

ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 2. FUNDAMENTOS MOLECULARES DE LA PREDISPOSICIÓN GENÉTICA A LAS EXPANSIONES TRINUCLEOTÍDICAS EN EL GEN ATXN2.

Autoría principal: José Miguel Laffita Mesa¹

Otros autores: Luís C. Velásquez Pérez, Nieves Santos Falcón, Jorge Michel Rodríguez Pupo, Yanetza González Zaldívar, Gilberto Sánchez Cruz, Luís Almaguer Mederos, Leonides Laguna-Salvia, José A. Valdevila Figueira, Yaimee Vázquez Mojena, Roberto Rodríguez Labrada y Leodani Peña Serrano

Colaboradores: George Auburger, Susana Gispert Sánchez, Dennis Almaguer Gotay, Tania Cruz Mariño, Dany Cuello Almarales, Raciél Moreno Sera, Vivian Kourí, Peter O Bauer, Martin Paucar, Per Svenningsson y Yosbanis Rodríguez Almira¹.

Centro para la Investigación y Rehabilitación de las Ataxias Hereditarias (CIRAH). Centro de Ataxia, Carretera Central Km 5,5. Reparto Edecio Pérez. Holguín. Teléfono. 42-40-90. Fax. 46-15-64.

¹Autor de correspondencia. Correo electrónico laffita@ataxia.hlg.sld.cu

Lic. José Miguel Laffita Mesa (55%). 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 (artículos 2 y 3). Introdujo las técnicas moleculares para el estudio del haplotipo del locus SCA2, así como las de Parkinson causado por los genes SCA3, SCA17. 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.

Dr.C. Luís C Velásquez Pérez (35%). Participó en el análisis estadístico, interpretación de los datos dirigió y realizó la investigación epidemiológica correspondiente al artículo 1. Es el actual director del CIRAH.

Lic. Nieves Santos Falcón (1%). Participó en la generación de datos moleculares.

Dr. Jorge Michel Rodríguez Pupo (1%). Participó en la generación de datos clínicos.

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

Dr.C. Gilberto Sánchez Cruz (1%). Participó en la generación de datos moleculares.

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

Dr. Leonides Laguna-Salvia (1%). Participó en la generación de datos clínicos.

Dr. José A. Valdevila Figueira (1%). Participó en la generación de datos clínicos.

MSc. Yaimee Vázquez Mojeda (1%). Participó en la generación de datos moleculares.

Lic. Roberto Rodríguez Labrada (1%). Participó en la generación de datos clínicos.

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

RESUMEN

Introducción: Las expansiones del trinucleótido CAG causan la ataxia espinocerebelosa tipo 2-SCA2-. También están relacionadas con la enfermedad de Parkinson-EP-, la Esclerosis Lateral Amiotrófica –ELA- y un grupo considerable de neurodegeneraciones y enfermedades neuropsiquiátricas. **Objetivos:** Determinar la frecuencia relativa de los alelos premutados. Determinar si existe relación entre la frecuencia de estos alelos con la prevalencia de la SCA2. 3) Identificar si existen evidencias de la proclividad/susceptibilidad genética de estos alelos. **Resultados:** Se identificaron 753 casos SCA2, distribuidos por todo el país con la mayor prevalencia en Holguín. Cuba presentó la mayor frecuencia de alelos premutados ($\chi^2=204.71, p=0.000$). Los alelos premutados no sólo mostraron inestabilidad mitótica sino además meiótica ó intergeneracional. También se encontró asociación entre el número de interrupciones de CAA y el tamaño del CAG total. Se identificaron mutaciones *de novo* en el gen SCA2 confirmando la mutagenicidad de los alelos premutados. En este estudio se demuestra que existen versiones pre-mutadas en el gen SCA2, las cuales son la fuente para nuevos casos de SCA2 en próximas generaciones. Estas variantes genéticas fueron caracterizadas en este estudio encontrándose factores moleculares que suceptibilizan a estas variantes a que se trasmitan en su versión patológica. Todos estos hallazgos son una evidencia del origen y la alta prevalencia de la SCA2 en Cuba, y el punto de partida para “atajar” el surgimiento de nuevos focos de la enfermedad en nuestro país. Fue publicado en la revista **European Journal of Human Genetics** (ISSN 0340-6717), es una de las más prestigiosas de su tipo a

nivel internacional. Es de publicación semanal, el ranking de acuerdo a la TOMSON-Reuters es 30 de 162 entre las revistas que publican en el tema “*Genetics and Heredity*” y 73 de 289 en “*Biochemistry and Molecular Biology*”. En ciencias en general ocupa el 666 de más 8000 revistas indexadas en la Web of Science. Su factor de impacto es muy alto, de 4.400, aplica la revisión *peer review*. Es la revista oficial de la **European Society of Human Genetics**, la cual es homóloga a la **American Society of Human Genetics**. El índice de rechazo es alto, de un 80% con altos estándares de publicación y nunca autores cubanos habían podido publicar en esta revista, por lo que la actual publicación representa un prestigio para nuestra provincia y el país. La misma pertenece a la editorial **Macmillan Publishers**, que además pertenece a **NATURE PUBLISHING GROUP**. Este trabajo además ha alcanzado citas en otras revistas de impacto como **Human Genetics** y **Clinical Genetics**. En el corto tiempo de publicación también ha sido citada en un libro de la **OXFORD UNIVERSITY PRESS**. Estos hallazgos fueron además incluidos en el apartado de **Populational Genetics of SCA2** de la enciclopedia **Online Mendelian Inheritance in Man –OMIM-** de la **Johns Hopkins University** de los institutos de salud pública de EE-UU. **Conclusiones:** Los datos relacionan a los alelos largos en la generación de expansiones de CAG causantes de la SCA2 y otras neurodegeneraciones como la ELA. Confirman además, que las elevadas tasas de prevalencia de la SCA2 son un resultado de la alta predisposición genética de la población cubana.

COMUNICACIÓN CORTA

Antecedentes

Una de las mutaciones dinámicas más comunes son las expansiones del trinucleótido Citosina-Adenina-Guanina -CAG-. La cual es la causa de la ataxia espinocerebelosa tipo 2 -SCA2-, y de un grupo heterogéneo de neurodegeneraciones conocidas por poliglutaminopatías ó enfermedades poliglutamínicas. La mutación SCA2, se localiza en el sitio 12q24.1 del genoma humano, ahí se encuentra un grupo de genes dentro de los cuales está el gen que codifica la ataxina-2 (Pulst et al., 1996, Imbert et al., 1996, Sanpei et al., 1996). Como norma general las expansiones de tripletes de CAG \geq 34 se asocian con la SCA2. El daño celular en SCA2 se asocia con una degeneración de las células de Purkinje de cerebelo así como de otros grupos neuronales como las neuronas pontinas (Estrada et al., 1999). Los pacientes SCA2 exhiben un síndrome cerebeloso progresivo caracterizado por ataxia, disartria cerebelosa disimetría y disidiadacocinesia. La progresión de este cuadro lleva generalmente a la muerte por fallo respiratorio (Lastres-Becquer et al., 2008, Velázquez-Pérez et al., 2011). El rango de variación del CAG en la población saludable es de 13-31 unidades repetidas, en tanto que a partir de 34CAG se hacen evidentes los signos clínicos de SCA2 (Lastres-Becker et al., 2008). Siendo 22CAG el más común en la

población. Existe un rango de incertidumbre diagnóstica que incluye 32-33 repeticiones de CAG (Laffita-Mesa et al., 2012). En analogía con otras enfermedades de similar naturaleza se supone que aquellos alelos ≥ 23 CAG están predispuestos ó “premutados”, pudiendo expandirse en generaciones sucesivas. Estas inestabilidades paso-a-paso ó súbitamente alcanzarían la patogénesis, sosteniendo la prevalencia de SCA2 en las distintas poblaciones.

Epidemiología molecular de la mutación SCA2 en Cuba, fenotipo

Los análisis moleculares de los genes SCA1-3, SCA6, SCA17 y DRPLA identificaron 753 pacientes con SCA2 y 7173 familiares asintomáticos los cuales pertenecen a 200 familias. El 86.79% de los Pacientes con SCA estuvieron afectados por la SCA2. En la provincia de Holguín, la prevalencia de SCA2 promedió 40.18×10^5 habitante, acentuándose en el municipio de Báguanos con 141.66×10^5 . Por otra parte, los portadores de la mutación se distribuyen por todo el país (Fig. 1).

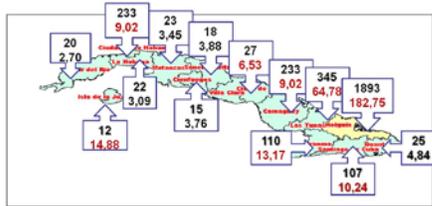


Figura 1. Tasas de prevalencia de la mutación SCA2 en Cuba. Se presentan las tasas de prevalencia de la mutación SCA2 en las distintas provincias de Cuba en el período 2003-2007. La tasa general fue $26,35 \times 10^5$ habitantes. En cada cuadro perteneciente a cada provincia se indica el número de portadores y la tasa de prevalencia. Los números en rojo indican los valores más altos, los cuales estuvieron distribuidos en todo el país.

La estabilidad temporal de la prevalencia de la SCA2 sugiere la existencia de cromosomas premutados con CAG puro, los cuales pudieran actuar como reservorio de expansiones nuevas. La longitud del CAG correlacionó inversamente con la edad de debut de la ataxia, contribuyendo al 80% de la variabilidad. Se observó anticipación genética en el 80% de las transmisiones. La inestabilidad del trinucleótido CAG repetido fue superior en las transmisiones paternas mientras que se observó anticipación sin expansiones intergeneracionales en el ~11% de los casos (Velázquez-Pérez et al., 2009).

Polimorfismos genéticos del CAG en el locus SCA2. Variación en la población cubana y alelos premutados.

Se estudiaron los polimorfismos genéticos del gen SCA2 en una amplia muestra de ~3000 cromosomas de la población Cubana. Se encontró que la frecuencia de alelos largos e intermedios del gen SCA2 (≥ 23 -33CAG) en Cuba es la mayor a nivel internacional ($\chi^2 = 73.67$, $p = 0.000$). La distribución de haplotipos mostró una tendencia hacia los alelos largos ó premutados, los cuales sobrepasaban en número a los alelos cortos ($\chi^2 = 204.71$, $p = 0.000$). Esta población altamente polimórfica mostró la mayor variabilidad en la secuencia del CAG, caracterizada por pérdida de las interrupciones CAA que brindan estabilidad genética a la secuencia de CAG (Fig. 2).

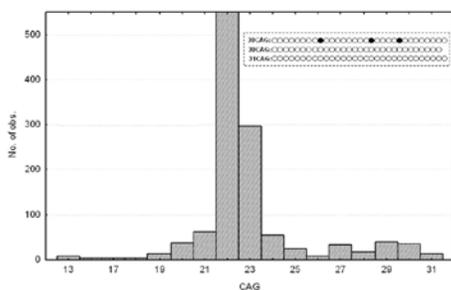


Figura 2. Distribución de frecuencias de alelos normales en la población Cubana y estructura interna de la secuencia de

CAG en alelos premutados. Los círculos blancos representan el CAG, y los negros las interrupciones CAA.

En la medida que el CAG aumentaba en su talla, se evidenció más frecuencia de pérdida de las interrupciones de CAA. Sugiriendo que el mecanismo de expansiones es potenciado por la pérdida de estas interrupciones. Se analizaron los haplotipos usando marcadores genéticos extra e intragénicos. En familias SCA2 se encontró como haplotipo de microsatélites el 3-4-11, el cual fue además visto en alelos normales premutados. Esto unido a la pérdida de las interrupciones CAA así como al incremento del CAG define un haplotipo de riesgo ó contexto genético predispuesto (Laffita-Mesa et al., 2010). Adicionalmente, los alelos largos mostraron inestabilidad mitótica (somática) y meiótica (intergeneracional). Estos datos apoyan la relación entre la alta prevalencia de la SCA2 y la mayor frecuencia de alelos premutados a nivel internacional. Esto sugiere la alta predisposición genética a las expansiones del trinucleótido CAG en el gen SCA2. Esta predisposición puede además explicar el surgimiento de casos SCA2, EP, ó ELA aparentemente esporádicos (Laffita-Mesa et al., 2012).

La pérdida de las interrupciones de CAA es un factor de riesgo para expansiones en el gen ATXN2.

Se haplotiparon 13 familias cubanas SCA2 y 89 controles, usando 6 marcadores de microsatélites intra y extragénicos a la mutación SCA2. Se evidenció desequilibrio de ligamiento (Prueba exacta de Fisher, $p=0.000$) entre la mutación SCA2 y algunos alelos de los microsatélites. El análisis de secuencia del CAG en 113 cromosomas reveló alelos largos 30-31CAG, con CAG puro o carentes de la interrupción CAA en el extremo 5' de la secuencia que causa SCA2. Estos alelos mostraron similar haplotipo (3-4-11) para los marcadores de microsatélites D12S1332-D121672-D12S1333 que las expansiones patogénicas. Significativamente, el alelo 4 del marcador intragénico D12S1672 se asoció ($p=0.0070$) con la pérdida de interrupciones CAA no sólo en premutaciones (29-31CAG) sino además con alelos de 22CAG con la configuración 13CAG-(CAA)-8CAG en su secuencia. En una muestra de 500 ADN (27-31CAG) se encontró una correlación significativamente alta ($R^2 = 0.30$, $p= 0.0000$) entre la inestabilidad somática y el tamaño del CAG. Estos datos confirman la existencia de un reservorio de mutaciones en la población saludable, que muestran el mismo linaje que las expansiones patológicas SCA2. Además, sugieren un posible mecanismo molecular explicativo de las mutaciones en el locus SCA2. Adicionalmente, confirman la naturaleza inestable de las expansiones largas e intermedias en el soma (Laffita-Mesa et al., 2009).

Evidencias confirmatorias del origen de expansiones patológicas partir de alelos premutados.

Mediante pesquisa activa, usando el método clínico y los criterios del ESCORIAL, aceptado internacionalmente (Brooks et al., 2000), se identificó un caso índice con ELA, de naturaleza aparentemente esporádica con genotipo 22/32CAG en el gen

ATXN2. El alelo de 32 CAG, confiere riesgo elevado a ELA (Elden et al., 2010). A través de la investigación se identificaron 3 casos adicionales en la misma familia, con fenotipos ELA definidos y cada uno con expansiones intermedias desde 31 hasta 35CAG. Estas expansiones no sólo estaban en el rango de ELA, sino que alcanzaron el valor mínimo de expansiones de CAG que causan SCA2 (o sea ≥ 34 CAG). Significativamente, los padres de estos casos no fueron portadores de expansiones patológicas, sino que su genotipo para ATXN2 fue 22/25CAG con el alelo de 25CAG premutado, dado que carecía de varias interrupciones de CAA. Por tanto, las expansiones de los padres sobrepasaron el rango normal y alcanzaron la categoría patológica en los hijos. Como promedio la inestabilidad intergeneracional fue 6.25 ± 2.87 unidades de CAG ganadas por parte de alelos con 25.5 ± 1 CAG, resultando en mutaciones nuevas con CAG ~ 32 CAG. Este CAG promedio es mayor que el umbral específico para ELA el cual es de >30 CAG (Lee et al., 2011, Gispert et al., 2012), confirmando la naturaleza patogénica de estas mutaciones *de novo*. El haplotipo SNP usando los marcadores intragénicos rs695871 (G/C) y rs695872 (T/C) fue CC, el cual fue encontrado en India en alelos premutados (Choudry et al., 2001) y en familias fundadoras SCA2.

Expansiones del trinucleótido CAG en el gen SCA2/ATXN2 y riesgo a ELA. El meta-análisis abarcó 7, 634 casos de ELA y 13, 391 casos controles, los cuales fueron reportado en 12 estudios publicados entre 2010 y 2012, incluyendo muestras de EUA, Europa, Francia-Canadá, China, Italia, Bélgica Flamenca, Alemania y Turkía. Se evaluó la hipótesis del riesgo conferido por las expansiones largas (24-31CAG) e intermedias (32-33CAG) en el gen ATXN2/SCA2. Para expansiones entre 24-27CAG, no se detectó riesgo ($\chi^2 = 16.95$, $df = 11$, $P = 0.11$, $OR = 1.02$; 95% IC 0.91-1.16), en contradicción con la idea prevalente (Elden et al., 2010), pero confirmando la naturaleza no-patogénica de los alelos de 25 CAG que originaron mutaciones *de novo* en casos cubanos con ELA. Solamente a partir de expansiones ≥ 30 CAG se detectó un riesgo significativamente alto para ELA ($OR = 2.16$; 95% IC 1.76-2.65, $\chi^2 = 187.88$, $P = 0.000$). Esto representa el doble de alelos intermedios enriqueciendo los casos de ELA, comparado con la población saludable. Con la exclusión de los estudios más precisos que contribuyeron al metanálisis, se alcanzó homogeneidad en la determinación de riesgo relativo lo cual imputa un riesgo de 1.77; 95% IC 1.55-2.03 para ELA por parte de los alelos intermedios ≥ 30 CAG. Este riesgo fue mayor para expansiones ≥ 32 CAG (2.62; 95% IC 2.23-3.09, $\chi^2 = 633.97$, $df = 10$, $P = 0.0000$). Este análisis corroboró la naturaleza patogénica de las mutaciones nuevas que encontramos en nuestra población, las cuales surgieron de alelos no patogénicos (Laffita-Mesa et al., 2013).

Referencias bibliográficas

- (1) Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. (2000). El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1, 293–299.
- (2) Choudhry S, Mukerji M, Srivastava AK, et al. (2001). CAG repeat instability at SCA2 locus: anchoring CAA interruptions and linked single nucleotide polymorphisms. *Hum Mol Genet* 10(21), 2437-46.
- (3) Elden AC, Kim HJ, Hart MP et al. (2010). Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* 466, 1069–1075.
- (4) Estrada R, Galarraga J, Orozco G, Nodarse A, Auburger G. Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2): morphometric analyses in 11 autopsies. (1999) *Acta Neuropathol (Berl)*, 97: 306-10.
- (5) Gispert S, Kurz A, Waibel S et al. (2011). The modulation of Amyotrophic Lateral Sclerosis risk by Ataxin-2 intermediate polyglutamine expansions is a specific effect. *Neurobiol. Dis.*, doi:10.1016/j.nbd.2011.08.021.
- (6) Imbert G, Saudou F, Yvert G, et al. (1996) Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nat Genet.* 14(3), 285-91.
- (7) Laffita Mesa JM, Velázquez PL, Auburger G, et al. (2009) Loss of CAA interruption in large alleles is a risk factor to ATX2 gene instability: a haplotype and sequence based study in large Cuban kindreds. XVIII WFN World Congress on Parkinson's disease and Related Disorders and the Melvin Yahr International Parkinson's Disease Foundation Miami FL December 13-16. *Parkinsonism and related disorders* Volume 15, Supplement 2.
- (8) Laffita-Mesa JM, Rodríguez Pupo JM, Moreno Sera R et al., *De novo* mutations in ataxin-2 gene and ALS risk. Enviada a *BRAIN*.
- (9) Laffita-Mesa JM, Velázquez-Pérez LC, Santos Falcón N et al. (2012), Unexpanded and intermediate CAG polymorphisms at the SCA2 locus (ATXN2) in the Cuban population: evidence about the origin of expanded SCA2 alleles. *Eur J Hum Genet.* 2011. doi:10.1038/ejhg.2011.154.
- (10) Laffita-Mesa JM Velázquez-Pérez LC, Santos Falcón N et al. (2010). Large normal polyQ runs underlies the highest prevalence of SCA2 in Cuba. Sheraton Hotel, Buenos Aires Argentina. MDS. Fourteen International Congress of Parkinson's disease and Movement Disorders.

- (11) Lastres-Becker, I., et al. (2008) Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2). *Cerebellum*. 7, 115-24.
- (12) Lee T, Li YR, Ingre C et al. (2011) Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions in European ALS patients. *Hum Mol Genet* 20, 1697–1700.
- (13) Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T, et al. (1996) Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Genet*. 14(3), 269-76.
- (14) Sanpei K, Takano H, Igarashi S, et al. (1996) Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT. *Nat Genet*. 14(3), 277-84.
- (15) Velázquez Pérez L, Sánchez Cruz G, Santos Falcón N, et al. (2009) Molecular epidemiology of spinocerebellar ataxias in Cuba: Insights into SCA2 founder effect in Holguin. *Neuroscience Letters*. 454, 157–160.
- (16) Velázquez-Pérez L, Rodríguez-Labrada R, García-Rodríguez JC, Almaguer-Mederos LE, Cruz-Mariño T, Laffita-Mesa JM. (2011). A Comprehensive Review of Spinocerebellar Ataxia Type 2 in Cuba. *Cerebellum* 10:184–198.