

# METILACIÓN EPIGENÉTICA DEL ADN EN EL PROMOTOR DEL GEN ATAXIN-2: NUEVAS IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS Y PATOLÓGICAS.

**Autoría principal:** José Miguel Laffita Mesa<sup>1</sup>

**Otros autores:** Peter Bauer O, Vivian Kourí, Leodani Peña Serrano, Jane Roskams, Dennis Almaguer Gotay, Julio Cesar Montes Brown, Pedro Ariel Martínez Rodríguez, Yanetza González-Zaldívar, Luís Almaguer Mederos, Dany Cuello-Almarales y Jorge Aguiar Santiago

Centro para la Investigación y Rehabilitación de las Ataxias Hereditarias (CIRAH). Carlos Juan Finlay. Carretera Central Vía Habana Km 51 / 2, Reparto Edecio Pérez, CP 80100. Holguín, Cuba. Tel.: 5324462296, 5324461564.

<sup>1</sup>Autor de correspondencia. Correo electrónico [laffita@ataxia.hlg.sld.cu](mailto:laffita@ataxia.hlg.sld.cu)

**Lic. José Miguel Laffita Mesa (74%).** Desde hace más de 8 años participa en la ejecución de la investigación. Generó la idea, organizó y gerencia todo el estudio. Participó en la ejecución y fiscalización de todos los estudios moleculares, y en la caracterización genotípica. Desarrolló el análisis estadístico que llevó a la interpretación de los resultados llegando a las conclusiones científicas. Escribió el proyecto investigativo y lo presentó a convocatoria internacional. Introdujo las técnicas moleculares para el estudio de la metilación en el gen SCA2. Ha introducido los resultados en la institución y los ha discutido en diferentes eventos nacionales e internacionales. Estos resultados son parte del tema doctoral en ciencias biológicas.

**PhD Peter Bauer O (15%).** Participó en el análisis estadístico, interpretación de los datos y escritura del artículo.

**Dra.C. Vivian Kourí (1%).** Participó en la generación de datos moleculares.

**Lic. Leodani Peña Serrano (1%).** Participó en la generación de datos clínicos.

**PhD. Jane Roskams (1%).** Participó en la generación de datos moleculares.

**MSc. Dennis Almaguer Gotay (1%).** Participó en la generación de datos moleculares.

**Dr.C. Julio Cesar Montes Brown (1%).** Participó en la generación de datos clínicos.

**Dr.C. Pedro Ariel Martínez Rodríguez (1%).** Participó en la generación de datos moleculares.

**Lic. Yanetza González-Zaldívar** (1%). Participó en la generación de datos moleculares.

**Dr.C. Luís Almaguer Mederos** (1%). Participó en la generación de datos moleculares.

**MSc. Dany Cuello-Almarales** (1%). Participó en la generación de datos moleculares.

**Dr.C. Jorge Aguiar Santiago** (1%). Participó en la generación de datos moleculares.

## RESUMEN

Las expansiones patogénicas del triplete CAG (Citosina-Adenina-Guanina) por encima de cierto umbral en el gen ataxin-2 (ATXN2) causan ataxia espino cerebelosa tipo 2 (SCA2) y se ha visto que contribuye a la enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y degeneración frontotemporal. Hasta el momento se desconoce el mecanismo de regulación de la expresión del gen ATXN2 y la función del producto génico. La SCA2 muestra una correlación inversa entre el tamaño del CAG y la edad de debut de la enfermedad. Sin embargo, típicamente se observa un amplio rango de edades de debut y el tamaño de CAG sólo explica una parte de esta variabilidad. En este estudio exploramos la hipótesis que los niveles de ataxina-2 podrían estar controlados por metilación del ADN, y el desajuste de este control puede causar un gradiente de severidad clínica e influenciar el debut de la enfermedad. Encontramos que la metilación de los dinucleótidos CpG en el promotor se asocia con las expansiones patológicas en pacientes SCA2. Además observamos que la anticipación genética, sin inestabilidad intergeneracional se asocia con diferentes niveles de metilación. La metilación del ADN también influyó el comienzo de la SCA2 en casos homocigotos y pacientes SCA3. Se presentan, por primera vez, a nivel internacional la identificación del primer mecanismo epigenético que controla la expresión clínica de la SCA2, así como su efecto sobre otra neurodegeneración conocida como SCA3 o enfermedad de Machado Joseph. Este es el único estudio de su tipo, por lo que establece al grupo cubano, como pionero y uno de los líderes en el campo de la genética molecular de las Ataxias. Estos hallazgos se publicaron en la revista **Human Genetics** que es la 24 entre 200 que publican temas de genética y hacía más de 25 años que científicos cubanos no podían publicar en esta revista. Después de la identificación de la mutación causal en 1996 por EE-UU, Japón y Francia, este es el único hallazgo realizado en el gen que explica la variabilidad fenotípica en SCA2. En el corto tiempo de publicación ha sido citada 11 veces, y en más dos libros de la **OXFORD UNIVERSITY PRESS**. Estos hallazgos fueron además incluidos en la sección de **Pathogenesis** de la enciclopedia **Online Mendelian Inheritance in Man –OMIM-** de la **Johns Hopkins University** de los institutos de salud pública de EE-UU. Ha sido presentada –con gran convocatoria- en varios congresos internacionales

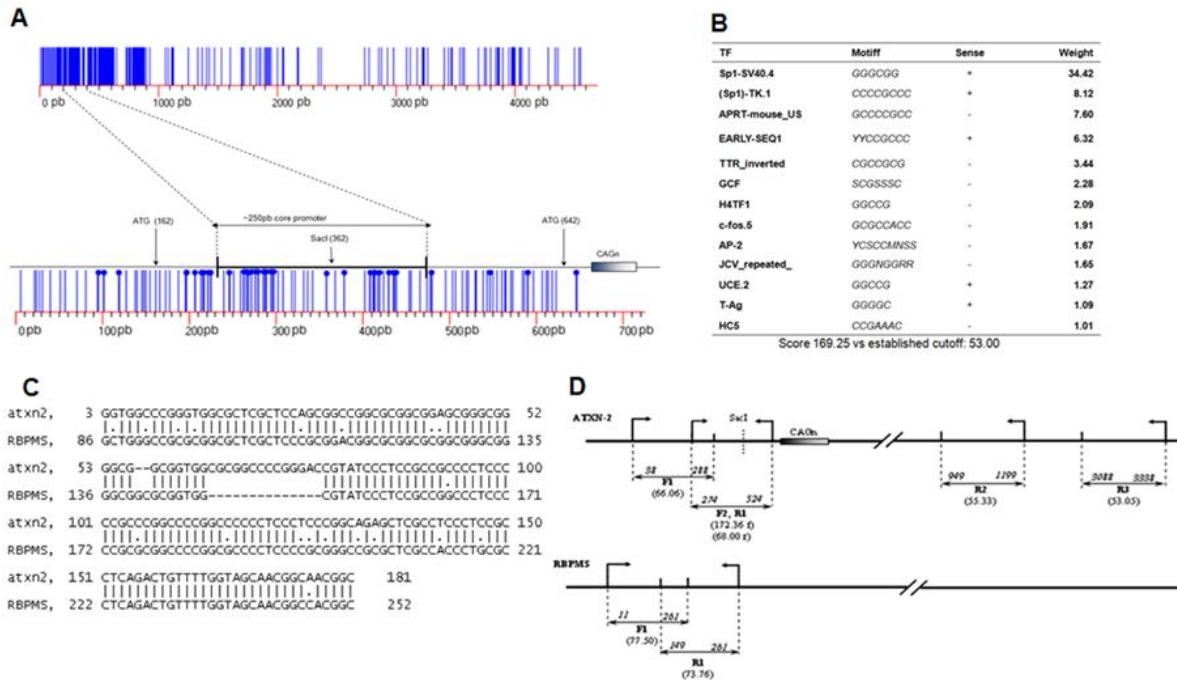
incluyendo el de la **Movement Disorder Society 2011**. Así también los hallazgos fueron merecedores del premio Regional QIAGEN de toda Latino-América, lo que permitió incorporar una cantidad considerable de recursos para el desarrollo de investigaciones genéticas en el CIRAH.

**Palabras claves:** Repeticiones de CAG, Metilación de ADN, ataxina-2, epigenética.

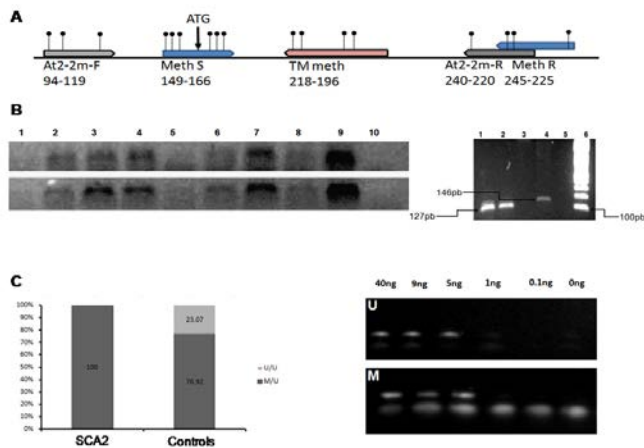
## COMUNICACIÓN CORTA

### Introducción

Las expansiones patogénicas del triplete CAG (Citosina-Adenina-Guanina) por encima de cierto umbral en el gen ataxin-2 (ATXN2) causan ataxia espino cerebelosa tipo 2 (SCA2) y se ha visto que contribuye a la enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y degeneración frontotemporal. Hasta el momento se desconoce el mecanismo de regulación de la expresión del gen ATXN2 y la función del producto génico. La SCA2 muestra una correlación inversa entre el tamaño del CAG y la edad de debut de la enfermedad. Sin embargo, típicamente se observa un amplio rango de edades de debut y el tamaño de CAG sólo explica una parte de esta variabilidad (Lastres-Becker et al., 2008, Neumann et al., 2006, Socal et al., 2009, Elden et al., 2010). La metilación del ADN en mamíferos está casi exclusivamente limitada a los residuos de Citosina de los dinucleótidos Citosina-fósfordiéster-Guanina (CpG) y es un proceso epigenético que regula la expresión génica (Miranda and Jones, 2007, Lande-Diner et al., 2007). La metilación del ADN es mediada por las enzimas DNA metiltransferasas, las que transfieren el grupo metilo a la posición C5 de la Citosina y como resultado se crea la metilcitosina (revisado por Jurkowska et al., 2011). **Objetivos. a)** En este estudio nos preguntamos si el promotor del gen de la ataxina-2 está metilado, y si este evento se relaciona con la variabilidad en la edad de debut de la SCA2. **Materiales y métodos.** La investigación se realizó en muestras de ADN de pacientes SCA2, individuos controles así como en pacientes con SCA3 teniendo en cuenta el tamaño de las repeticiones de CAG en ATXN2. El estatus de metilación del promotor ATXN2 se analizó mediante dos estrategias MSP y PCR en tiempo Real en ADN modificado con bisulfito sódico. **Resultados y discusión.** Mediante herramientas bioinformáticas se encontró que 33 de los 100 CpG (33%) de la región promotora del gen ATXN2 tenían una alta probabilidad de encontrarse metilado en el núcleo ó "core" del promotor, localizado entre las bases 230 y 471. Esta región promotora está cerca de los dos posibles sitios ATG (162 y 642) usados en la expresión de ataxina-2, que incluye además el sitio de restricción para SacI que se usó para el clonaje e identificación de este promotor (Aguiar et al., 1999) (Fig.1).

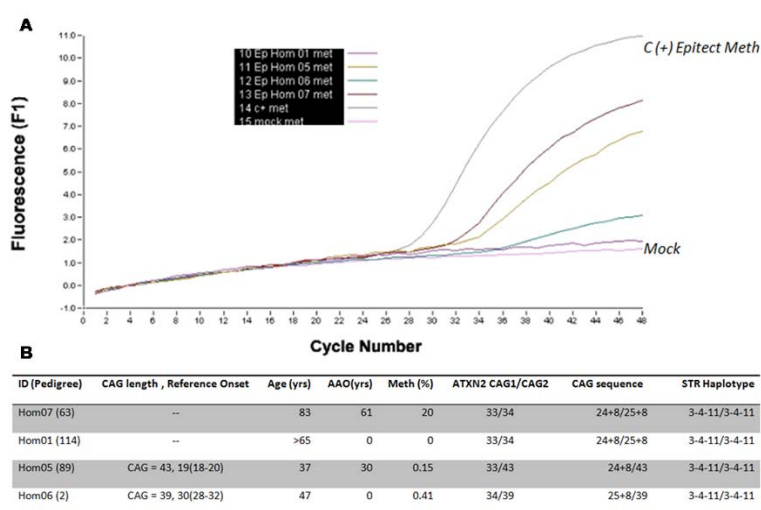


Estandarizamos un ensayo de PCR específica para detectar metilación -MSP- del gen ATXN2. El método detectó la metilación en cinco CpG como se presenta en la Fig. 2a,b. La MSP mostró especificidad para el ADN modificado con bisulfito y rindió la banda esperada en ambas versiones de las reacciones de MSP (Fig. 2b).



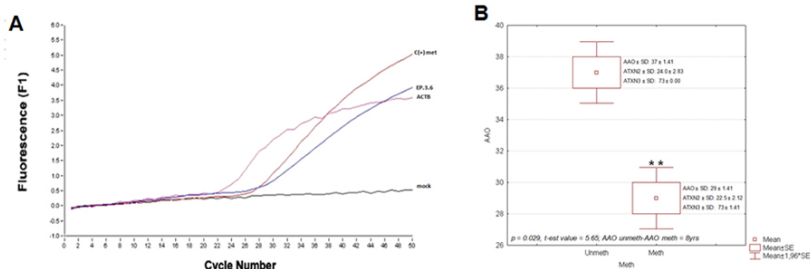
**Figura 2. PCR específica para metilación del promotor ATXN2.** A) Posiciones relativas de los sitios de unión para los oligos metilados y no metilados (se muestran sólo los metilados). Las flechas coloreadas indican los oligos usados para cuantificar los niveles de metilación y las flechas grises indican los de la PCR cualitativa. B) Panel izquierdo: señal del amplificados de una PCR para metilación del promotor ATXN2 en controles y pacientes SCA2. Carril 1 y 10, agua, carriles 2-9 pacientes SCA2 y controles (carriles 4 y 6). Panel derecho: especificidad de la MSP, se muestran los productos de la amplificación de la PCR semi-anidada (carril 1 y 2), siendo el ADN molde el resultante de una primera MSP (carril 4). Carriles 3 y 5 ADN genómico y agua respectivamente. C) Panel izquierdo: análisis de asociación usando datos de la MSP en casos SCA2. Se observó una asociación marginal de la condición M/U un alelo metilado y otro no metilado. D) Panel derecho: experimentos de mezcla sugeridos en la literatura para determinar sensibilidad de la MSP en ATXN2 (La menor detección fue 1ng, que representa 500 copias de genoma).

Usando la MSP encontramos diferencias en los niveles de metilación del promotor ATXN2 en una familia en la cual había anticipación en el debut de la SCA2 sin inestabilidad intergeneracional. Específicamente, el promotor estuvo hipometilado en un hijo afectado con debut de la SCA2 menor que el de su madre afectada, aunque en ambos casos las expansiones eran de 39 CAG para la variante patológica. En otros 9 pacientes, el análisis cuantitativo indicó que la hipermetilación del promotor causaba silenciamiento parcial o completo y que esto se asociaba con expansiones patológicas. Estos hallazgos representan parte de un mecanismo de defensa celular dirigido a reducir la carga citotóxica de la ATXN2 mutante. El estudio de dos pacientes homocigóticos con expansiones de 43 y 39 CAG respectivamente reveló una asociación entre hipermetilación y retardo en el comienzo de la enfermedad (Fig. 3).



**Figura 3. Hipermetilación en homocigóticos SCA2.** A) Registros de PCR tiempo real cuantitativa para el promotor ATXN2 en pacientes cubanos SCA2 homocigóticos con alelos intermedios y completamente penetrantes. B) Phenotypes and haplotypes of the patients, epigenetic information in regard to the clinical status is shown. Reference AO (AAO) for each CAG repeat number is also listed (Almaguer Mederos et al., 2010). Fenotipos y haplotipos de pacientes SCA2, información epigenética relacionada con el estatus clínico. Se muestran las edades de inicio referencia para la población cubana en relación con la longitud del CAG.

También encontramos que la hipermetilación del promotor ATXN2 se asocia con edades de inicio menores en pacientes con SCA3 (Fig. 4), que es una enfermedad de naturaleza similar a la SCA2, pero en la que estaba demostrada que la metilación del gen causal no influenciaba el comienzo de la misma. De manera general mostramos que existe metilación en ATXN2, consistente con un control epigenético de la expresión de ataxina-2 y que las diferencias en la metilación afectan el curso de la enfermedad.



**C**

Cases Identities	ATXN2 CAG1, CAG2	ATXN3 CAG1, CAG2	AAO	Cp Meth ± SEM	Cp Unmeth ± SEM	Absolute PMR
Ep.3.10	26, 26	23, 73	36	0 ± 0.0	26.83 ± 0.53	0
Ep.3.5	22, 22	27, 73	38	0 ± 0.0	23.04 ± 0.81	0
Ep.3.3	21, 21	15, 72	28	33.45 ± 0.52	22.04 ± 0.46	77.88
Ep.3.6	22, 24	37, 74	30	34.81 ± 0.54	0 ± 0.0	100

Cp: Crossing points, PMR: Percent of methylation relative.

## Conclusiones

Podemos concluir que hemos encontrado que el promotor ATXN2 se metila, y que esta marca epigenética fue encontrada en el contexto de expansiones patológicas, asociado con diferentes expresiones clínicas en la SCA2 y la SCA3. Estos hallazgos acentúan que existe una cooperación funcional entre las rutas de las ataxinas lo cual puede causar o limitar la patogénesis asociada. El fenómeno epigenético en el gen de la ataxina-2, podría explicar otras enfermedades vinculadas con los niveles de ataxina-2. En apoyo a esto, mientras nuestro estudio se revisaba Dick et al., 2011 usando un análisis de metilación en todo el genoma (Genome Wide Methylation Analysis –GWMA-) encontraron que el gen ATXN2 estaba significativamente metilado en una serie de casos con enfermedad de la arteria coronaria, lo cual extiende la relevancia de la metilación de ATXN2 a otras patologías y nos brinda un punto de anclaje que independientemente confirma nuestros resultados en las SCAs. Colectivamente, todos nuestros datos apoyan que el control de la concentración de ataxina-2 y su ARNm es central tanto para la función fisiológica como para la patogénesis, este control puede servir como mecanismo diana y como marco conceptual para propuesta de terapias.

## Referencias bibliográficas

- (1) Almaguer-Mederos LE, Falcon NS, Almira YR, et al., Estimation of the age at onset in spinocerebellar ataxia type 2 Cuban patients by survival analysis. 2010. Clin Genet; 78: 169–74.
- (2) Dick K J, Nelson C P, Braund P S, et al., Genome wide methylation analysis in coronary artery disease. Heart, 2011; 97: A42.
- (3) Elden AC, Kim HJ, Hart MP. et al., Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. Nature Genet. 466, 1069-1075, (2010).
- (4) Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. Chembiochem. 2011 Jan 24;12(2):206-22.
- (5) Lande-Diner L, Zhang J, Ben-Porath I, Amariglio N, Keshet I, Hecht M, Azuara V, Fisher AG, Rechavi G, Cedar H. Role of DNA methylation in stable gene repression. 2007. J Biol Chem. 20;282(16):12194-200.
- (6) Lastres-Becker, I., et al., 2008. Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2). Cerebellum. 7, 115-24.
- (7) Miranda TB, Jones PA. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. 2007. J Cell Physiol. 213(2):384-90.
- (8) Neumann M., Sampathu D.M., Kwong L.K., et al., Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. 2006. Science;314:130-133.
- (9) Socal MP, Emmel VE, Rieder CR, et al., Intrafamilial variability of Parkinson phenotype in SCAs: novel cases due to SCA2 and SCA3 expansions. 2008. Parkinsonism Relat Disord.;15(5):374-8.