

La fibrosis quística (FQ) es la más común de las enfermedades autosómicas recesivas en la población blanca. Se presenta en uno de cada 2.000-2.500 nacidos vivos y tiene una frecuencia de portadores de uno cada 20-25 nacidos vivos.¹ Se caracteriza clínicamente por la obstrucción de los conductos en el pulmón, páncreas y tracto genital,

* Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Instituto de Histología y Embriología (CONICET, U.N. Cuyo).

** Instituto de la Patología Tiroidea. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

Correspondencia: María Roqué. Laboratorio de Biología Celular y Molecular. IHEM. Casilla de Correo 56. (5500) Mendoza.

principalmente debido a que el tejido epitelial de los órganos afectados se resiente por su incapacidad de transportar eficientemente el cloruro a través de la membrana celular.²⁻⁴

El gen relacionado con la enfermedad reside en el cromosoma 7 q31-32 y codifica para una proteína llamada proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la FQ (CFTR). Mutaciones en el gen CFTR resultan en la falta de proteína funcionalmente activa. La más común es la denominada $\Delta F508$, presente en un 57% de los cromosomas fibroquísticos en Argentina.⁵ Consiste en una delección de 3 pares de bases (CTT) en el exón 10, que resulta en la pérdida de un aminoácido (fenilalanina) en la posición 508 de la proteína. En los enfermos fibroquísticos se ha observado una correlación entre la mutación $\Delta F508$ y la presencia de disfunción pancreática.⁶ Se postula, además, que la simple presencia de esta mutación en individuos heterocigotas podría estar relacionada con la susceptibilidad al asma.⁷ Dado el alto porcentaje de mutaciones que cubre la $\Delta F508$, es de gran importancia detectar esta alteración como apoyo al diagnóstico clínico y también como única vía de detección de portadores. Esta permite la planificación familiar y el consejo genético cada vez más desarrollado.

Hasta el presente se han descrito más de 900 mutaciones causantes de FQ informadas al Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium

(<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/FullTable.html>),

lo cual dificulta el desarrollo de una metodología para la detección de todas ellas.

Nuestro propósito fue desarrollar una técnica simple que permitiera la detección de la mutación $\Delta F508$, para luego aplicarla al diagnóstico de posibles afectados y sus familiares. La metodología utilizada denominada mutagénesis dirigida mediante PCR (PSM) se basa en la posibilidad de introducir mutaciones puntuales durante la reacción de PCR. Los cambios de secuencia se eligen de modo que generen sitios de reconocimiento para enzimas de restricción sólo en un alelo específico. La técnica fue introducida por Haliassos et al.⁸ en Francia para la rápida detección de mutaciones en el oncogen *ras* y fue aplicada a la FQ por Friedman et al.^{9,10} Uno de los problemas que presenta es la posibilidad de falsos negativos cuando la enzima, por diferentes razones, no corta. En el ensayo aquí descrito se incluyó un control de corte interno para obviar este inconveniente.

Población

Para una primera etapa de puesta a punto de la

metodología se obtuvo el consentimiento de siete individuos para estudiar su ADN. En los casos de menores de edad, el consentimiento fue dado por sus padres. Las edades fueron variadas y no se aplicó este parámetro como criterio de exclusión. El criterio de inclusión fue considerarlos posibles portadores de la mutación $\Delta F508$, por tener alguna manifestación clínica o pertenecer a una familia con algún afectado. Los resultados obtenidos no fueron comunicados a los individuos por no haberlo solicitado ellos ni sus médicos. En una segunda etapa, dos familias solicitaron el análisis genético de sus integrantes, por tener ambas un paciente con FQ diagnosticado clínicamente.

MATERIALES Y METODOS

Diagnóstico genético

Se obtuvo ADN genómico a partir de sangre total extraída con EDTA como anticoagulante mediante la técnica de extracción salina.¹¹ La obtención de las muestras se realizó con el consentimiento informado de los mismos pacientes o de sus padres en caso de menores de edad.

PCR

El ADN resuspendido en agua fue amplificado mediante los siguientes cebadores:

5': accattaaagaaaatgat⁷; y

3': tgcaagcttctaaagcata.

El programa de amplificación se realizó con 35 ciclos (1 minuto: 94°C, 2 minutos: 50°C, 1 minuto: 72°C).

Digestión enzimática

Para la digestión enzimática, una alícuota de 10 ml del producto de amplificación se incubó con 2,5 ml de agua miliQ, 1,5 ml de buffer 10X correspondiente a la enzima y 1 ml de enzima de restricción MboI (10 U/ml, GIBCO BRL) bajo una gota de aceite mineral a 37°C por 1 hora. Como control se realizó la misma incubación reemplazando la enzima por 1 ml de agua miliQ. Las muestras se corrieron en un gel de poli(acrilamida) no desnaturizante al 10% con una diferencia de potencial de 120 V durante 90 minutos. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio por 10 minutos y observados bajo luz ultravioleta.

Estrategia

La estrategia consistió en utilizar un cebador 5' con un cambio puntual en una base que linda con la mutación $\Delta F508$. Este cambio introduce un sitio para la enzima MboI (5'GATC3') en el alelo sano, pero no aparece en el alelo con la delección $\Delta F508$

por no completarse la secuencia de corte (*Gráfico 1*). Para el extremo 3' se buscó un cebador que permitiera abarcar en el producto de amplificación un sitio de corte constitutivo para que sirviera como control interno de la actividad de la enzima de restricción (*Gráfico 1*).

Se determinaron las condiciones óptimas del ensayo utilizando una muestra heterocigota para la mutación ΔF508 que ofrecía la ventaja de poder probar el método con un ADN que presentara ambos tipos de alelos. La amplificación fue buena y específica para una concentración de Cl₂Mg de 2 mM.

RESULTADOS

En una primera etapa, el objetivo fue poner a punto el método con el ADN de siete individuos considerados posibles portadores de mutaciones por su historia clínica o familiar. Se amplificó el exón 10 por PCR y los productos sin cortar se muestran en el *Gráfico 2*. Se pueden observar claramente dos pacientes (P1 y P3) que presentan dos bandas, la inferior corresponde a los homodúplex del alelo sano y del enfermo superpuestos. En teoría, es una doble banda, dado que el primero tiene un tamaño de 262 pb y el segundo de 259 pb, sin embargo, el tamaño del gel y las condiciones de corrida no son suficientes para detectar esta pequeña diferencia. La banda supe-

rior consiste en los heterodúplex formados por la hibridación de una hebra sana y una mutada durante la PCR. La falta de una adecuada complementariedad de bases debido a la delección hace que los heterodúplex migren con dificultad en los geles. Luego del corte con la enzima de restricción, todas las bandas disminuyen su tamaño, indicando que la enzima ha cortado el 100% del producto de amplificación. Además, las bandas superpuestas de homodúplex sano y mutado se separan, dando dos bandas ahora diferenciables. Luego del corte, las mismas difieren en 14 pares de bases y esta diferencia de tamaño es fácilmente observable, aun en minigeles. Los heterodúplex no presentan sitio de corte para Mbol en la hebra con la delección, por lo tanto no son cortados y migran por encima del homodúplex mutado.

Las demás muestras presentan una sola banda con migración similar a un control sano. Los productos de amplificación fueron incubados con la enzima de restricción Mbol y los fragmentos fueron analizados en un segundo gel (*Gráfico 2b*). La actividad de la enzima fue comprobada por el corte en la totalidad de los productos de 44 pb en el extremo 3'. En los dos heterocigotas se comprobó que la mutación se trataba de una ΔF508, ya que se diferenciaron dos bandas por debajo de los heterodúplex. La muestra P5 resultó ser homocigota para la mutación ΔF508 no pudiendo cortar la

enzima ninguno de sus dos alelos en el sitio de la mutación. Los demás individuos no presentan la mutación ΔF508. La muestra S corresponde a un individuo sano y la ΔF508 corresponde al control heterocigota ΔF508.

Una vez puesto a punto el método, en una segunda etapa, se analizaron por el mismo método los integrantes de dos familias. En el caso de la primera (*Gráfico 3*), una mujer pidió la consulta genética por tener una hermana clínicamente enferma, con un claro diagnóstico clínico de FQ y su marido, con antecedentes familiares (primo hermano) de la misma enfermedad. En el gel diagnóstico (*Gráfico 3*) se puede observar que el padre (P8) de ambas mujeres y la pa-

Secuencia del exón 10 próxima al codón 508

Normal 5' ACCATTAAGAAAATATCATCTTTG
 ΔF508 5' ACCATTAAGAAAATATCATIG
 Cebador 5' 5' ACCATTAAGAAAATATGAT3'

Productos de amplificación y cortes con Mbol

Normal (262pb)

5' ACCATTAAGAAAATAT AATGGATC GCA3'

17 pb

201 pb
44 pb

Mutado (259 pb)

5' ACCATTAAGAAAATATGATTG AATGGATC GC3'

215 pb

44 pb

Esquema de la técnica PSM para la detección de la mutación ΔF508. El método introduce un sitio de corte para la enzima Mbol en el alelo sano que no está presente en el alelo con la delección ΔF508. Esta diferencia hace que el producto de amplificación luego del corte con la enzima sea 14 pb más pequeño en el alelo sano que en el enfermo. Como control de corte de la enzima, el producto de amplificación incluye un sitio de corte para Mbol que libera un segmento de 44 pb.

GRÁFICO 1

ciente clínicamente enferma (P10) muestran un patrón característico para heterocigotas de $\Delta F508$. Por otro lado, la madre de ambas mujeres, la mujer que pidió la consulta y su marido (P9, P11 y P12) no tienen la mutación.

Sobre la base de estos resultados, se pudo deducir que la madre (P9) es portadora de una mutación en el gen CFTR, que no es la $\Delta F508$. La hija clínicamente sana (P11) tiene un 50% de probabilidad de haber heredado esa mutación. A su vez, su marido (P12) tiene una probabilidad de 4,82% de portar una mutación que no sea $\Delta F508$, por tener un primo con FQ del cual desconocemos el genotipo. De esta manera pudimos informar a la pareja que su probabilidad de tener un hijo enfermo es de 1 en 167 y la de tener un hijo portador es de 1 en 3,8. Es interesante observar que, sin el estudio genético, la probabilidad para esta familia de tener un hijo enfermo hubiera sido de 1 en 59 y de tener un hijo portador de 1 en 2,8.

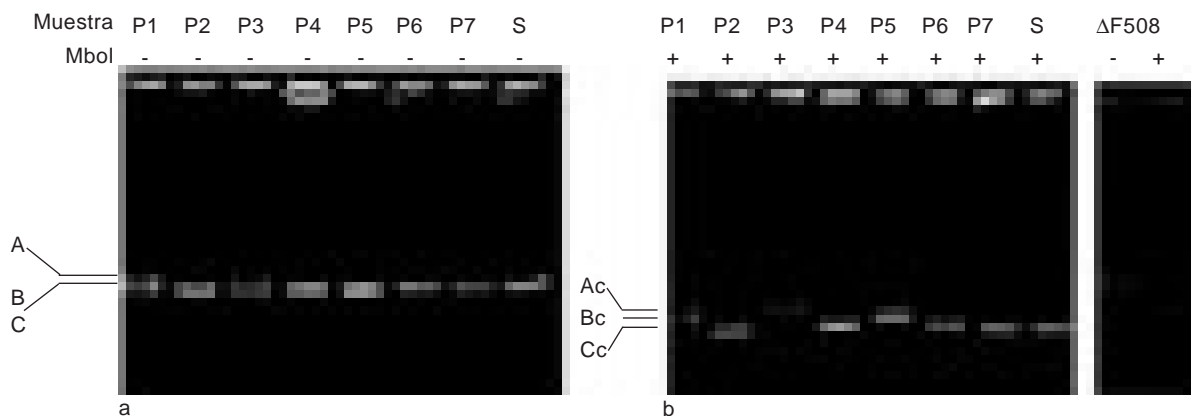
La segunda familia analizada tenía una paciente de 4 años con síntomas clínicos poco claros, posibles de relacionar con la enfermedad fibrosis quística. Se solicitó un análisis genético de la familia, por sospechas de antecedentes familiares con problemas respiratorios. El ensayo se hizo en la paciente índice y se incorporó un control sano y uno portador de la mutación $\Delta F508$. La paciente presentó un patrón idéntico al control sano, por lo

cual se informó que no presentaba la mutación buscada en ninguno de los dos alelos del gen CFTR. Dado que en Argentina el 57% de los cromosomas fibroquísticos tienen la mutación $\Delta F508$, se informó que en el caso de que la paciente tuviera la enfermedad FQ estaría entre el 18% de los enfermos que presentan mutaciones en ambos alelos distintas a la $\Delta F508$.

CONCLUSIONES

La mutagénesis dirigida mediante PCR (PSM) es una técnica adecuada para la identificación de la mutación $\Delta F508$ del gen CFTR. La inclusión de un sitio de corte enzimático constitutivo en el producto de PCR permite corroborar la eficiencia de la enzima y aumentar la confiabilidad del método.

Dado que hay tantas mutaciones distintas registradas en el gen CFTR, es de gran utilidad la existencia de una alta diversidad de técnicas para el análisis genético. El método empleado en el presente estudio es, pues, una alternativa a otros métodos que requieren corridas en geles de alta resolución o hibridación con oligoalelos específicos para la detección de la $\Delta F508$. La mutagénesis dirigida mediante PCR tiene la ventaja de poder ser aplicada no sólo para la detección de esta delección sino también para cualquier otro tipo de mutación presente en este gen. Es simple, de bajo costo, de alta sensibilidad y especificidad, con baja probabi-



Resultados del análisis por PSM de siete pacientes fibroquísticos (P1 a P7), un control sano (S) y un control heterocigota $\Delta F508$. Las muestras fueron amplificadas con 2 mM de Cl_2Mg . Luego de la amplificación las muestras se incubaron sin la enzima Mbol (-, panel a) y con ella (+, panel b). Las bandas A, B, C y Ac, Bc, Cc corresponden a heterodúplex, homodúplex $\Delta F508$ y homodúplex normales antes y después del corte con Mbol.

GRÁFICO 2

alidad de falsos positivos y falsos negativos.

DISCUSION

Debido a que la FQ es una enfermedad recesiva, el análisis genético de los individuos de familias FQ permite un rápido reconocimiento de los portadores y un aporte para la consultoría genética de los mismos. Para los pacientes afectados, lo que actualmente se sabe sobre la relación entre la mutación presente y las manifestaciones clínicas esperables puede ser aplicado para su tratamiento preventivo. Por otro lado, la caracterización genética de los enfermos permite ayudar a definir la relación genotipo-fenotipo para cada mutación.

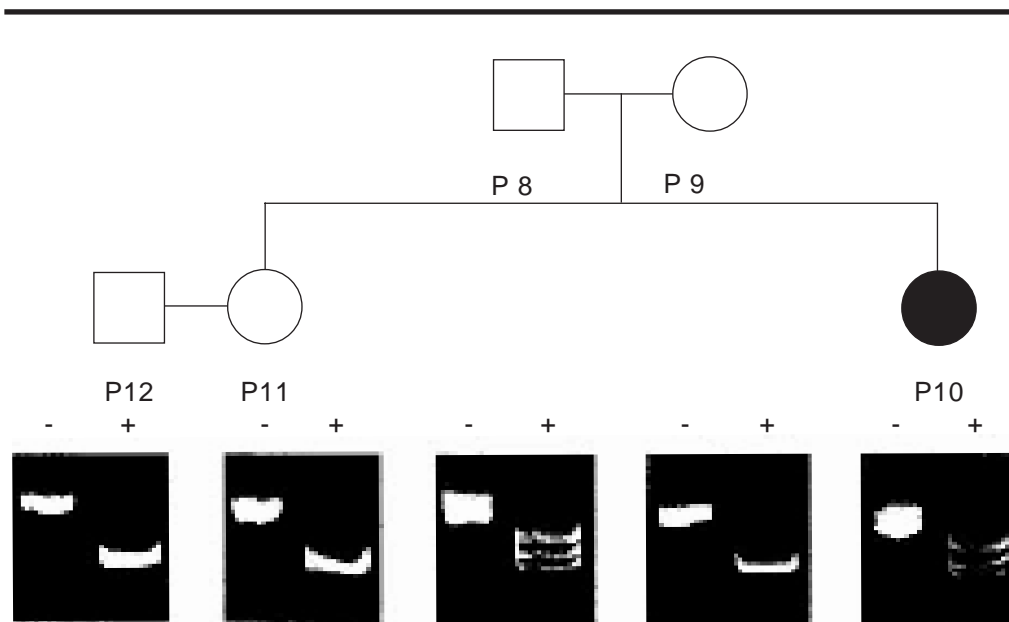
A fin de definir el espectro mutacional de FQ en nuestro medio, sería de mucha importancia ampliar los análisis poblacionales ya realizados de tipos y frecuencias mutacionales presentes en los pacientes fibroquísticos de Argentina.¹² Además, sería necesario realizar un sondeo poblacional de portadores de las mutaciones más frecuentes que permitiría definir mejor el riesgo real de FQ en la población de Argentina. Estos datos permitirán pronosticar con

mayor exactitud los riesgos de herencia y desarrollo de la enfermedad en familias fibroquísticas. El método desarrollado en nuestro laboratorio serviría para realizar un sondeo poblacional de portadores de $\Delta F508$, paso siguiente a encarar por nuestro equipo.

A pesar de los beneficios indiscutibles para los individuos analizados, hay que ser conciente de que la información genética debe ser siempre confidencial, no sólo para evitar posibles futuras discriminaciones, sino también para respetar la intimidad de cada familia. Las consecuencias de los diagnósticos genéticos pueden impactar en una variedad de aspectos clínicos, legales, éticos y psicosociales.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por un subsidio del Consejo de Investigaciones de la Universidad de Cuyo. La muestra del paciente homocigota para la mutación $\Delta F508$ fue aportada por el Dr. L. Di Yacovo del Instituto del Niño, Mendoza, Argentina. La muestra $\Delta F508$ heterocigota fue brindada por el Dr. S.A. Lozano y la Dra. M. Nembrot de FIBBIO, Buenos Aires. ■



Esquema y gel diagnóstico de una familia con una paciente con diagnóstico clínico de FQ. Las calles (-) muestran el producto de amplificación sin cortar; las calles (+) son las muestras incubadas con la enzima MboI y permiten ver un patrón claramente diferenciable entre los individuos sin la mutación (P9, P11 y P12) y los individuos heterocigotas para ella (P8 y P10).

GRÁFICO 3

BIBLIOGRAFIA

1. Chertkoff L. Anales de la Fundación Alberto Roemmers. 1998; Vol X. 79-90.
2. Gelehrter TD, Collins FS. Principles of the medical genetics. 1990: 212-217.
3. Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. Science 1992; 256: 774-779.
4. Welsh MJ, Smith AE. Fibrosis quística. Investigación y ciencia 1996; feb: 16-24.
5. Chertkoff L, Visich A, Barreiro C. Spectrum of CFTR mutations in Argentine cystic fibrosis patients. Clin Chem 1997; 51: 43-47.
6. Milla PJ. Cystic fibrosis: present and future. Digestion 1998; 59 (5): 579-88.
7. Dahl M, Tybjaerg-hansen A, Lange P et al. Delta F508 heterozygosity in cystic fibrosis and susceptibility to asthma. Lancet 1998; 351 (9120): 1911-1913.
8. Haliasson A, Chomel JC, Tesson L et al. Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations. Nucleic Acids Res 1989; 17: 3606.
9. Friedman KJ, Highsmith EW, Silverman LM. Detecting multiple cystic fibrosis mutations by polymerase chain reaction-mediated site-directed mutagenesis. Clin Chem 1991; 37: 753-55.
10. Friedman KJ, Highsmith EW Jr. Molecular biology and pathology. 1993: 159-85.
11. Miller SA, Dykes DD, Polesky KM et al. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1998; 16: 1215-20.
12. Molano J, Ezquieta B, Granell R. Screening for cystic fibrosis mutations in Spanish patients. Clin Chim Acta 1994; 226: 247-53.