

Centro para la Investigación y Rehabilitación de las Ataxias Hereditarias (CIRAH)
“Carlos J. Finlay”.

GENES MODIFICADORES EN ENFERMEDADES POLIGLUTAMÍNICAS.

*Lic. Luis Enrique Almaguer Mederos.

**Lic. Yanetza González Zaldivar.

***Lic. Dennis Almaguer Gotay.

****Lic. José Miguel Laffita Mesa.

*****MSc. Dany Coello Almarales.

*Lic. Ciencias Biológicas. Aspirante a Doctor en Ciencias Biológicas.
Profesor Auxiliar. Teléfono: (024)468495. leam@crystal.hlg.sld.cu.

**Lic. Microbiología.: yanetza@ataxia.hlg.sld.cu.

***Lic. Química. dennis@ataxia.hlg.sld.cu.

****Lic. Microbiología. laffita@ataxia.hlg.sld.cu

*****Lic. Ciencias Biológicas. MSc. Neurociencias.
dany@ataxia.hlg.sld.cu.

Centro para la Investigación y Rehabilitación de las Ataxias Hereditarias (CIRAH)
“Carlos J. Finlay”. Rpto. “Oscar Lucero, Carretera Central Km 5^{1/2} vía La Habana.
Teléfono: (024)424090.

RESUMEN

Las enfermedades poliglutamínicas constituyen un grupo creciente de enfermedades neurodegenerativas humanas, causadas por la expansión de secuencias repetitivas

de CAG que son traducidas para dar lugar a proteínas con dominios poliglutamínicos expandidos. La edad de inicio es un marcador fenotípico para estas enfermedades, y muestra una gran variación en las familias afectadas. El número de repeticiones de CAG contenido en los genes causales, explica entre el 47 y 80% de la variabilidad observada en la edad de inicio. Para explicar la varianza restante ha sido propuesta la hipótesis de la existencia de genes modificadores. Aquí realizamos una revisión actualizada acerca de esta temática, abordando las estrategias más usadas para su identificación, los principales hallazgos obtenidos y sus implicaciones. La identificación de estos genes contribuye al esclarecimiento de los mecanismo patológicos involucrados en estas enfermedades, y puede conducir a la proposición y diseño de estrategias terapéuticas potenciales.

Palabras clave: apoptosis, enfermedades poliglutamínicas, excitotoxicidad, genes modificadores, hidrolasa carboxi-terminal de ubiquitina, metilentetrahidrofolato reductasa.

INTRODUCCION

¿Genes modificadores? Definición y estrategias para su identificación.

El fenómeno de interacción entre diferentes genes en el proceso ontogenético del desarrollo fue inicialmente descrito por Bateson hacia 1906 tomando por base el descubrimiento del mendelismo [1]. Numerosas formas de interacción fueron descritas a partir de entonces; los genes complementarios, los genes supresores, y sus fenómenos asociados de epistasis y criptomería, la manifestación intermedia, la polimería, la pleiotropía y los genes modificadores, son las categorías principales de la interacción entre genes no alélicos [2].

En particular, los genes modificadores pueden ser definidos como aquellos que aceleran o debilitan la manifestación fenotípica de otros genes, a través de formas transitorias de interacción. Pueden o no tener una manifestación propia, pero varían indefectiblemente el efecto de otros genes no alélicos [2].

DESARROLLO

¿Cuáles estrategias pueden seguirse para la identificación de genes modificadores?

Las estrategias más utilizadas para la identificación de genes modificadores son el estudio de genes candidatos y el desarrollo de una pesquisa global del genoma [3]. Esta última tiene la ventaja de no hacer asunciones apriorísticas acerca de los procesos biológicos subyacentes al fenómeno en estudio, pero se ve coartada por el gran número de individuos necesarios para el desarrollo de las investigaciones y por su elevado costo. La estrategia de genes candidatos requiere de un conocimiento previo acerca de la biología subyacente al carácter particular bajo estudio, sobre cuya base se procede a la identificación de los genes involucrados. Su principal limitante está en que pudieran no ser estudiados genes de importancia que usualmente no sean considerados como tal [3].

Enfermedades poliglutamínicas. Generalidades.

Las enfermedades poliglutamínicas (poliQ) constituyen un grupo de al menos nueve patologías humanas causadas por la expansión de secuencias repetitivas de CAG - (CAG)_{expandido}- situadas en la región codificadora de los genes causales. Este grupo incluye a la enfermedad de Huntington (HD), a la atrofia dentadorubro-pálidoluysiana (DRPLA), a la atrofia muscular espinobulbar (SBMA), y a varias ataxias espinocerebelosas (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 y SCA17). Se trata de síndromes neurodegenerativos progresivos que siguen un patrón de herencia

autosómico dominante, con la única excepción de la SBMA -ligada al sexo-. Estas enfermedades comparten varias características: los síntomas aparecen solamente una vez superado cierto umbral de repeticiones de CAG, usualmente entre 36 y 40 unidades; existe una fuerte correlación inversa entre la longitud de la secuencia repetitiva y la edad de inicio de la enfermedad; las secuencias repetitivas expandidas muestran inestabilidad somática e intergeneracional; solo resultan afectadas las neuronas a pesar de la expresión ubicua de las proteínas mutantes, y muestran agregados proteínicos intracelulares [4].

La edad de inicio ha sido el marcador clínico clásico para describir la severidad del síndrome clínico en las enfermedades poliQ, y es ampliamente utilizada para estudios de correlación genotipo/fenotipo. A pesar de que el (CAG)_{expandido} resulta el principal determinante de la edad de inicio, solo justifica un porcentaje de la variabilidad observada para este indicador clínico [5]. Por esta razón, ha sido propuesta la existencia de otros factores genéticos, ambientales y/o estocásticos con efecto modificador sobre la edad de inicio en enfermedades poliQ [6]. Entre las hipótesis planteadas para dar explicación a este fenómeno, una de las más apeladas es la que propone la existencia de genes modificadores.

Genes modificadores de la edad de inicio en enfermedades poliglutamínicas.

Los genes estudiados en calidad de modificadores de la edad de inicio en enfermedades poliQ se agrupan en alguna de las siguientes categorías: a) genes que contienen secuencias repetitivas de CAG; b) genes involucrados en el metabolismo de lipoproteínas; c) genes implicados en procesos de muerte celular; d) genes involucrados en procesos metabólicos.

Genes que contienen secuencias repetitivas de CAG.

SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA12, SCA17, DRPLA, KCNN3, HD, TNRC22 y RAI1.

A pesar de que la lista de proteínas que potencialmente pudieran interactuar con las proteínas patológicas en las enfermedades poliQ es muy larga, la capacidad de los segmentos poliQ de interactuar unos con otros convierte a las proteínas con segmentos poliQ no patológicos en excelentes candidatos para su secuestro en agregados nucleares. La naturaleza polimórfica de tales secuencias repetitivas podría potencialmente impactar sobre la velocidad de formación de agregados, lo que a su vez, podría influir sobre la edad de inicio de la enfermedad.

Hayes et al. (2000) [7] realizaron un estudio para evaluar la influencia de 10 genes con secuencias repetitivas de CAG (SCA1, SCA3, SCA6, SCA7, SCA17, DRPLA, KCNN3, HD, RAI1 y TNRC22) sobre la edad de inicio en 46 pacientes con SCA2. Uno de los genes contribuyó a explicar un 4,1% adicional de la varianza en la edad de inicio después de ajustar el efecto del (CAG)_{expandido}. Este locus fue luego investigado en 68 pacientes con SCA3 pero no fue encontrado efecto sobre la edad de inicio. Más adelante fue encontrado que RAI1 puede explicar alrededor del 13% de la variabilidad en la edad de inicio en la SCA2 [8]. Recientemente en una muestra de pacientes cubanos con SCA2, fue hallado que el gen SCA6 modifica la edad de inicio en la SCA2 [5].

Genes involucrados en el metabolismo de lipoproteínas.

Apolipoproteína E (apoE).

La apoE desempeña un rol central en el transporte de colesterol, reflejado por la asociación de la apoE a una variedad de lipoproteínas pertenecientes a distintas clases según su peso molecular, por su habilidad para interactuar con dos

receptores hepáticos diferentes (receptores LDL y apoE), y por su síntesis en varios tejidos del organismo -principalmente en el hígado y en el cerebro- [9]. Hasta la fecha han sido identificados 3 alelos comunes de la apoE que codifican para las isoformas E2, E3 y E4 [10], y varias variante raras [9]. La isoforma E4 (112arg y 158arg) ha sido asociada un mayor riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer (AD) [11]; la apoE4 parece actuar como una chaperona molecular, facilitando la agregación del β -amiloide [12].

El gen apoE ha sido el más extensamente estudiado como candidato a modificador de la edad de inicio en pacientes con la HD, habiéndose reportado resultados contradictorios. Así, Rubinsztein et al. (1997) [13] exploraron la influencia de las distintas variantes alélicas y genotípicas de la apoE sobre la edad de inicio en 293 pacientes afectados, no habiendo encontrado ninguna asociación significativa. Sin embargo, en otro estudio realizado en 138 pacientes fue encontrado que el genotipo E3/E3 estuvo asociado a una edad de inicio más temprana en sujetos masculinos, sugiriendo que el gen apoE influye sobre la edad de inicio en estos pacientes, y que la existencia de diferencias en el curso del proceso neurodegenerativo en la HD podrían dar lugar a efectos género-específicos sobre la edad de inicio [14].

Genes involucrados en procesos de muerte celular.

Proteína supresora de tumores P53 (TP53).

La p53 tiene 393 aminoácidos de longitud, y ha sido demostrado que las dos variantes del polimorfismo del codón 72 (Arg/Pro) en el gen TP53, difieren con respecto a su capacidad para inducir apoptosis; la variante arg72 induce la apoptosis con mucha mayor facilidad que la variante pro72 [15]. Adicionalmente, ha sido demostrado que el dominio patogénico de la htt interactúa con factores transcripcionales nucleares, y potencialmente modula los eventos transcripcionales

inducidos por la TP53 [16]. Estas propiedades del polimorfismo R72P lo convierten en un buen candidato como modificador de la edad de inicio en la HD.

Dos estudios han sido realizados para evaluar la influencia del polimorfismo R72P del gen TP53 sobre la edad de inicio en pacientes con la HD. En el primero fueron estudiados 77 pacientes de la India, y fue encontrado que este polimorfismo justificaba el 12,6% de la variabilidad en la edad de inicio no explicada por el (CAG)_{expandido} en el gen IT15 [17]. O sea, fue demostrado que variaciones en el gen TP53 pueden modular la edad de inicio en la HD. Sin embargo, Arning et al (2005) [18] replicaron el estudio en 167 pacientes HD alemanes no relacionados, no encontrando asociación entre los tres genotipos posibles para el polimorfismo R72P y la edad de inicio de la enfermedad. Probablemente, en las diferencias étnicas entre los dos grupos esté la explicación a la discordancia de los resultados obtenidos.

DNasa humana activada por caspasa (hCAD).

La hCAD está involucrada en la fase ejecutora de la muerte celular por apoptosis; es una de las nucleasas que participan en la formación del patrón nucleosomal durante la fase final de la apoptosis [19]. Dadas las evidencias existentes que sugieren un vínculo entre varias enfermedades poliQ y apoptosis [20], la hCAD es un excelente gen candidato a modificador de la edad de inicio en estas enfermedades.

Para evaluar la influencia del polimorfismo R196K del gen hCAD sobre la edad de inicio en pacientes con la HD, fueron estudiados 77 pacientes de la India, de lo que se obtuvo que este polimorfismo justifica el 6% de la variabilidad en la edad de inicio no explicada por el (CAG)_{expandido} en el gen IT15 [17]. Los resultados del estudio de casos-contróles indicaron que el genotipo GG (que codifica para homocigóticos RR) en el gen hCAD confiere protección a los pacientes HD en comparación con los

otros dos genotipos GA y AA. Según los autores, la relevancia funcional de estas observaciones demanda la realización de nuevos estudios.

Genes involucrados en procesos metabólicos.

Receptor de kainato GluR6.

Rubinztein et al. (1997) [13] encontraron asociación entre la edad de inicio en la HD y una secuencia repetitiva de TAA del gen GluR6 que codifica para el receptor de kainato. La variación en este polimorfismo explicó el 13% de la varianza de la edad de inicio no debida al (CAG)_{expandido}. Estos resultados implican una excitotoxicidad mediada por el GluR6 en la patogénesis de la HD. Anteriormente había sido propuesta la hipótesis de la excitotoxicidad como mecanismo patogénico en la HD, a partir del descubrimiento de que las neuronas espinosas del estriado reciben aferencias de la corteza a través del glutamato [21].

El estudio de Rubinztein et al. (1997) [13] fue replicado posteriormente en 258 pacientes HD no relacionados [22]. Fue confirmado que el alelo 155 está asociado con una edad de inicio más temprana; esta asociación explicó solamente una pequeña porción de la variabilidad de la edad de inicio en la muestra estudiada de pacientes con la HD (0,6%).

GRIN2A y GRIN2B.

Basados en las evidencias existentes acerca de un posible rol de la excitotoxicidad mediada por receptores NMDA (N-Metil-D- Aspartato) en la patogénesis de la HD, Arning et al. (2005) [23] propusieron que los genes que codifican para las diferentes subunidades que conforman los complejos multiméricos de receptores NMDA representan genes candidatos a modificadores de la edad de inicio en la HD. Para demostrar tal hipótesis ellos estudiaron 167 pacientes HD, y encontraron que un 12,3% de la varianza residual podía ser atribuida a variaciones en el genotipo

GRIN2B, y un 4,5% adicional a variaciones en el genotipo GRIN2A. Concluyeron que estos dos genes pueden influir sobre la edad de inicio en la HD, de lo que podrían derivarse estrategias neuroprotectoras para individuos afectados o en riesgo.

Hidrolasa carboxi-terminal de ubiquitina (UCHL1).

El UCHL1 pertenece a una familia de genes cuyos productos hidrolizan pequeños aductos C-terminales de la ubiquitina y generan el monómero de ubiquitina. Notablemente, han sido asociadas variantes polimórficas específicas de la UCHL1 - I93M y S18Y- a la enfermedad de Parkinson (PD) [24]. Estos polimorfismos se encuentran relacionados con las actividades ligasa e hidrolasa de la UCHL1, vinculadas a la degradación proteasómica de proteínas cuya alteración podría acarrear aberraciones en la ruta proteolítica conduciendo a la agregación de proteínas [24]. Estas características convierten al gen UCHL1 en un buen candidato a modificador de la edad de inicio en enfermedades poliglutamínicas.

En un estudio realizado en 138 pacientes con la HD y en 136 sujetos controles, fueron examinados los polimorfismos I93M y S18Y del gen UCHL1; la mutación I93M no fue identificada; no obstante, el polimorfismo S18Y estuvo presente en el 17% de los pacientes examinados [25]. A este polimorfismo le fue atribuido el 13% de la varianza residual en la edad de inicio. Además, el S18Y fue encontrado en tres de los cuatro pacientes con edades de inicio anormalmente tardías, confirmándose su efecto modificador sobre la edad de inicio.

Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR).

La metilentetrahidrofolato reductasa cataliza la conversión del 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, un co-sustrato para la remetilación de la homocisteína a metionina. Recientemente fue encontrada una asociación entre esta enzima y la edad de inicio en 171 pacientes con la HD [26]. Los pacientes

homocigóticos para el alelo MTHFR-1298-CC mostraron una edad de inicio significativamente más temprana. Por el contrario, no encontraron que la cistationina betasintasa (CBS), la metionina sintasa reductasa (MSR) o la metionina sintasa (MS), afectaran la edad de inicio en estos pacientes. Los autores sugirieron que la determinación del número de repeticiones de CAG y de los polimorfismos de la MTHFR, facilitarían la pesquisa de sujetos para el estudio de sustancias neuroprotectoras.

CONCLUSIONES

La identificación de genes con efector modificador sobre el fenotipo clínico en las enfermedades poliglutamínicas, contribuye notablemente al esclarecimiento de los mecanismo patológicos involucrados, y puede conducir a la proposición y diseño de estrategias terapéuticas potenciales.

ABSTRACT: Modifying genes in poliglutaminic diseases.

Poliglutaminic diseases are an increasing group of human neurodegenerative diseases caused by the expansion of repetitive sequences of CAG which give way to expanded poliglutaminic domains proteins. Ages of onset are a phenotypic marker for these diseases and show a great variation in the affected families. The number of CAG content repetitions in the causal genes, explains a 47 to 80 % of the variability of the age of onset. To explain the remaining variability, the hypothesis of modifying genes has been proposed. We have performed an updated revision of the the subject approaching the more utilized techniques to its identification, the principal findings and its implications. The identification of these genes contribute to clarify the involved pathological mechanisms in these diseases and might conduct to the proposition of potential therapeutic strategies.

Key Words: Apoptosis, Poliglutaminic diseases, excitotoxicity, modifying genes, Ubiquitine carboxiterminal Hydrolase, methylenetetrahydrofolate reductase.

REFERENCIAS

1. Vogel F, Motulsky AG. Human Genetics: Problems and Approaches. 1st ed Springer-Verlag Berlin; 1989.
2. Strachan T, Read AP. Human Molecular Genetics. 3th ed. Garland Science, 2003.
3. Ljungquist B, Berg S, Lanke J, et al. Internacional Longevity Center Workshop Report: "Longevity genes: From primitive organisms to humans". Nature Genetics 1998; 11: 376–381.
4. Leznicki P. Aggregation and toxicity of the proteins with polyQ repeats. Postepy Biochem. 2005;51(2):215-22.
5. Pulst SM, Santos N, Wang D, Yang H, Huynh D, Velásquez L, Figueroa KP. Spinocerebellar ataxia type 2: polyQ repeat variation in the CACNA1A calcium channel modifies age of onset. Brain 2005.
6. The U.S.–Venezuela Collaborative Research Project and Nancy S. Wexler. Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. PNAS 2004; 101(10): 3498–3503.
7. Hayes S, Turecki G, Brisebois K, Lopes- Cendes I, Gaspar C, et al. CAG repeat in RAI1 is associated with age at onset variability in spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2). Hum Mol Genet 2000; 9 (12): 1753-58.
8. Chattopadhyay B, Ghosh S, Gangopadhyay PK, Das SK, Roy T, Sinha KK, et al. Modulation of age at onset in Huntington's disease and spinocerebellar

- ataxia type 2 patients originated from eastern India. *Neurosci Lett.* 2003; 17; 345(2):93-6.
9. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988;240: 622-630.
 10. Zannis VI, Just PW, Breslow JL. Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am. J. Hum. Genet.* 1981;33: 11-24.
 11. Dal Forno G, Carson KA, Brookmeyer R, Troncoso J, Kawas CH, Brandt J. APOE genotype and survival in men and women with Alzheimer's disease. *Neurology* 2002; 58:1045-1050.
 12. Hyman BT, West HL, Rebeck GW, Buldyrev SV, Mantegna RN, Ukleja M, Havlin S, Stanley HE. Quantitative analysis of senile plaques in Alzheimer disease: observation of log-normal size distribution and molecular epidemiology of differences associated with apolipoprotein E genotype and trisomy 21 (Down syndrome). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1995;92: 3586-3590.
 13. Rubinsztein DC, Leggo J, Chiano M, et al. Genotypes at the GluR6 kainate receptor locus are associated with variation in the age of onset of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:3872-3876.
 14. Kehoe P, Krawczak M, Harper PS, Owen MJ, Jones AL. Age of onset in Huntington disease: sex specific influence of apolipoprotein E genotype and normal CAG repeat length. *J Med Genet.* 1999;36(2):108-11.
 15. Dumont P, Leu J, Pietra AC, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nature Genet.* 2003; 33: 357-365.
 16. Steffan JS, Kazantsev A, Spasic-Boskovic O, Greenwald M, Zhu YZ, Gohler H, et al. The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-

- binding protein and represses transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000;97:6763–6768.
17. Chattopadhyay B, Baksi K, Mukhopadhyay S, Bhattacharyya NP. Modulation of age at onset of Huntington disease patients by variations in TP53 and human caspase activated DNase (hCAD) genes. *Neuroscience Letters* 2005;374:81–86.
18. Arning L, Kraus P, Saft C, Andrich J, Epplen J. Age at onset of Huntington disease is not modulated by the R72P variation in TP53 and the R196K in the TP53 gene and the R196K variation in the gene coding for the human caspase activated DNase. *Neurogenetics* 2005.
19. Enari M, Sakahira H, Yokohama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391:43–50.
20. Canals JM, Checa N, Marco S, Akerud P, Michels A, Perez-Navarro E, et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor in cortical neurons is regulated by striatal target area. *J. Neurosci.* 2001;21:117–124.
21. Taylor-Robinson SD, Weeks RA, Bryant DJ, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy in Huntington's disease: evidence in favor of the glutamate excitotoxic theory. *Mov Disord* 1996;11:167-173.
22. MacDonald ME, Vonsattel JP, Shrinidhi J, Couropmitree NN, Cupples LA, Bird ED, et al. Evidence for the GluR6 gene associated with younger onset age of Huntington's disease. *Neurology* 1999; 53: 1330.
23. Arning L, Kraus PH, Valentin S, Saft C, Andrich J, Epplen JT. NR2A and NR2B receptor gene variations modify age at onset in Huntington disease. *Neurogenetics*, 2005; 6(1): 25-28.

24. Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease, *Nature*, 1998; 395:451–452.
25. Nazé P, Vuillaume I, Destée A, Pasquier F, Sablonnière B. Mutation analysis and association studies of the ubiquitin carboxyterminal hydrolase L1 gene in Huntington's disease. *Neuroscience Letters* 2002; 328:1–4.
26. Brune N, Andrich J, Gencik M, Saft C, Muller T, Valentin S, Przuntek H, Epplen JT. Methyltetrahydrofolate reductase polymorphism influences onset of Huntington's disease. *J Neural Transm Suppl.* 2004;(68):105-10.