LOCALIZACION DEL LOCUS DE LA ENFERMEDAD DE CHARCOT-MARIE-TOOTH TIPO 1A: ASOCIACION DE ESTA ENFERMEDAD CON UNA DUPLICACION DE DNA

POR
ROBERTO MONTES DE OCA LUNA

TESIS PRESENTADA A LA
FACULTAD DE MEDICINA
DE LA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
COMO REQUISITO PARCIAL PARA
LA OBTENCION DEL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA MOLECULAR

E INGENIERIA GENETICA

MONTERREY, N. L.
ABRIL DE 1993

TD
RC935
.C43
M6
c.1

50

1080073228

LOCALIZACION DEL LOCUS DE LA ENFERMEDAD DE CHARCOT-MARIE-TOOTH TIPO 1A: ASOCIACION DE ESTA ENFERMEDAD CON UNA DUPLICACION DE DNA

POR

ROBERTO MONTES DE OCA LUNA

TESIS PRESENTADA A LA
FACULTAD DE MEDICINA
DE LA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
COMO REQUISITO PARCIAL PARA
LA OBTENCION DEL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA MOLECULAR
E INGENIERIA GENETICA

Monterrey, N. L.

Abril de 1993

TD
RC935
.C43
M6

Biblioteca Central Magna
UANL
FONDO
TESIS
(73228)

B U A N L
UANL
FONDO
TESIS DOCTORADO

LOCALIZACION DEL LOCUS DE LA ENFERMEDAD DE CHARCOT-MARIE-TOOTH TIPO 1A: ASOCIACION DE ESTA ENFERMEDAD CON UNA DUPLICACION DE DNA

POR

ROBERTO MONTES DE OCA LUNA

Tesis presentada a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Comité de Tesis:

Dr. Mario César Salinas Carmona

Dr. Julio Sepúlveda Saavedra

Dra. Herminia G. Martínez Rdz.

Dra. Mirtala Moreno Sepúlveda

Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

Esta tesis se realizó en el Instituto de Genética Molecular del Colegio Baylor de Medicina, bajo la asesoría de la Dra. Pragna I. Patel y el Dr. James R. Lupski (Directores externos).

Por parte de la Universidad Autónoma de Nuevo León fungió como asesor de la presente tesis el Dr. Hugo A. Barrera Saldaña (Director Interno), Jefe del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina.

TABLA DE CONTENIDO

INDICE i

DEDICATORIA v

AGRADECIMIENTOS vi

LISTA DE ABREVIATURAS vii

LISTA DE FIGURAS viii

LISTA DE TABLAS ix

RESUMEN 1

INTRODUCCION 2

I. Aspectos Históricos de la Enfermedad de Charcot Marie-Tooth (CMT) 3

II. Características Clínicas del CMT tipo1 (CMT1) 4

III. Electrofisiología del CMT1 4

IV. Genética del CMT 5

A. Herencia Mendeliana 5
B. Penetrancia del fenotipo de CMT 5
C. Variabilidad en la expresión del fenotipo CMT1 6

V. Genética Molecular del CMT 7

A. Estudios de ligamiento genético 7
B. Estudios de ligamiento genético del CMT tipo 1A 10
C. Resumen de la búsqueda del locus del CMT1A 10

VI. Planteamiento del proyecto 11

A. Limitante de los estudios de ligamiento utilizando RFLP 11

B. Estrategia alternativa 13

HIPOTESIS 15

OBJETIVO 16

MATERIALES Y METODOS 17

I. Origen de los materiales y reactivos 17

II. Familias y su evaluación clínica 17

III. Marcadores genéticos 20

IV. Aislamiento de cósmidos 20

A. Preparación de las membranas 20
B. Hibridación de las membranas 20

V. Obtención de marcadores genéticos (GT)n 22

A. Identificación de secuencias (GT)n 22
B. Preparación de la sonda 22
C. Hibridación de DNA en gota 22
D. Subclonación y caracterización de las secuencias (GT)n 22

VI. Determinación de genotipos (GT)n 23

A. Aislamiento de DNA genómico de alto peso molecular 24
B. Marcaje de oligonucleótidos 25
C. Reacción de PCR 25
D. Interpretación de los genotipos 25

VII. Obtención de genotipos utilizando RFLP 25

A. Análisis tipo Southern 25
B. Marcaje radiactivo de las sondas 26
C. Preasociación de las sondas 26
D. Cuantificación de las bandas de hibridación 26

VIII. Separación de los alelos polimórficos *Msp*I para el marcador VAW409R1 26

IX. Construcción y análisis de híbridos de células somáticas... 27

RESULTADOS 29

I. Detección de secuencias (GT)n en los marcadores ligados al CMT1A 29

II. Caracterización de los marcadores (GT)n 36

III. Evidencia inicial de una duplicación del locus D17S122 en pacientes con CMT1A 41

IV. Confirmación de la duplicación del locus D17S122 mediante el análisis de polimorfismos tipo RFLP 41

V. Demostración de la duplicación del locus D17S122 mediante el uso de marcadores (GT)n 44

VI. La duplicación de DNA es una mutación común en pacientes con CMT1 54

VII. Demostración de que los alelos RFLP *Msp*I con una señal doble de hibridación en los pacientes con CMT1A contienen dos alelos 54

VIII. El tamaño de la duplicación es mayor de 100 kb 58

IX. Demostración de la herencia de un "cromosoma CMT1A" en pacientes con CMT1A 58

X. Correlación entre fenotipo y genotipo: un individuo severamente afectado con CMT1A es homocigoto para la duplicación 62

XI. Clonación de un nuevo marcador genético para la duplicación de DNA en pacientes con CMT1A 63

IX. Diagnóstico molecular del CMT1A con el marcador pRM11-GT **64**

DISCUSION **67**

CONCLUSIONES **73**

PERSPECTIVAS **74**

BIBLIOGRAFIA **76**

ANEXOS **87**

DEDICATORIA

A la memoria de mi hermano Carlos Montes de Oca Luna.

Con todo mi amor para las siguientes personas: a mis padres Sra. Marcelina Luna Aguilar y Sr. Carlos Montes de Oca Mejía; a mi hijo Carlos Roberto Montes de Oca Saucedo, y a mis hermanos Carmela, Alicia, Saul, Moisés, Claudía, Juan y Fernando.

Con amor e infinita gratitud a mi esposa Odila Saucedo Cárdenas quien incondicionalmente siempre me ha apoyado en mi carrera.

Con eterna gratitud a mi tía Severiana Luna Aguilar y a mis primos Carlos, Rosy, Jesús, Santos, Gloria y Diana por el apoyo que me brindaron durante mis estudios.

A todas las personas de las familias utilizadas en este estudio y a todas aquellas familias afectadas con la enfermedad de CMT1A. Deseo que este trabajo tenga alguna utilidad en sus vidas.

A todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este trabajo: Jim Lupski, Pragna Patel, Carlos A. García, James M. Killian, Aravinda Chakravarti, Susan Slaugenhaupt, Odila Saucedo, Vito Guzzeta, Brunella Franco, Robert Wrigth, Stewart Davis, Pentao Liu y Diego E. Rincón Limas.

Por último para los siguientes doctores que directa o indirectamente han influido en mi formación en el área de investigación: Ramiro González, Carlos H. Leal Garza, Salvador Luis Said Fernández, Hugo A. Barrera Saldaña, Mario César Salinas Carmona, Luis Herrera Estrella y Ariel Alvarez Morales.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis por su apoyo durante el desarrollo de esta tesis para obtener mi grado de doctor en ciencias: Dr. James R. Lupski, Dr. Pragna I. Patel y Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.

A los Drs. Carlos A. García, James M. Killian, R. Malamut, G. Parry and F. Axelrod por la evaluación y diagnóstico clínico de los individuos de este estudio. A los Drs. Aravinda Chakravarti y Susan Slaugenhaupt por los análisis estadísticos de ligamiento genético. Al Dr. David F. Barker por proveer los marcadores genéticos VAW409R1 y VAW409R3. Al Dr. Vito guzzetta por proveer los híbridos celulares y al Biol. Odila Saucedo Cárdenas por el secuenciamiento de los marcadores (GT)n.

A todos mis sinodales por sus críticas, sugerencias e interés en la revisión de este trabajo.

A la Facultad de Medicina de la U. A. N . L . por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo, especialmente a todo el personal del Departamento de Bioquímica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de doctorado otorgada.

LISTA DE ABREVIATURAS

0C	.....	Grados centígrados
CMT	.....	Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth
CMT1	.....	Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 1
CMT1A	.....	Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 1A
dATP	.....	Desoxiadenosina trifosfatada
dCTP	.....	Desoxicitidina trifosfatada
dNTPs	.....	Desoxinucleósidos trifosfatados
EDTA	.....	Acido etilendiamin tetracético
g	.....	Gramo
h	.....	Hora (s)
Kb	.....	Kilopares de bases
M	.....	Molar
µCi	.....	Microcuries
mg	.....	Miligramos
ml	.....	Mililitros
µg	.....	Microgramos
µl	.....	Microlitros
MEMD	.....	Medio Eagle modificado por Dulbecco
min	.....	Minuto (s)
ml	.....	Mililitro
mM	.....	Milimolar
ng	.....	Nanogramo
nmol	.....	Nanomoles
pb	.....	Pares de bases
PCR	.....	Reacción de polimerización en cadena
pH	.....	Logaritmo negativo de la concentración de H+
RFLP	.....	Polimorfismo (s) en la longitud de fragmentos de restricción
SRDGT	.....	Secuencia repetida del dinucleótido guanina y timina
SRT	.....	Secuencia repetida en tandem
SSC	.....	Solución salina citratos
SDS	.....	Dodecil sulfato de sodio
V	.....	Voltios
VCN	.....	Velocidad de conducción nerviosa
Z	.....	"Lod Score", símbolo que representa el grado de ligamiento genético

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ligamiento entre una enfermedad y un marcador genético.

Figura 2. Falta de informatividad de los RFLPs en los estudios de ligamiento genético.

Figura 3. Arboles genealógicos segregando la enfermedad de CMT1A.

Figura 4. Identificación de marcadores genéticos conteniendo secuencias (GT)n mediante el procedimiento de hibridación en gota.

Figura 5. Patrón de restricción del marcador genético cH3.

Figura 6. Detección de secuencias (GT)n en el marcador genético cH3 mediante hibridación tipo Southern.

Figura 7. Detección de secuencias (GT)n en el marcador genético c1517 mediante hibridación tipo Southern.

Figura 8. Detección de secuencias (GT)n en el marcador genético c1541 mediante hibridación tipo Southern.

Figura 9. Detección de secuencias (GT)n en el marcador genético VAW409R1 mediante hibridación tipo Southern.

Figura 10. Identificación de las clonas recombinantes del marcador cH3 que contienen la secuencia (GT)n.

Figura 11. Secuencia nucleotídica del marcador pRM11-GT.

Figura 12. Evidencia inicial de una duplicación en pacientes con CMT1A.

Figura 13. Detección de tres alelos (GT)n en pacientes con CMT1A utilizando el marcador RM11-GT.

Figura 14. A, B, C, D y E. Genotipos (GT)n del marcador pRM11-GT para los árboles genealógicos segregando la enfermedad autosómica dominante CMT1A.

Figura 15. Demostración de dos alelos (GT)n en alelos polimórficos *MspI* del locus D17S122.

Figura 16. Demostración de un individuo homocigoto para el CMT1A.

Figura 17. Identificación de un nuevo marcador para la región duplicada.

Figura 18. Diagnóstico molecular del CMT1A utilizando el marcador pRM11-GT.

Figura 19. Observación de falsos recombinantes debido a la duplicación.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Marcadores genéticos utilizados para la identificación de secuencias (GT)n.