RESUMEN

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) es la neuropatía hereditaria más común del sistema nervioso periférico. El CMT tipo 1A (CMT1A) es la forma más prevalente de CMT y se hereda de una manera autosómica dominante, ligada al cromosoma 17. Esta enfermedad se caracteriza clínicamente por una atrofia de los músculos distales y una disminución en la velocidad de conducción nerviosa.

Mediante estudios de ligamiento genético se determinó que el locus para la enfermedad de CMT1A se localiza en la región p11.2-p12 del cromosoma humano número 17. En el presente trabajo se describe el aislamiento de un marcador genético muy polimórfico designado con el nombre de pRM11-GT, el cual se localiza en la región cromosómica 17p11.2-p12. Este marcador detecta un nuevo tipo de polimorfismo que se presenta a nivel de secuencias repetidas en tandem del dinucleótido guanina y timina. Con este marcador pRM11-GT se analizaron 194 individuos que conforman siete árboles genealógicos (seis de origen Acadio-Francés y uno de origen judío) y se encontró que, únicamente en aquellos individuos afectados con CMT1A, había un alelo extra para este marcador. Esto significa que los pacientes con CMT1A tienen una duplicación de DNA que involucra el locus D17S122 al cual pertenece el marcador RM11-GT. Esta duplicación se confirmó con el análisis de los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) que se obtuvieron con otros dos marcadores de este mismo locus: VAW409R1 y VAW409R3. Nuevamente, solo en los individuos afectados se pudo detectar la presencia de un alelo extra para estos marcadores. Además con el uso de RFLP se determinó que la duplicación también involucra otros dos locus: VAW412 y EW401; esto implicó que el tamaño de la duplicación debe ser al menos de 100 kb. Por otro lado, se demostró que un paciente severamente afectado con CMT1A, hijo de un matrimonio entre dos personas afectadas, era homocigoto para la duplicación de DNA. Esto representa una evidencia indirecta de una correlación entre el genotipo y el fenotipo. Este hallazgo de la asociación de la enfermedad de CMT1A con una duplicación de DNA, ha permitido por primera vez el diagnóstico molecular de la enfermedad de CMT1A, y representa un paso muy importante para la identificación del gen (o de los genes) responsable de esta enfermedad.

INTRODUCCION

Existen descritas más de 4000 enfermedades genéticas en el humano, para la mayoría de las cuales aún se desconocen sus bases moleculares (1). La tecnología del DNA recombinante ha permitido dilucidar las bases moleculares de algunas de estas enfermedades, al identificar los genes responsables y sus correspondientes mutaciones que conducen a la aparición del fenotipo de la enfermedad. Esto se ha logrado principalmente para aquellas enfermedades genéticas en donde previamente se conocía que tipo de proteína estaba alterada en la enfermedad, de tal manera que la identificación de sus respectivos genes se facilitó al usar estrategias de clonación basadas en la secuencia total o parcial de la proteína, en su función y/o en el uso de anticuerpos contra la misma. Tal es el caso por ejemplo de las precisas descripciones moleculares de sindromes de Talasemias (2) e Hipercolesterolemia familiar (3).

Sin embargo, para la mayoría de las enfermedades genéticas humanas, incluyendo la enfermedad de CMT1A, se desconocen sus bases bioquímicas y por ende las proteínas posiblemente involucradas en esta enfermedad. En este tipo de casos se identifica el locus del gen responsable de la enfermedad, através de estudios de ligamiento genético. Este tipo de estudios se designan con el nombre de "clonación por su posición", e involucra estrategias para el aislamiento del gen, aún y cuando no se conozca ni su producto proteico o/y su función. La lógica de este enfoque es el de establecer la posición del locus de la enfermedad con un marcador genético que previamente se haya determinado que está ligado a la enfermedad; la región cromosómica donde se localiza este marcador corresponde al locus de la enfermedad y en esta área se debe encontrar un gen con alguna mutación que se correlacione con la enfermedad. De esta manera se logró la identificación del gen responsable de la Fibrosis Quística (4,5,6), y establecer al menos la localización cromosómica de diversas enfermedades genéticas como por ejemplo la Corea de Huntington (7) y la enfermedad del Riñón Poliquístico Crónica (8). Algunas veces se pueden encontrar pacientes en donde la enfermedad está asociada con alguna anormalidad cromosómica; por ejemplo una translocación o deleción. Esto facilita la localización del gen ya que la búsqueda del mismo se restringe en aquella región donde se encuentra la anormalidad cromosómica. Así se logró la identificación de los genes responsables de algunas enfermedades genéticas como son la Distrofia muscular tipo Duchenne (9,10), el Retinoblastoma (11), la Granulomatosis Crónica (12) y la Neurofibromatosis (13,14).

El presente trabajo se enfocó a la identificación del gen responsable de una mas de las tantas enfermedades genéticas humanas: la enfermedad de

CMT1A.

I. Aspectos Históricos de la Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

En 1886, Charcot y Marie en Francia (15) y Tooth en Inglaterra (16), describieron una enfermedad en la cual los individuos presentaban una debilidad muscular como consecuencia de un desorden neurológico. Además, observaron que esta enfermedad se presentaba en varios miembros de la misma familia con lo cual determinaron posteriormente que se trataba de una enfermedad hereditaria. Originalmente esta enfermedad recibió el nombre de atrofia muscular peroneal, sin embargo actualmente ésta se designa con el nombre de sus descubridores: enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT). Apartir de estas primeras descripciones del CMT han aparecido en la literatura diversos reportes sobre enfermedades con un fenotipo similar al descrito originalmente por Charcot, Marie y Tooth. Actualmente, el CMT comprende un grupo heterogéneo de varias enfermedades que tienen en común un desorden degenerativo y herediatrio de los nervios periféricos. Por esta razón es más apropiada la designación de Síndrome de Charcot-Marie-Tooth.

De acuerdo con estudios electrofisiológicos realizados por Henriksen (17), y Gilliat y Thomas (18), el CMT descrito por Charcot, Marie y Tooth, se dividió en dos grupos: CMT1, el cual comprende pacientes con una severa disminución en la velocidad de conducción nerviosa (VCN), y CMT2 el cual incluye pacientes con una VCN normal. Estos grupos se subdividieron, por Dyck and Lambert (19,20), en base a sus características electrofisiológicas, biopsias de nervio y al patrón de herencia. El CMT1 se dividió en dos grupos, ambos con una neuropatía hipertrófica, pero uno con un patrón de herencia dominante y el otro con un patrón de herencia recesivo. El CMT2, con VCN normales y sin hipertrofia de los nervios, también llamado el tipo neuronal, se dividió en cinco grupos con un diferente patrón de herencia. Posteriormente, Brust y cols. (21), y Davis y cols. (22), basándose en los mismos aspectos, describieron un tipo intermedio de CMT, con VCN similares al CMT1, pero sin hipertrofia de los nervios.

La clasificación de esta enfermedad ha sido confusa debido a los diversos criterios utilizados por los diferentes investigadores (23). Sin embargo la clasificación más utilizada para designar el CMT es la propuesta por Dyck y cols. (24), como neuropatías herediatrias motoras y sensitivas (HMSN): HMSN tipo I o CMT1 es una neuropatía hipertrófica que presenta

una desmielinización de los nervios periféricos con una reducción muy severa en la conducción nerviosa, y HMSN tipo II o CMT2 es la forma neuronal en la cual ocurre una degeneración a nivel de los axones, pero la velocidad de conducción nerviosa es prácticamente normal.

II. Características Clínicas del CMT1 (25).

La enfermedad comienza a manifestarse por una atrofia y debilidad de los músculos peroneales, y progresa hasta afectar los músculos distales de las piernas y los brazos. Estos músculos distales pierden progresivamente fuerza y masa, de tal manera que en algunos pacientes la atrofia de las piernas da el aspecto de piernas de cigueña. Otras características incluyen una pérdida en los reflejos tendinosos, un arco muy pronunciado en los pies (pie cavo) e hipertrofia de los nervios periféricos a manera de bulbo de cebolla. Las deformidades en los pies y las manos puede ser tan severa que se requiere de una intervención quirúrgica para corregirlas. La aparición de los síntomas del CMT ocurre principalmente al final de la primera década o inicios de la segunda década de vida. La penetrancia del fenotipo en la primera década puede ser baja pero incrementa con la edad. La posibilidad de que un paciente muestre los primeros síntomas después de la tercera década se disminuye marcadamente con el incremento de la edad.

IV. Electrofisiología del CMT1 (25).

La expresión del fenotipo de la enfermedad de CMT1 es muy variable de acuerdo a los criterios clínicos convencionales. Sin embargo, todos los pacientes con CMT1 tienen una disminución muy severa en la velocidad de conducción del nervio motor (VCN), de tal manera que la VCN es la característica más confiable y universalmente utilizada para definir el CMT1. Inclusive los pacientes asintomáticos también tienen un grado similar en la disminución de la VCN. Los pacientes con CMT2 pueden manifestar una disminución leve en la VCN, pero no tan severa como en el CMT1.

En un estudio efectuado por Dyck y Lambert (19,20), el promedio en la VCN fué menor de 25 m/seg, y sólo en algunos pacientes alcanzó 42 m/seg. Davis y cols. (22) analizaron la VCN de 116 individuos afectados con la forma autosómica dominante de CMT, y en base a estos estudios la dividieron en dos grupos. En un grupo incluyeron aquellos pacientes con VCN menores de 25 m/seg, los cuales correspondían claramente al tipo CMT1. En el otro grupo

incluyeron pacientes con VCN entre 25 y 45 m/seg el cual incluía pacientes con CMT2.

La VCN es normal al nacimiento en los pacientes con CMT1 (25,26). No existe una correlación entre el grado de disminución de la VCN y el defecto neurológico. Muchos niños y algunos adultos afectados con CMT, aún y cuando tienen una severa disminución en la VCN no presentan signos de la enfermedad, o sea que son asintomáticos. Durante el proceso de la enfermedad no se manifiestan cambios en la VCN. Sin embargo, la severidad en la disminución de la VCN puede reflejar la severidad en el proceso de la enfermedad, de manera que los pacientes con los niveles más bajos en la VCN pueden desarrollar los defectos neurológicos más severos. Dyck et al (28) encontraron que aquellos pacientes que mostraron a edad temprana una severa disminución en la VCN presentaron un fenotipo muy severo.

IV. Genética de la Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (25).

A. Herencia Mendeliana. La mayor parte de las familias con CMT presentan la forma autosómica dominante, sin embargo existen familias en las cuales la enfermedad se hereda ligada al X y algunas veces en forma recesiva (1). En la forma dominante ligada al X, la enfermedad es más severa en los varones que en las mujeres, y en estas últimas el fenotipo clínico es muy heterogéneo aun y cuando forman parte del mismo árbol genealógico (29); esta variabilidad se debe posiblemente a la variación somática en la inactivación del cromosoma X. Por otro lado, existe descrito en la literatura un individuo afectado con la forma autosómica dominante quien presentó un fenotipo muy severo y que se le manifestó en el primer año de vida; puesto que ambos padres también estaban afectados con CMT se postuló que dicho paciente era homocigoto para el alelo dominante de CMT (30). Varios estudios apoyan el hecho de que la forma autosómica dominante es la más frecuente, mientras que la ligada al X es la más rara. En un estudio realizado por Lupski y cols. (25) se determinó que de 72 diferentes familias afectadas con CMT, 68 mostraron el patrón de herencia autosómico dominante.

B. Penetrancia del fenotipo de CMT. El CMT es una enfermedad en donde el fenotipo progresa lentamente con la edad, y por lo tanto la penetrancia del mismo es un fenómeno que depende del tiempo. En un estudio realizado por Bird and Kraft (31), se analizó la penetrancia del fenotipo en 109 individuos que conformaban 15 familias heredando el CMT en una forma autosómica dominante. El resultado fué que la penetrancia del gen(es) del

CMT es de un 28% en la primer década, y casi completa en la mitad de la tercera década. La edad promedio en la cual se manifestó el fenotipo fué a los 12.2 años de edad con una desviación estandard de 7.3 años. Además en este estudio se concluyó que los individuos con riesgo (hermanos de pacientes con CMT) sin manifestaciones clínicas y mayores de 27 años de edad, tienen una probabilidad menor del 3% de que hayan heredado el gen del CMT. En resumen, la penetrancia del genotipo del CMT, en cuanto a su manifestación clínica, independientemente de la edad, es casi completa (no es del 100%); y de acuerdo con los estudios electrofisiológicos, la disminución en la VCN es una característica con una penetrancia completa (25).

C. Variabilidad en la expresión del fenotipo clínico del CMT1. El fenotipo clínico del CMT1 muestra una variabilidad muy notable, ya que se observa una heterogeneidad tanto interfamiliar como intrafamiliar. Esta heterogeneidad intrafamiliar se demostró en un estudio realizado sobre 299 individuos de un árbol genealógico Acadio-Francés afectado con la forma de CMT1 autosómica dominante. En este estudio se le determinó a los individuos la VCN para diagnosticar correctamente la enfermedad de CMT1. De los pacientes diagnosticados con CMT1, mientras que algunos tenían un pie cavo muy severo y con gran dificultad para caminar, otros prácticamente carecían de los rasgos clínicos de la enfermedad (32). Puesto que los individuos afectados deberían portar la misma alteración genética, se concluye que existe una heterogeneidad intrafamiliar en la enfermedad de CMT1.

Otra línea de evidencia sobre la heterogeneidad del CMT1 fué obtenida por García y cols. (33), con el estudio de gemelos idénticos afectados con CMT1. Como se sabe, los gemelos idénticos son muy importantes en los estudios de heterogeneidad, ya que son individuos que poseen el mismo componente genético, y por ende se evita la confusión que se origina por otros genes que pudiesen alterar la expresión del fenotipo de la mutación en cuestión. De acuerdo con esto si los gemelos idénticos afectados con CMT1 tienen un fenotipo diferente apoyan el fenómeno de la heterogeneidad. Como resultado se encontró que en un caso de gemelos idénticos, hubo discordancia en cuanto a los calambres, a la debilidad de los músculos intrínsecos de las manos, debilidad de los pies, y en la hipertrofia de los nervios peroneal, cubital, y auricular mayor. Otro caso de gemelos idénticos afectados con CMT1, fué también discordante en los calambres, debilidad de las manos, e hipertrofia de los nervios. Uno de estos dos gemelos tenía unos pies tan débiles que a la edad de 14 años requirió el uso de muletas. Lo interesante fué que la VCN se mantuvo al mismo nivel de afección para cada uno de los cuatro gemelos analizados (18-20 m/seg). Esto es congruente con una penetrancia

completa del fenotipo de VCN y sugiere que su expresión es menos variable. Estos estudios en gemelos idénticos indican que los factores ambientales juegan un papel importante en la severidad de la expresión clínica del CMT1. Otra evidencia de la influencia del medio ambiente es la diferencia en la susceptibilidad de los pacientes con CMT a los efectos neurotóxicos colaterales de la terapia con vincristina (34-37).

V. Genética Molecular del CMT (25).

A. Estudios de ligamiento genético. Como se mencionó anteriormente los estudios de ligamiento genético han sido muy importantes en la localización de los genes responsables de diversas enfermedades genéticas (13,14). El propósito de un estudio de ligamiento es el de determinar si existe una correlación positiva entre la herencia de una región cromosómica específica (representada por un marcador genético) y la herencia del fenotipo de una enfermedad (Figure 1). Si el locus de la enfermedad y un marcador genético en particular se localizan en diferentes cromosomas, ambos se segregarán independientemente, es decir al azar, y no mostrarán una correlación en su patrón de herencia. Similarmente, si los dos están en lugares opuestos en un mismo cromosoma es muy alta la probabilidad de que el proceso natural de la recombinación los separe, uno en cada cromosoma homólogo. De esta manera al estar en diferentes cromosomas se segregarán independientemente y nuevamente no existirá ninguna correlación entre ellos. Sin embargo si se encuentran muy cerca uno del otro en la misma región cromosómica, es decir si están "ligados", será muy baja la probabilidad de que la recombinación los separe, y por ende tanto la enfermedad como el marcador genético se heredarán en conjunto (cosegregarán) (Figura 1). Por lo tanto el número de recombinaciones entre la enfermedad y el marcador genético através de un árbol genealógico determinará la distancia que existe entre ellos (en promedio, en el genoma humano, 1% de recombinación corresponde a un millón de pares de bases de DNA). Si la enfermedad y el marcador se encuentran ligados, el gen responsable de la enfermedad se identifica y aisla de aquella región cromosómica donde se localice el marcador genético. Estos estudios de ligamiento son más precisos si se utilizan diferentes marcadores genéticos y se realiza un análisis de ligamiento múltiple. De esta manera se determina la posición del locus de la enfermedad con respecto a los diferentes marcadores. Posteriormente de la región cromosómica comprendida entre los marcadores genéticos que flanquean el locus de la enfermedad se aislan genes, y se caracterizan para encontrar alguna mutación que se correlacione con la

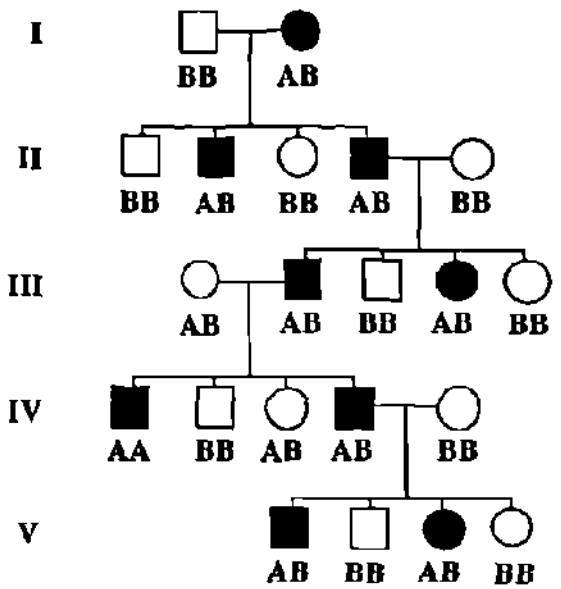


Figura 1. Ligamiento genético entre una enfermedad y un marcador genético.

Ejemplo hipotético de un árbol genealógico segregando una enfermedad autosómica dominante. Los símbolos en negro indican los individuos afectados con la enfermedad y el par de letras debajo de cada uno de los símbolos indican los alelos (el genotipo) presentes en cada uno de ellos, obtenidos por RFLP, utilizando un marcador genético que se ha postulado que está ligado al locus de la enfermedad. Los números romanos indican las generaciones familiares.

Si analizamos el genotipo de los descendientes afectados en la generación II podemos deducir que heredaron la enfermedad en combinación con el alelo A del padre. Uno de estos descendientes nuevamente transmitió a dos de sus hijos la enfermedad ligada a su alelo A; y así sucesivamente.

Este árbol genealógico ejemplifica el resultado esperado en caso de que un marcador genético esté ligado a la enfermedad. En este caso el marcador genético está ligado a la enfermedad puesto que su locus (identificado por el alelo A) siempre se heredó conjuntamente con la enfermedad, es decir que no se separaron por recombinación. Esto indicaría que el locus de la enfermedad y el del marcador están físicamente muy cercanos en el cromosoma (están ligados).

enfermedad.

Para llevar a cabo un estudio de ligamiento genético y concluir que un marcador genético está ligado a una enfermedad se requiere del análisis de árboles genealógicos de varias generaciones familiares en los cuales se herede la enfermedad en cuestión. Además, puesto que cada individuo posee dos cromosomas homólogos, es decir dos copias para un marcador genético determinado (dos alelos), es necesario diferenciar sus alelos para determinar cual de ellos se hereda a los individuos normales y cual se segrega con la enfermedad. Esto implica que se deben utilizar marcadores genéticos polimórficos, es decir marcadores que detecten dos o más diferentes alelos en la población para un mismo locus. Entre más polimórfico sea un marcador, mas fácil será distinguir cual de los dos alelos se hereda con el fenotipo de la enfermedad.

El advenimiento de la tecnología del DNA recombinante hizo posible la identificación de cambios en la secuencia nucleotídica (polimorfismos) que se presentan normalmente en el DNA. Estos polimorfismos se detectan mediante el uso de enzimas de restricción, las cuales realizan cortes endonucleotídicos en el DNA a nivel de secuencias muy específicas (sitios de restricción) y producen fragmentos de un tamaño determinado. Los citados cambios en la secuencia de DNA pueden originar la formación o alteración de sitios de restricción, de manera que al cortar el DNA con una enzima de restricción determinada se generarán fragmentos de DNA de diferente tamaño al original. La inserción o pérdida de varios nucleótidos, sin que se modifique el sitio de restricción, también variará el tamaño de los fragmentos resultantes. Estas diferencias en el tamaño de los fragmentos de DNA, que se generan con la digestión de enzimas de restricción, provenientes de un mismo locus de los dos cromosomas homólogos se denominan RFLP (Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción) (38). Este tipo de polimorfismo, RFLP, es el que principalmente se utiliza en los estudios de ligamiento genético para diferenciar los alelos de un mismo individuo y éstos se identifican utilizando la técnica de Southern (39). En este procedimiento se corta el DNA genómico con una enzima de restricción, se separan los fragmentos resultantes en un gel de agarosa, se transfieren a una membrana de nylon, y el DNA en la membrana se hibrida contra una sonda específica del marcador en cuestión. El patrón de alelos que se obtienen para cada individuo de un árbol genealógico se correlaciona con la presencia de la enfermedad para determinar si existe una cosegregación (ligamiento) entre el marcador y la enfermedad. Este grado de correlación o de ligamiento genético se calcula estadísticamente y se expresa como Z ("lod score"). Por convención, se considera que existe un

ligamiento significativo entre el marcador y la enfermedad, cuando la Z a cualquier fracción de recombinación es mayor de 3 (40,41).

B. Estudios de ligamiento genético en el CMT1. Con los estudios de ligamiento genético en las familias afectadas con el tipo de CMT autosómico dominante (CMT1) se ha determinado que existe una heterogenidad genética. En 1980, Bird y cols. analizaron dos familias con CMT1 y encontraron que existía un ligamiento entre ellas y el locus Duffy que se localiza en la región cromosómica q12-q21 del cromosoma 1 (42,43). Guiloff y cols. confirmaron este mismo ligamiento (44), y posteriormente Stebbins y Conneally (45) también llegaron a la misma conclusión, pero utilizando un árbol genealógico de ascendencia Indú. Además el gen Fc gammaRII, que también se localiza en la misma región que el locus Duffy, se encontró ligado al CMT1 (46). Sin embargo, la heterogenidad genética se estableció al determinar que la mayor parte de las familias con CMT1 no están ligadas al locus Duffy (47,48,49,50). De acuerdo a lo descrito por Bird y cols. (48), el tipo de CMT1 ligado al locus Duffy se denomina CMT1B, mientras que el tipo de CMT1 que no está ligado a este locus se denominó CMT1A. Este último es la forma autosómica dominante más frecuente de CMT1 y está ligada al cromosoma 17.

Vance y cols. (51) fueron los primeros en demostrar que la enfermedad de CMT1A está ligada a dos marcadores genéticos localizados en la región proximal del brazo corto del cromosoma 17 (17p): D17S58 (EW301) y D17S71 (pA10-41). Posteriormente, en forma independiente varios grupos confirmaron que estos marcadores están efectivamente ligados a la enfermedad del CMT1A (32,52,53,54,55,56). Sin embargo, aún y cuando la Z es de 3 para estos marcadores, el grado de ligamiento no es muy grande y ocurren recombinaciones entre estos marcadores y la enfermedad de CMT1A. Debido a esto, se ha seguido con el aislamiento de nuevos marcadores genéticos de esta región del cromosoma 17 y se les ha evaluado su grado de ligamiento. En los trabajos realizados por Patel y cols. (32,55) se aislaron de la región cromosómica 17p11.2 los marcadores genéticos D17S258 (1516), D17S445 (S6.1-HB2) y D17S29 (YNM67-R5), los cuales se demostró que también están ligados al CMT1A con una Z de 3.

C. Resumen de la búsqueda del locus de la enfermedad de CMT1A. De acuerdo con los resultados de ligamiento genético efectuados por los diferentes grupos se concluye lo siguiente: aún no se ha identificado un marcador genético estrechamente ligado al locus del CMT1A. En nuestro laboratorio llevamos a cabo un estudio con el propósito de determinar con mayor precisión la localización de todos los marcadores que habían mostrado

ligamiento al CMT1A. Para esto se utilizaron híbridos de células somáticas que retenían el cromosoma 17 completo o con deleciones y se determinó que los marcadores genéticos que muestran ligamiento con el locus de la enfermedad de CMT1A, se localizan en la región cromosómica 17p11.2-p12 (57,58). Tomando esto en cuenta se concluye lo siguiente: el locus de la enfermedad del CMT1A se localiza dentro de la región cromosómica 17p11.2-p12. Cabe señalar que esta región comprende aproximadamente 10 millones de pb.

VI. Planteamiento del proyecto.

A. Limitación de los estudios de ligamiento utilizando RFLP. Para localizar el gen de una enfermedad mediante un estudio de ligamiento genético, se trata de responder la misma pregunta para diferentes regiones cromosómicas: ¿existe una correlación positiva entre la herencia de una región cromosómica específica y la enfermedad?. Si es así, el gen se localiza en aquella región cromosómica ligada a la enfermedad. Sin embargo, para determinar que el ligamiento resultante no es casual, es necesario analizar varios árboles genealógicos. Además cabe recordar que es necesario distinguir cual de las dos copias de dicha región cromosómica del progenitor son heredadas a sus descendientes. Por lo tanto, el marcador genético de una región cromosómica determinada debe ser polimórfico. Hasta la fecha, el polimorfismo de los marcadores utilizados para localizar el locus del CMT1A se han basado en RFLP. Puesto que con este tipo de polimorfismo se detectan generalmente sólo dos alelos diferentes en la población, la información que proporcionan es limitada. Esta limitación se ejemplifica en la Figura 2 en donde se representan familias que segregan una enfermedad autosómica dominante como lo es el CMT1A, con genotipos que comúnmente se observan en los estudios de ligamiento al utilizar RFLP. Si al progenitor afectado no se le distinguen los dos alelos (Figura 2A) o si ambos padres presentan el mismo genotipo (Figura 2B), no será posible determinar cual de los dos alelos se segrega con la enfermedad y por ende si ha ocurrido algún evento de recombinación. Cabe recordar que los eventos de recombinación son los que determinan la distancia entre el marcador y el locus de la enfermedad. Por el contrario, en una situación hipotética en la cual se utilice un marcador muy polimórfico, de manera que todos los alelos de los padres sean diferentes, se podrá determinar con exactitud cual alelo se segrega con la enfermedad (Figura 2: C y D) y por ende detectar eventos de recombinación (Figura 2D). Por lo tanto la falta de un mayor polimorfismo de los marcadores al utilizar RFLPs, aunado con el hecho de que no siempre se cuenta con árboles

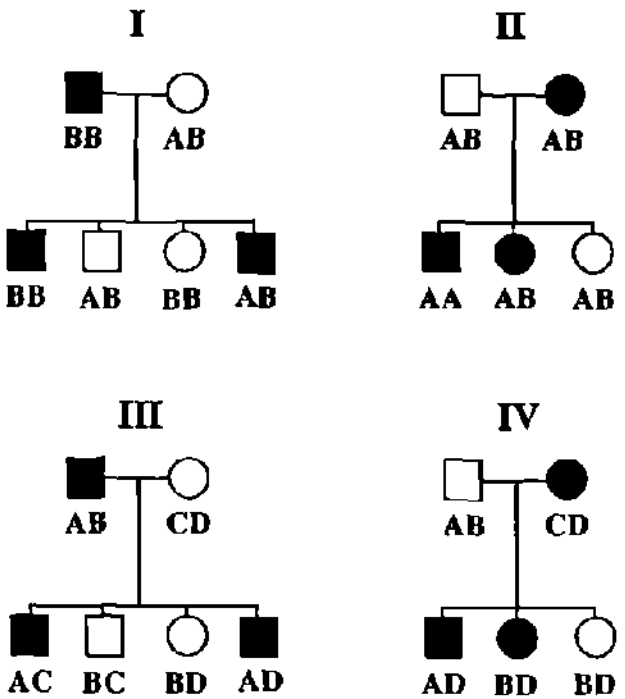


Figura 2. Falta de información de los RFLPs en los estudios de Ligamiento Genético. Esta figura representa el caso de una enfermedad autosómica dominante, como lo es la enfermedad de CMT1A. Las letras corresponden a genotipos hipotéticos para un marcador genético, y los símbolos en negro indican los individuos afectados con la enfermedad.

En el ejemplo I, en el descendiente afectado con genotipo BB no es posible determinar si el alelo mutante (el cromosoma con la mutación) se heredó del padre o de la madre y por lo tanto no se puede obtener una información real de ligamiento.

En el ejemplo II, ocurre lo mismo con el descendiente afectado con genotipo AA, sin embargo podemos deducir que la enfermedad se segrega con el alelo A de la madre. En el descendiente afectado AB tampoco es posible determinar cual alelo está recibiendo de cada padre puesto que tienen los mismos genotipos. En cuanto al descendiente no afectado AB, podría ser el resultado de una recombinación, en donde el alelo A lo está heredando del padre, pero debido a que la madre también posee un alelo A, no es posible identificarlo como un evento de recombinación.

Los ejemplos III y IV corresponden respectivamente a los mismos ejemplos I y II con la diferencia de que en estos casos el marcador hipotético es más informativo (polimórfico). Si analizamos los genotipos de los descendientes en el ejemplo III, podemos deducir que la enfermedad se está segregando con el alelo A del padre. En el ejemplo IV y de acuerdo con los genotipos de los dos descendientes afectados, la enfermedad se segrega con el alelo D de la madre, sin embargo, el *individuo no afectado BD también heredó el alelo D y puesto* que no está enfermo significa que ocurrió un evento de recombinación. Es decir que durante la meiosis para generar los gametos de su padre, el locus del alelo D y el locus de la enfermedad, originalmente presentes en el mismo cromosoma, fueron separados por recombinación uno en cada miembro del par de cromosomas homólogos. Entre mayor número de eventos de recombinación se observen, será mayor la distancia entre el locus de la enfermedad y el locus del marcador que se está analizando.

En resumen, entre mayor sea el polimorfismo del marcador, será posible determinar con mayor precisión la segregación de los alelos del marcador con respecto a la enfermedad y con ello el resultado del estudio de ligamiento será más confiable.

genealógicos de varias generaciones, hacen que el análisis estadístico del ligamiento genético sea menos preciso y origine resultados de ligamiento muy diferentes, aún para el mismo marcador genético. Por ejemplo, la Z obtenida por diferentes grupos de investigación entre el locus del CMT1A y los marcadores genéticos EW301 y A10-41 fluctúa respectivamente entre 2.37 a 10.67 y 0.89 a 5.26 (25). Resultados discrepantes se observan también para los diferentes marcadores genéticos que se han analizado hasta la fecha.

B. Una estrategia alternativa. El propósito del presente trabajo fué el de resolver esta limitación al incrementar el potencial informativo (mayor grado de polimorfismo) de cada marcador ligado al CMT1A, mediante el uso de polimorfismos que se presentan en las secuencias repetidas en tandem tales como aquellas formadas por un dinucleótido de guanina y timina. Estas secuencias se designan en este trabajo como secuencias (GT)n.

Secuencias repetidas del dinucleótido guanina y timina (SRDGT) Las SRDGT son un tipo de secuencia de DNA que se repite en tandem, cuya fórmula es (dC-dA)n.(dG-dT)n y se designan como secuencias (CA)n o (GT)n. Las SRDGT son muy abundantes y se ha calculado que existen dispersas en el genoma humano de 50,000 a 100,000 secuencias (GT)n, en donde n= ≈ 10-60. Si se considera una distribucion uniforme de estas secuencias, la posibilidad de encontrar secuencias (GT)n es de una por cada 30-60 kb (59-62).

Una característica notable de las secuencias repetidas en tandem (SRT) es que varía su tamaño, para un mismo locus entre los diferentes individuos, debido a un cambio en el número de repeticiones dentro de la SRT, (63,64). Es decir que el polimorfismo de las SRT es en cuanto a su longitud, y se pueden reconocer en la población múltiples alelos para un mismo locus. Esto se ha demostrado para diferentes SRT, como por ejemplo en el DNA satélite de primates (65,66), en los genes humanos para la visión del color (67), en la SRT de los genes que codifican para antígenos del parásito de la malaria (68), y en los minisatélites (63,64). Este mismo fenómeno de polimorfismo ocurre en las secuencias (GT)n ya que son también un tipo de SRT (69-72).

El grado de polimorfismo de las secuencias (GT)n es muy superior al de los RFLP, ya que mientras que los RFLP distinguen normalmente dos alelos en la población, con las secuencias (GT)n se pueden distinguir hasta 16 alelos. Los marcadores genéticos que basan su polimorfismo en estas secuencias (GT)n se designan como marcadores (GT)n, y sus correspondientes alelos se denominan alelos (GT)n. Su polimorfismo se determina al amplificar por PCR una región de 150 pb que contenga la secuencia (GT)n y el tamaño de sus

alelos (GT)n se visualizan en geles de poliacrilamida (69-72).

El hecho de que los marcadores (GT)n son muy polimórficos, aunado a su amplia distribución en el genoma humano, los hacen ideales para los estudios de ligamiento genético, e incluso representan una herramienta nueva muy valiosa en la resolución del mapa genético del genoma humano.

HIPOTESIS

Las secuencias (GT)n son más polimórficas que los RFLP. En un estudio de ligamiento genético, entre mayor sea el grado de polimorfismo del marcador utilizado, el resultado del estudio será más preciso. Por lo tanto, los marcadores (GT)n determinarán con mayor precisión que los RFLP la localización del locus del CMT1A.

OBJETIVO

Localizar por ligamiento genético el locus para la enfermedad del CMT1A utilizando marcadores (GT)n.

La estrategia que se siguió para cumplir con nuestro objetivo general estuvo integrada por los siguientes objetivos experimentales:

I. Identificar marcadores genéticos de la región 17p11.2-12 que poseen una repetición (GT)n.

De acuerdo con los antecedentes, el locus del CMT1A se encuentra dentro de la región cromosómica 17p11.2-12. A todos los marcadores genéticos disponibles de la región 17p11.2-12 se les determinó por hibridación en gota si contenían una secuencia (GT)n. Puesto que se encuentra una secuencia (GT)n aproximadamente cada 50 Kb, inicialmente se aislaron cósmidos para algunos marcadores cuyo tamaño era menor de 10 kb. Estos cósmidos portan fragmentos de DNA humano de aproximadamente 40 kb.

II. Obtener marcadores (GT)n.

De los marcadores positivos para una secuencia (GT)n se subclonó y caracterizó un fragmento de DNA que contuviera la secuencia (GT)n, y el cual se designó como un marcador (GT)n.

III. Determinar el genotipo de los individuos que conforman los árboles genealógicos segregando CMT1A.

A cada uno de los individuos de los árboles genealógicos de la Figura 3, se les determinó el genotipo, es decir el tamaño de sus alelos (GT)n, para cada uno de los marcadores (GT)n identificados en el punto II.

IV. Calcular el grado de ligamiento genético de cada marcador (GT)n.

El cálculo del grado de ligamiento entre el CMT1A y los marcadores (GT)n se planteó determinarse mediante el programa de computación denominado LINKAGE (61).

MATERIAL Y METODOS.

I. Origen de los materiales y reactivos.

Las enzimas de restricción y modificación de ácidos nucleicos se obtuvieron de diversas casas comerciales: Bethesda Research Laboratories (Bethesda, MD), Boehringer Mannheim Corporation (Indianapolis, IN), New England Biolabs (Beverly, MA), y Pharmacia (Piscataway, NJ), y se utilizaron de acuerdo con las condiciones especificadas por el proveedor.

Los reactivos empleados en la elaboración de amortiguadores, soluciones diversas y medios de cultivo se obtuvieron de distintas casas comerciales: Aldrich (Milwaukee, WI), BIO 101 (La Jolla, CA), Bio-Rad (Richmond, CA), GIBCO BRL (Grand Island, NY), Mallinckrodt Specialty Chemicals Co. (St. Louis, MO), New England Nuclear (Boston, MA), Pharmacia (Piscataway, NJ), Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) y United States Biochemical Corporation (Cleveland Ohio).

II. Familias y su evaluación clínica.

Se analizaron 194 individuos pertenecientes a siete árboles genealógicos en los cuales se segrega la enfermedad de CMT1A. En ellos se puede observar la transmisión hombre a hombre, y de generación en generación, característico de una enfermedad autosómica dominante (Figura 3). Seis de estas familias, HOU1 (32), HOU2, HOU42 (55), HOU85, HOU88, y HOU89 son de ascendencia Acadio-Francés, mientras que la familia HOU76 es de ascendencia Judía Ashkenazic. Todos los individuos se sometieron a una meticulosa evaluación clínica y electrofisiológica. Puesto que la disminución en la VCN es un signo con penetrancia completa, inclusive para individuos asintomáticos con CMT1A, se utilizó este parámetro para diagnosticar correctamente la enfermedad. Por tal motivo, a cada uno de los individuos se le determinó la VCN bilateralmente de los nervios mediano y cubital. Una VCN menor de 40 m/seg es diagnóstica de CMT1A.

De cada individuo se obtuvo sangre periférica y se utilizó para aislar DNA genómico de alto peso molecular (73). Además, a cada uno de los individuos se le comprobó el origen paterno y materno utilizando el marcador molecular muy polimórfico denominado YNH24 (locus D2S44) (64,74).

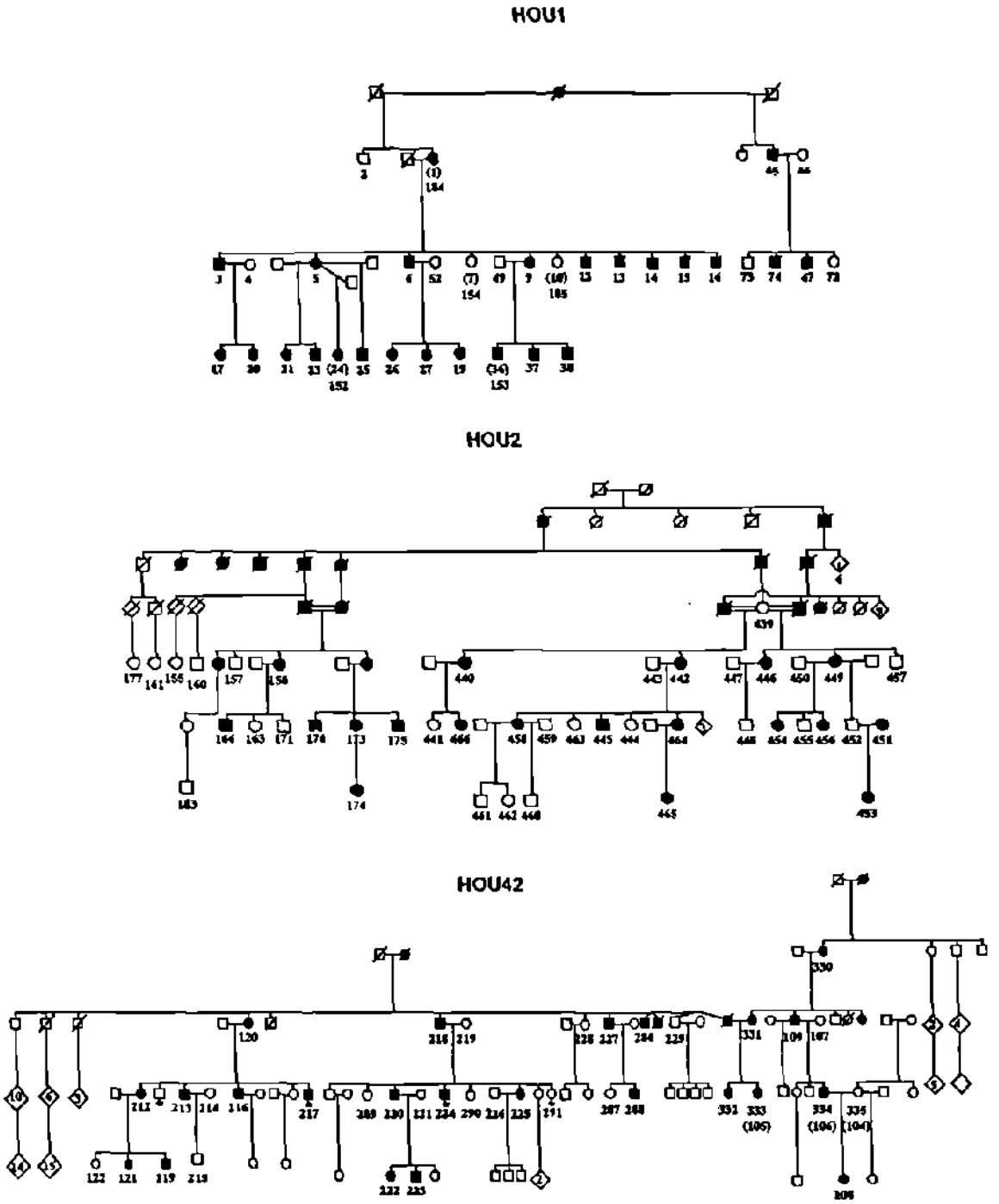


Figura 3A. Arboles genealógicos segregando la enfermedad de CMT1A.

Todos son de origen Acadio-Francés. Los números debajo de cada símbolo corresponden a la identificación del laboratorio para cada individuo. Note la transmisión de la enfermedad hombre a hombre y sin saltar generaciones, característico de una herencia autosómica dominante.

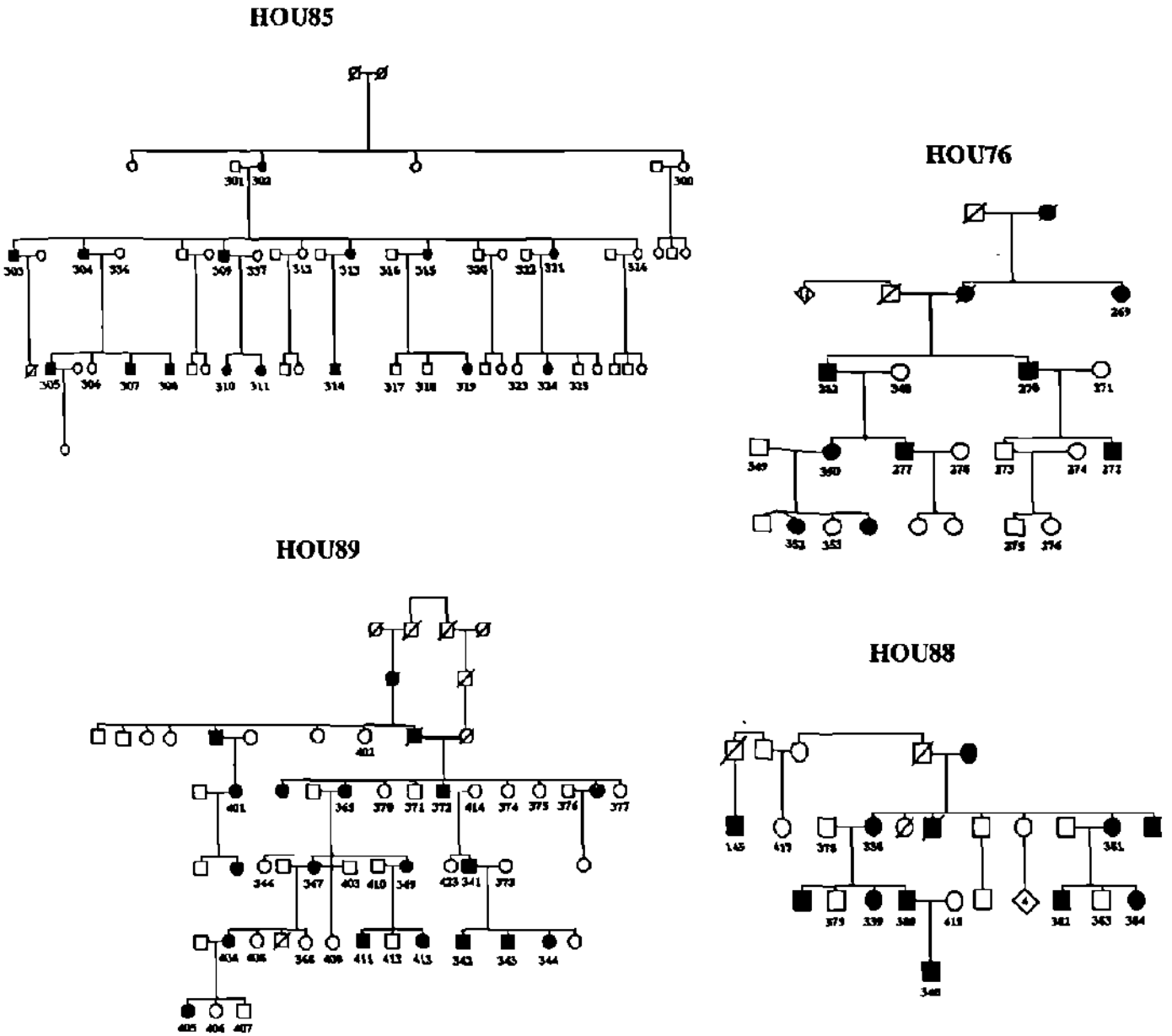


Figura 3B.- Arboles genealógicos segregando la enfermedad de CMT1A.

Todos son de origen Acadio-Francés, excepto HOU72 el cual es de descendencia Judía. Los números debajo de cada símbolo corresponden a la identificación del laboratorio para cada individuo. Note la transmisión de la enfermedad hombre a hombre y sin saltar generaciones, característico de una herencia autosómica dominante.

III. Marcadores genéticos.

Los marcadores genéticos que se utilizaron en este trabajo se describen en la Tabla 1. Para cada uno de ellos se purificó DNA a gran escala por el método de lisis alcalina, seguido por una purificación en gradientes de cloruro de cesio, de acuerdo al procedimiento descrito por Maniatis y cols. (75).

IV. Aislamiento de cósmidos.

Dos de las secuencias (GT)n descritas en este trabajo (pRM7-GT y OS1-βGT) se identificaron en los cósmidos cH3 y cO15F4, los cuales corresponden respectivamente a los marcadores FG1 y al gen de la subunidad β del receptor muscular de la acetilcolina. Para la obtención de estos cósmidos se utilizó una librería de cósmidos, específica del cromosoma humano 17, construída en el laboratorio National Lawrence Livermore (Livermore, California). El tamizaje de la librería se realizó según se describe brevemente a continuación.

A. Preparación de las membranas. Aproximadamente 10,000 bacterias portando cósmidos se crecieron durante aproximadamente 12 h en membranas de nylon (Genescreen Plus) colocadas sobre cajas de cultivo conteniendo medio Luria-Bertani suplementado con ampicilina a 50 μg/ml. Posteriormente, para amplificar los cósmidos, las membranas se transfirieron a cajas de cultivo conteniendo el mismo medio, pero suplementado con cloranfenicol a 200 μg/ml. Las colonias bacterianas se lisaron directamente sobre la membrana con una solución de SDS al 5% y SSC 2X durante 5 min. Enseguida las membranas se pusieron en un horno de microondas de 700 W durante 5 min en el nivel máximo de poder, se secaron al aire y se hornearon al vacío durante 2 h a 80^{0}C. Finalmente las membranas se lavaron dos veces en una solución conteniendo Tris 50 mM pH 8, NaCl 1M, EDTA 1 mM y SDS al 0.1%, a 50^{0}C durante 15 min cada lavado.

B. Hibridación de las membranas. El procedimiento de hibridación y lavado de las membranas que a continuación se describe, es el mismo que se utilizó en todas las hibridaciones referidas en este trabajo. Las membranas se prehibridaron e hibridaron a una temperatura de 65^{0}C en una solución compuesta de NaCl 1M, SDS 1%, sulfato de dextran al 10% y DNA sonicado de placenta humana a una concentración de 0.25 mg/ml. El tiempo de la prehibridación fué de 2 h al término del cual se adicionó la sonda radiactiva previamente desnaturalizada por calor y se dejó hibridar durante 16 h. El lavado de las membranas consistió en lo siguiente: un lavado inicial de 5 min

Tabla 1. Marcadores utilizados en este estudio para la identificación de repeticiones (GT)n.

MARCADOR	LOCUS	UBICACION	RFLP	ALELOS	REFERENCIAS
EW301	D17S58	17cen-p11.2	*Taq*I	4.5/3.1 kb	Barker et al., 1987
			*Bgl*II	10.0/8.0 kb	
c1516	D17S258	17p11.2	*Hind*III	22kb/12+10kb	Patel et al., 1989
p1516-R4	D17S258	17p11.2	*Msp*I	3.3/2.4 kb	Franco et al., 1990
pA1041	D17S71	17p11.2	*Msp*I	2.4/1.9 kb	Nakamura et al., 1988
			*Pva*II	3.2/3.0 kb	
S6.1-HB2	D17S445	17p11.2	*Msp*I	1.0/1.1 kb	Patel et al., 1990
			*Sst*I	12.2/7.1 kb	
			*Msp*I	1.2/1.6kb	
FG-1	D17S446	17p11.2	*Apa*I	12.0/7.5 kb	Guzzetta et al., 1991
YNM67-R5	D17S29	17p11.2	*Taq*I	3.4/2.2+1.3 kb	Ray et al., 1990
			*Bgl*II	8.1/6.7 kb	
EW401	D17S61	17p11.2-p12	*Msp*I	5.2/4.4 kb	Wright et al., 1990
EW402	D17S62	17p11.2-p12	*Msp*I	8.0/7.0 kb	Wright et al., 1990
EW403	D17S63	17p11.2-p12	*Msp*I	13.5/6.8 kb	Wright et al., 1990
EW404	D17S64	17p11.2-p12	*Msp*I	5.6/5.0 kb	Wright et al., 1990
EW405	D17S121	17p11.2-p12	*Msp*I	2.1/1.4 kb	Wright et al., 1990
VAW409R1	D17S122	17p11.2-p12	*Msp*I	5.3/2,7+2.6 kb	Wright et al., 1990
VAW409R3	D17S122	17p11.2-p12	*Msp*I	2.8/2.7/1.9 kb	Wright et al., 1990
VAW410R1	D17S123	17p11.2-p12	*Bgl*II	2.0/2.1 kb	Wright et al., 1990
			*Taq*I	10/9.4 kb	
VAW411R2	D17S124	17p11.2-p12	*Msp*I	10.5/6.1 kb	Wright et al., 1990
			*Bgl*II	11.0/10.7 kb	
VAW412R3	D17S125	17p11.2-p12	*Msp*I	10.5/5.4 kb	Wright et al., 1990
EW502	D17S66	17p11.2-p12	*Taq*I	2.2/1.4 kb	Wrightet al., 1990
EW503	D17S67	17p11.2-p12	*Bgl*II	6.9/5.7 kb	Wright et al., 1990
c1517	D17S259	17p11.2-p12			Patel et al., 1990
c1541	D17S260	17p13			Patel et al., 1990

a temperatura ambiente en una solución de SSC 2X y 0.1% de SDS; enseguida un lavado de 20 min a 65ºC en una solución de SSC2X y SDS al 0.1%, y finalmente un lavado de 10-20 min a 65ºC en una solución de SSC 0.1X y SDS al 0.1%. Las membranas se colocaron con un film sensible a la radiactividad (Kodak XAR-5) durante al menos12 horas a una temperatura de -70ºC.

V. Obtención de marcadores genéticos (GT)n.

A. Identificación de secuencias (GT)n. Para identificar este tipo de secuencias se analizaron por hibridación de DNA en gota (76) todos los marcadores genéticos disponibles en el laboratorio que habían mostrado cierto grado de ligamiento con la enfermedad de CMT1A (Tabla 1).

B. Preparación de la sonda. Se utilizó como sonda un copolímero sintético de doble cadena del dinucleótido guanina y timina denominado poly(dC-dA).poly(dG-dT) (Pharmacia). 100 ng de este copolímero se marcaron radiactivamente con [alfa-^{32}P]dCTP (New England Nuclear) utilizando el estuche de marcaje por translación de la muesca o "Nick Translation" (Amersham).

C. Hibridación de DNA en gota (76). Para esta hibridación se utilizó el dispositivo Vacusystem (BioRad) y se manejó de acuerdo a las instrucciones especificadas por el proveedor. Básicamente consistió en lo siguiente. Se colocó una membrana de nylon (Genescreen Plus) del tamaño apropiado en el Vacusystem y en cada uno de sus pozos se depositó 1 µg de DNA disuelto en 100 µl de agua. El DNA fué previamente desnaturalizado por ebullición durante 5 min y enfriado inmediatamente en hielo durante 5 min. Se aplicó vacío para succionar la solución y adherir el DNA a la membrana de nylon, enseguida se depositó 400 µl de NaOH 0.4 N en cada uno de los pozos y se aplicó nuevamente vacío. La membrana se separó del Vacusystem, se lavó con SSC 2X y se dejó secar al aire entre dos hojas de papel Whatman 3 MM. La membrana se prehibridó e hibridó de la manera anteriormente descrita, con las diferencias de que el tiempo de la hibridación fué de 5 h y la membrana se lavó únicamente a temperatura ambiente en una solución conteniendo SSC 2X y SDS al 0.1%. Finalmente la membrana se colocó con una película de Rayos X sensible a la radiactividad, a -70ºC durante 2 a 12 h. En este tipo de experimentos se utilizó como control positivo un fragmento de DNA de 150 pb que contenía una secuencia (GT)n.

D. Subclonación y caracterización de las secuencias (GT)n. Como se

mencionó en los antecedentes, el polimorfismo de las regiones (GT)n se determina por la técnica de PCR, y por lo tanto es importante conocer la secuencia nucleotídica de la región que flanquea la secuencia (GT)n para sintetizar los oligonucleótidos necesarios en la reacción de PCR. Por esto, una vez identificados los marcadores genéticos que contienen una secuencia (GT)n, es necesario subclonar un fragmento de DNA que contenga la secuencia repetida y que sea del tamaño adecuado para su secuenciación. La estrategia que se siguió para este propósito fué la de cortar los marcadores positivos para secuencias (GT)n con enzimas de restricción cuyo sitio de reconocimiento era de cuatro y cinco nucleótidos. Los fragmentos de DNA que resultaron de la digestión se separaron en un gel de agarosa al 1.5% y mediante una hibridación tipo Southern (55) se determinó cual de las enzimas producía un fragmento de DNA, portando la secuencia (GT)n, del tamaño adecuado para secuenceo. A diferencia del procedimiento de hibridación en gota seca, en el Southern, el DNA se separó inicialmente en un gel de agarosa y posteriormente se transfirió por capilaridad a la membrana de nylon. Una vez identificada la enzima de restricción que produjo el fragmento de interés, se cortó nuevamente el marcador para purificar dicho fragmento de un gel preparativo de agarosa utilizando el estuche de Geneclean (BIO 101). Finalmente este fragmento de DNA se subclonó en el plásmido pTZ19R mediante una reacción de ligación. La reacción de ligación se efectuó en un volumen final de 15 µl conteniendo: 300 ng del vector pTZ19R, 200 ng del fragmento portando la secuencia (GT)n, 1.5 µl de amortiguador One Phor-All Plus (Pharmacia), 1 mM de dATP y 1 U de DNA ligasa del bacteriófago T4. Esta mezcla se incubó a 16^{0}C durante al menos 1 h, y el producto de la ligación se utilizó para transformar *Escherichia coli* DH5 alfa Ca++ competentes. Las clonas recombinantes se analizaron con enzimas de restricción para corroborar que contuvieran el inserto del tamaño correspondiente y se les determinó la secuencia nucleotídica mediante el procedimiento de terminación de cadena (77,78) utilizando el estuche de "Sequenase Kit" (United States Biochemicals) en combinación con ^{35}S-α-dATP (Amhersam).

VI. Determinación de genotipos (GT)n.

Para determinar el polimorfismo en el locus de las secuencias (GT)n, de los diferentes individuos y obtener sus correspondientes genotipos (GT)n, se analizó el DNA genómico mediante un procedimiento previamente descrito en la literatura (70).

A. Aislamiento de DNA genómico de alto peso molecular. De cada individuo que formó parte de los diferentes árboles genealógicos se obtuvo DNA genómico de alto peso molecular a partir de sangre periférica de acuerdo al procedimiento descrito por Miller y cols. (73). De 15 a 25 ml de sangre se centrifugaron a 2500 rpm por 15 min en un tubo cónico de 50 ml, se descartó el plasma y se adicionó al tubo una solución conteniendo Sacarosa 0.32 M, Tris pH 7.5 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM y 1 % de Tritón X-100 hasta completar 50 ml, se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 30 min. Se centrifugó nuevamente, se descartaron ≈ 42 ml, la pastilla celular se resuspendió después de aforar nuevamente a 50 ml con la misma solución y se colocó nuevamente en hielo por 20 min. Se volvió a centrifugar y el precipitado se resuspendió en 3 ml de una solución conteniendo Tris pH 7.5 10 mM, NaCl 400 mM y EDTA 2 mM, y se le adicionó 0.1 ml de SDS al 20% y 0.5 ml de una solución de proteinasa K a 2 mg/ml. Se incubó por 12 h a 37°C y la proteinasa se eliminó con un tratamiento de fenol. Finalmente, el DNA se precipitó con 2 volúmenes de etanol y un décimo de acetato de sodio 3 M, se recuperó con una pipeta pasteur y se resuspendió en TE (Tris 10 mM pH 7.5 y EDTA 1 mM).

B. Marcaje de oligonucleótidos. Uno de los dos oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR, se marcó radiactivamente en su extremo 5' utilizando la enzima polinucleótido cinasa. El marcaje se realizó en un volumen final de 15 µl conteniendo: 1.2 µM de oligonucleótido, 100 µCi de [γ-^{32}P]ATP con una actividad de 6000 Ci/mmol, amortiguador One Phor-All Plus (Pharmacia) diluido a una concentración final de 1X, y 10U de la enzima. La mezcla se incubó a una temperatura de 37°C por 30 minutos, y la enzima se inactivó a 65°C por 10 minutos.

C. Reacción de PCR. La reacción de PCR se realizó utilizando condiciones estandar (79) en un volumen final de 25 µl que contenía: 300 ng de DNA genómico, cada uno de los dos oligonucleótidos que flanquean la secuencia (GT)n a una concentración de 1 µM, 0.2 µl de uno de estos dos oligonucleótidos marcado radiactivamente, 250 µM de cada uno de los 4 desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 2.5 µl de buffer de PCR (KCl a 500 mM, Tris-HCl 120 mM pH 8.0, MgCl2 a 1.5 mM, y gelatina al 0.01%), y 0.63 U de la enzima DNA polimerasa "Ampli-Taq" (Cetus). Las condiciones de la reacción de PCR fueron una desnaturalizacion inicial de 5 min a 94°C; seguida por 30 ciclos de amplificación, consistiendo cada ciclo de 1 min de desnaturalización a 94°C, 1 min a 55°C y 2 min de polimerización a 72°C; y una extensión final de 7 min a 72°C. 1.5 µl del producto de la

reacción de PCR se mezcló con 2 µl de formamida (Stop solution, United States Biochemical Corporation) y se analizó en un gel de poliacrilamida al 6% del tipo que se usa para secuenciación de DNA. La electroforesis se desarrolló durante 3.5 hrs a 40 W. Los geles se secaron y se colocaron con un film Kodak XAR-5 durante 2-12 horas a una temperatura de -70°C. Para determinar el tamaño de los alelos (GT)n de los diferentes individuos, estos alelos se compararon en el gel de sequenceo con el producto del PCR del respectivo plásmido recombinante que contenía la secuencia (GT)n. Puesto que se obtuvo la secuencia nucleotídica de estos plásmidos, se conocía el tamaño exacto del producto de PCR de cada marcador (GT)n.

D. Interpretación de los resultados. Los genotipos (GT)n, es decir los alelos (GT)n para cada individuo se designaron de acuerdo a su tamaño en pares de bases: A= 165, B=163, C=161, D=159, E=157, F=155 y G=153. A los individuos que se les observó únicamente un alelo se registraron como poseedores de dos copias de ese alelo. Los genotipos para cada individuo se leyeron sin conocer el estado de su enfermedad , y se confirmaron por otros dos investigadores. En este tipo de polimorfismos de secuencias repetidas se observan invariablemente bandas de menor tamaño y menos intensas que la banda principal de los alelos; sin embargo, es posible leer los genotipos sin ambigüedad (72).

VII. Obtención de genotipos utilizando RFLP.

A. Análisis tipo Southern. En este análisis se utilizó el DNA genómico de alto peso molecular purificado anteriormente. Muestras de DNA de los diferentes individuos (5.5 µg), se digirieron con la enzima de restricción *MspI* de acuerdo a las condiciones especificadas por la compañía, utilizando 3-4 U/µg de DNA. Los DNAs digeridos se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TAE (Tris-HCl 40mM, pH 8.5, acetato de sodio 40 mM, y EDTA 2 mM) durante aproximadamente 16 h con un voltaje constante de 35 volts y se transfirieron a una membrana de Nylon (Genescreen Plus). La transferencia e hibridación del DNA se realizaron de acuerdo al procedimiento ya descrito anteriormente(55). En este caso, después de la hibridación las membranas se lavaron con una solución de SSC 2X y SDS al 0.1% a temperatura ambiente durante 5 min, enseguida con SSC2X y SDS al 0.1% a 65°C durante 30 min y finalmente con SSC 0.1X y SDS al 0.1% a 65°C durante 10-20 min. Las membranas se colocaron con un film sensible a la radiactividad.

B. Marcaje radiactivo de las sondas. El marcaje se realizó con 100 ng de DNA de las sondas ya sea en solución o en agarosa de bajo punto de fusión previamente fundida, mediante el procedimiento de Feinberg and Vogelstein (80) utilizando ^{32}P-α–dCTP (New England Nuclear) . Cada una de las sondas radiactivas se precipitó agregando espermina a 10 mM, para eliminar los nucleótidos libres (81).

C. Preasociación de las sondas. Debido a la relativa abundancia de secuencias repetidas en el genoma humano (por ejemplo la secuencia Alu), es muy alta la probabilidad de que el DNA utilizado como sonda contenga una de ellas. Si este es el caso, la sonda hibridará con un gran número de fragmentos de DNA y como resultado de la hibridación se observará una señal radiactiva a lo largo del carril. Para evitar ésto, antes de que se utilizaran en la hibridación, las sondas radiactivas se mezclaron en una solución de hibridación que contenía DNA sonicado de placenta humana a una concentración final de 0.25 mg/ml. Esta mezcla se calentó a 95°C durante 5 min y la preasociación se realizó a 65°C durante dos horas. Durante este tiempo las secuencias repetidas de la sonda hibridarán con las secuencias repetidas del DNA sonicado de placenta humana, y de esta manera nó hibridarán con el DNA adherido a la membrana de nylon.

D. Cuantificación de las bandas de hibridación. La cuantificación de las bandas de hibridación, correspondientes a los alelos *MspI* en las autorradiografias de los Southern se determinó al comparar por inspección visual y por densitometría (LKB Ultrascan) la señal de hibridación entre las dos bandas de los alelos polimórficos *MspI* de individuos heterocigotos.

VIII. Separación de los alelos polimórficos *MspI* del marcador VAW409R1.

La separación y purificación de los alelos se realizó según el método descrito por Bedford y van Helden (82). El DNA genómico (5 μg) correspondiente a los individuos de una familia del árbol genealógico HOU42 se digirió con la enzima de restricción *MspI* y los fragmentos de DNA resultantes de la digestión se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE. Para permitir una buena separación de los fragmentos de DNA, la electroforesis se realizó a 20V, durante aproximadamente 20 horas. Del gel se cortaron por separado los fragmentos de 3 y 6 Kb, correspondientes al tamaño de los alelos polimórficos *MspI* del marcador pVAW409R1, y se purificaron de la agarosa utilizando el estuche de

Geneclean (BIO101). A cada uno de estos DNA se le determinó por PCR el número de alelos (GT)n utilizando los oligonucleótidos del marcador pRM11-GT.

IX. Construcción y análisis de híbridos de células somáticas.

Se utilizaron híbridos de células somáticas para separar los cromosomas homólogos, paterno y materno, número 17, de los individuos 42-331, 42-332 y 42-333. Los híbridos se construyeron de acuerdo a lo descrito por Zoghbi y cols. (83), usando como célula paterna la línea celular de Hamster Chino a23, deficiente en timidina kinasa (84). Brevemente, se crecieron en dos cajas de cultivo de 100mm 10^7 células a23, durante 16 a 24 horas y posteriormente se lavaron con medio Eagle modificado por Dulbecco (MEMD). 10^7 linfoblastos de cada individuo se resuspendieron en 10 ml de solución salina de Hanks (GIBCO), adicionada con 250 µl de una solución de fitohemaglutinina (Sigma) a 1 mg/ml. A cada una de ambas cajas de cultivo que contenían las células a23, se les adicionó 5 mls de la suspensión de linfoblastos, y se incubaron a 37°C durante 15 min. Posteriormente se aspiró la solución y se vertieron sobre cada caja 2 ml de una solución de polietilenglicol 1500 al 50% (Boehringer Mannheim Biochemicals). Transcurrido 1 min se aspiró la solución del polietilenglicol, se lavaron las células tres veces con MEMD y se incubaron en el mismo medio a 37°C durante 30 min. Nuevamente se aspiró el medio, y se depositó en cada caja 10 ml de medio MEMD suplementado con 10% de suero fetal de ternera (SFT), y se incubaron nuevamente durante 12 horas. Los híbridos formados se seleccionaron en medio MEMD conteniendo 10% de SFT, 0.1 mM de hipoxantina, 0.001 mM de aminopterina, y 0.01 mM de timidina. Transcurridos de 12 a 14 días se aislaron los híbridos resultantes y se transfirieron a cajas de microtitulación de 24 pozos.

Para determinar cual de los dos cromosomas homólogos 17 se retuvo en los híbridos, se utilizó el marcador genético (GT)n OS1-βGT (este marcador se localiza fuera de la región duplicada y forma parte de un intrón del gen para la subunidad beta del receptor muscular de la acetilcolina). Las células que crecieron en cada uno de los pozos, se colectaron y se lisaron por ebullición en 30 µl de buffer de PCR. Cada uno de los lisados se sometió a una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos que flanquean la secuencia (GT)n del marcador OS1-βGT . La reacción de PCR se realizó de la manera anteriormente descrita utilizando ya sea 3 µl de cada lisado celular o 100 ng de DNA genómico de los pacientes seleccionados. Finalmente, para determinar que cromosoma 17 se retuvo, se compararon los alelos (GT)n de los

linfoblastos del paciente contra el alelo presente en cada híbrido.

RESULTADOS.

Con el objetivo de definir con mayor precisión el locus para la enfermedad de CMT1A, se inició la identificación de secuencias (GT)n en diferentes marcadores genéticos ligados al CMT1A (Tabla 1).

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

Inicialmente llevamos a cabo un experimento piloto para determinar la factibilidad de identificar secuencias (GT)n con el procedimiento de hibridación en gota. El resultado se muestra en la Figura 4, donde se observa una señal de hibridación fuerte en los testigos positivos y prácticamente nula con los negativos. Estos resultados nos indicaron que el procedimiento funcionó adecuadamente, por lo que procedimos a determinar cuales de los marcadores citados en la Tabla 1 contenían una secuencia (GT)n. De esta tabla, los marcadores genéticos S6.1-HB2 y FG1, corresponden a dos nuevos marcadores de la región cromosómica 17p11.2 que se identificaron y clonaron en nuestro laboratorio (57,58).

De todos los marcadores citados en la Tabla 1, únicamente 5 resultaron positivos para la presencia de una secuencia (GT)n: cH3, c1517, c1541, c1516 y VAW409R1. En la misma Figura 4, se muestra únicamente el resultado de la hibridación en gota para los marcadores cH3 y c1517.

El siguiente paso fué el identificar y subclonar de estos marcadores un fragmento del tamaño apropiado para secuenciación y que contuviera la secuencia (GT)n. La estrategia que seguimos fué el de cortar estos cinco marcadores con diferentes enzimas de restricción y mediante el procedimiento de Southern identificar los fragmentos de interés que contuvieran una secuencia (GT)n. Cabe señalar que los marcadores cH3, c1517, c1541 y c1516 corresponden a cósmidos con un inserto de DNA humano de aproximadamente 40 kb, mientras que el marcador VAW409R1 corresponde al plásmido pUC18 con un inserto de DNA humano de 11 kb.

En la Figura 5 se muestra el patrón electroforético de los fragmentos de restricción del cósmido cH3 analizados en un gel de agarosa al 1.5%. Este mismo gel se utilizó en el análisis tipo Southern para identificar cual fragmento de restricción contenía la secuencia (GT)n (Figura 6). Como se

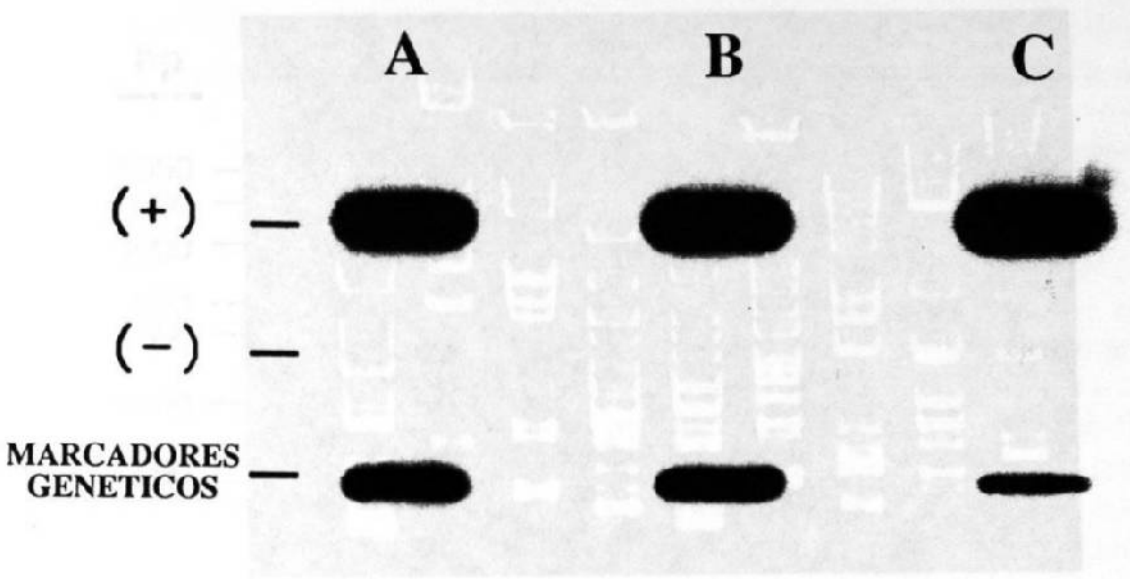


Figura 4. Identificación de marcadores genéticos que contienen una secuencia (GT)n por hibridación en gota.

Autorradiografía de una hibridación utilizando como sonda radiactiva un copolímero bicatenario sintético del dinucleótido guanina y timina. Las señales en los tres carriles A, B, y C de la línea indicada (+), corresponden al testigo positivo del experimento, el cual consistió de un fragmento de DNA de 150 pb (20 ng) que contenía una secuencia repetida del dinucleótido guanina y timina. En los carriles de la línea indicada (-) se encuentran los testigos negativos del experimento, los cuales corresponden a 1 μg de los siguientes plásmidos: A) pTZ19R, B) pUC18 y C) pBR322. En la tercer línea se colocaron 1 μg de los siguientes marcadores genéticos: A) cH3, B) c1517 y C) c1516.

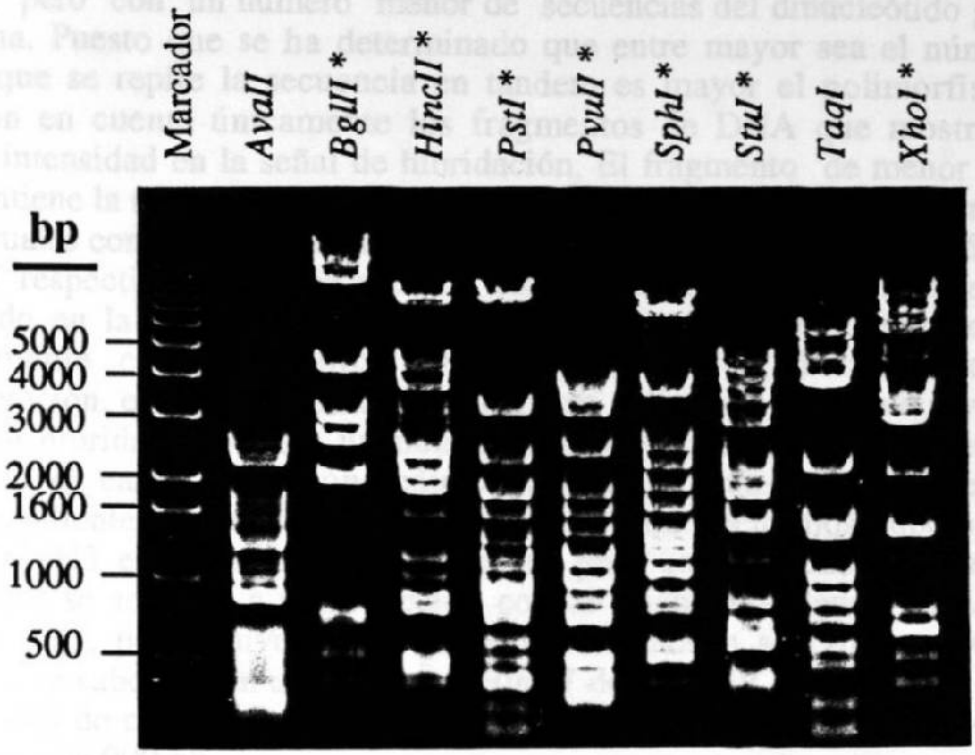


Figura 5. Patrón de restricción del marcador genético cH3.

Fotografía de los fragmentos de restricción del marcador cH3. Cada carril representa la digestión de 1 µg de DNA del marcador cH3 con las diferentes enzimas de restricción indicadas en la parte superior de la figura, y se analizaron en un gel de agarosa al 1.5%. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó por iluminación con luz ultravioleta. El gran número de bandas es debido a que este marcador corresponde a un cósmido con un fragmento de DNA humano de aproximadamente 40 kb. Este mismo gel se utilizó en el procedimiento tipo Southern para identificar por hibridación molecular cual fragmento de restricción contenía la secuencia (GT)n (Figura 6). El * indica que las digestiones contenían además la enzima *EcoRI*.

observa en la Figura 6 prácticamente en todos los carriles se puede distinguir una banda principal con respecto a la señal de hibridación. Las otras señales de hibridación, de diferente intensidad deben corresponder también a secuencias (GT)n, pero con un número menor de secuencias del dinucleótido guanina y timina. Puesto que se ha determinado que entre mayor sea el número de veces que se repite la secuencia en tandem es mayor el polimorfismo, se tomaron en cuenta únicamente los fragmentos de DNA que mostraron la mayor intensidad en la señal de hibridación. El fragmento de menor tamaño que contiene la secuencia (GT)n del cósmido cH3 se observa en los carriles 2 y 9, los cuales corresponden a una digestión con las enzimas de restricción *AvaII* y *TaqI* respectivamente. De acuerdo con el patrón de digestión enzimática mostrado en la Figura 5, se observa que el cósmido cH3 fué fraccionado mayormente con la enzima *AvaII* que con *TaqI*. Tomando esto en consideración, es muy probable que en el área del gel de agarosa a nivel de la señal de hibridación exista un número mayor de fragmentos diferentes de DNA en el carril correspondiente a la enzima *AvaII*, que en el carril correspondiente a la enzima*TaqI*. Por esta razón decidimos subclonar del cósmido cH3 el fragmento *TaqI* positivo para una secuencia (GT)n. Este fragmento se sometió a una reacción con el fragmento klenow de la DNA polimerasa I, para convertir sus extremos de cadena sencilla en extremos romos, y se subclonó en el sitio romo *HincII* de pTZ19R. De acuerdo con los marcadores de peso molecular utilizados, este fragmento *TaqI* correspondió a un tamaño de 900 pb.

En las Figuras 7 y 8 se muestran los resultados del Southern para la identificación de secuencias (GT)n correspondientes respectivamente a los marcadores c1517 y c1541. En estos casos no se muestra el patrón electroforético de la restricción de cada uno de ellos, sin embargo al igual que para el marcador cH3 se siguieron los mismos criterios para la selección del fragmento a subclonar que contuviera la secuencia (GT)n.

De acuerdo con el patrón de restricción y el resultado del Southern para el marcador c1517, mostrado en la Figura 7, se seleccionó el fragmento *PstI* de 450 pb presente en el sexto carril, y se subclonó en el mismo sitio del vector pTZ19R. Para el caso del marcador c1541, Figura 8, se seleccionó el fragmento*SphI* de 550 pb presente en el octavo carril, y se subclonó en el sitio correspondiente de pTZ19R.

En el caso del marcador VAW409R1, inicialmente se identificó la secuencia (GT)n en un fragmento *PstI* de 2000 pb (Figura 10). Sin embargo, debido a que era un fragmento muy grande para secuenciar, este

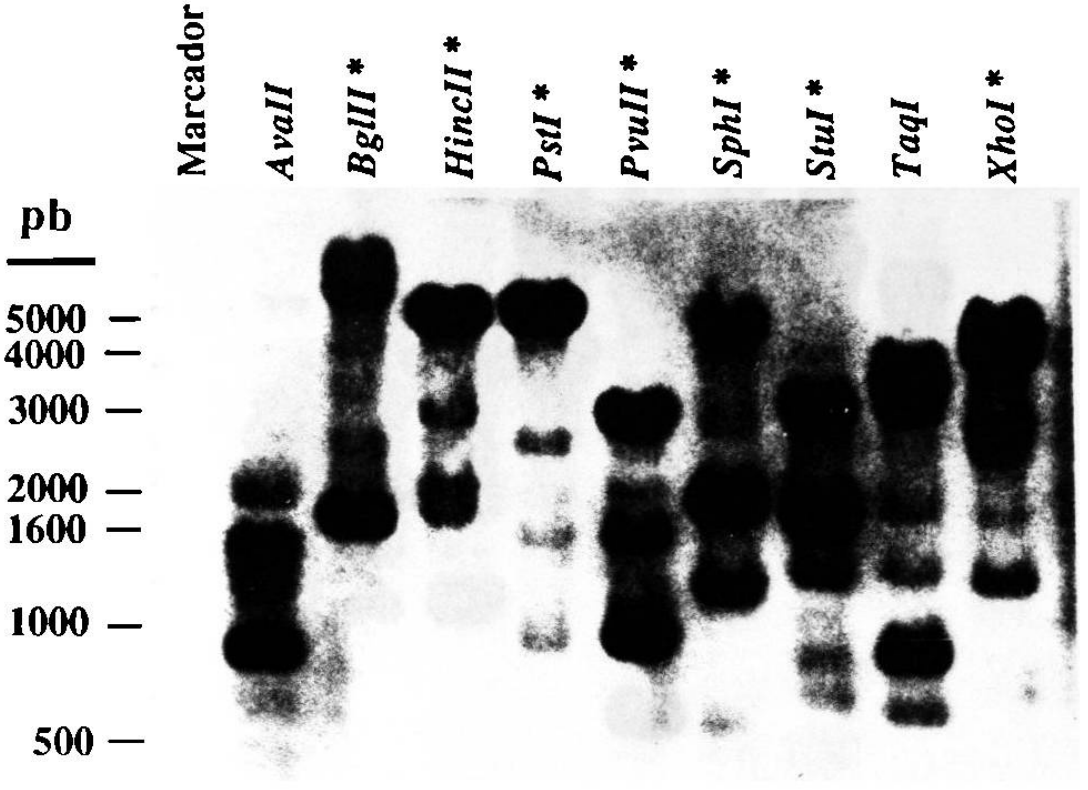


Figura 6. Detección de secuencias (GT)n por hibridación tipo Southern en fragmentos de restricción del marcador genético cH3.

Autorradiografía de una hibridación tipo Southern utilizando como sonda radiactiva un copolímero sintético del dinucleótido guanina y timina. Para este experimento se utilizó el gel mostrado en la figura 5. En la parte superior de la figura se indican las diferentes enzimas de restricción utilizadas. El * indica que las digestiones contenían además la enzima *EcoRI*. De este marcador se escogió para subclonar en pTZ19R el fragmento correspondiente a la señal de hibridación en el carril *TaqI*, con un tamaño ≈ de 1000 pb.

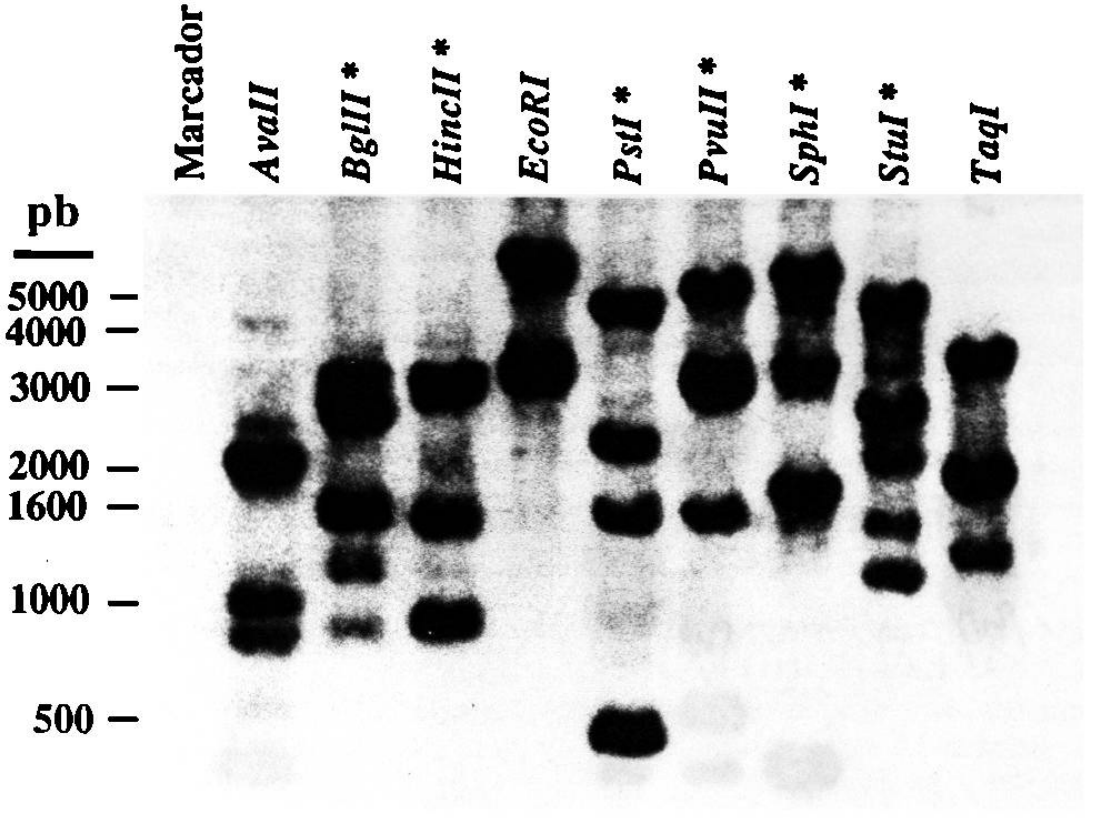


Figura 7. Detección de secuencias (GT)n por hibridación tipo Southern en fragmentos de restricción del marcador genético c1517.

Este es un experimento similar al descrito en la figura 6, excepto que corresponde al marcador c1517. El * indica que las digestiones contenían además la enzima *EcoRI*. De este marcador se escogió para subclonar en pTZ19R el fragmento correspondiente a la señal de hibridación del carril *PstI*, con un tamaño de ≈500 pb.

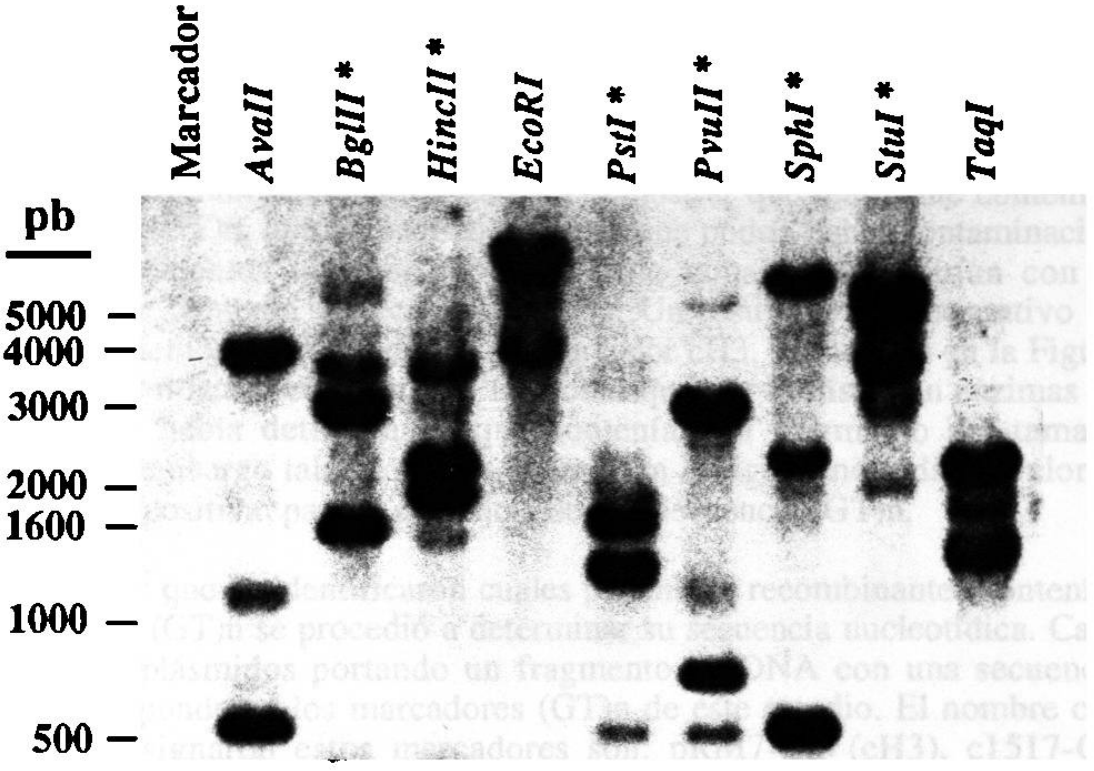


Figura 8. Detección de secuencias (GT)n por hibridación tipo Southern en fragmentos de restricción del marcador genético c1541.

Este es un experimento similar al descrito en la figura 6, excepto que corresponde al marcador c1541.El * indica que las digestiones contenían además la enzima *EcoRI*. De este marcador se escogió para subclonar en pTZ19R el fragmento correspondiente a la señal de hibridación del carril *SphI*, con un tamaño de ≈500 pb.

fragmento se digirió con las enzimas de restricción *AluI*, *HaeIII* y *RsaI*, y los fragmentos resultantes de la digestión se purificaron de un gel de agarosa al 1.5%. Estos fragmentos se sometieron a una Hibridación de DNA en gota para determinar cual de ellos contenía el fragmento más apropiado para la secuenciación. De acuerdo con el resultado (datos no mostrados) se seleccionó un fragmento *HaeIII* de 250 pb y se subclonó en el sitio *HincII* del vector pTZ19R.

Cada uno de los plásmidos recombinantes que se obtuvieron de la clonación de las secuencias (GT)n de los diferentes marcadores, se analizaron por la técnica de hibridación en gota para demostrar que realmente contenían una secuencia (GT)n. Esto se realizó debido a que podría haber contaminación con otros fragmentos que por ser del mismo tamaño comigrarían con el fragmento que contenía la secuencia (GT)n. Un resultado representativo de este procedimiento, correspondiente al marcador cH3, se muestra en la Figura 10. En esta hibridación se utilizaron 13 clonas que por análisis con enzimas de restricción se había determinado que contenían un fragmento del tamaño esperado, sin embargo tal y como se observa en la figura, no todas las clonas dan una señal positiva para la presencia de una secuencia (GT)n.

Una vez que se identificaron cuales plásmidos recombinantes contenían una secuencia (GT)n se procedió a determinar su secuencia nucleotídica. Cada una de estos plásmidos portando un fragmento de DNA con una secuencia (GT)n, corresponden a los marcadores (GT)n de este estudio. El nombre con el cual se designaron estos marcadores son: pRM7-GT (cH3), c1517-GT (c1517), c1541-GT (c1541) y pRM11-GT (VAW409R1).

II. Caracterización de los marcadores (GT)n.

Con el propósito de caracterizar la secuencia repetida de los marcadores (GT)n y sintetizar oligonucleótidos que flanquean esta región, para la obtención de los genotipos (GT)n, se determinó la secuencia nucleotídica de estos marcadores por el método de Sanger (77). El tipo de la secuencia repetida de los marcadores (GT)n es la siguiente:

pRM7-GT:	$(GT)_{19}$
c1517-GT:	$(GT)_{13}$ G $(GT)_2$
c1541-GT:	$(TGC)_4$ TTGC $(GT)_3$ AT$(GT)_{10}$
pRM11-GT:	$(TA)_5$ N $(GT)_{17}$ $(AT)_8$

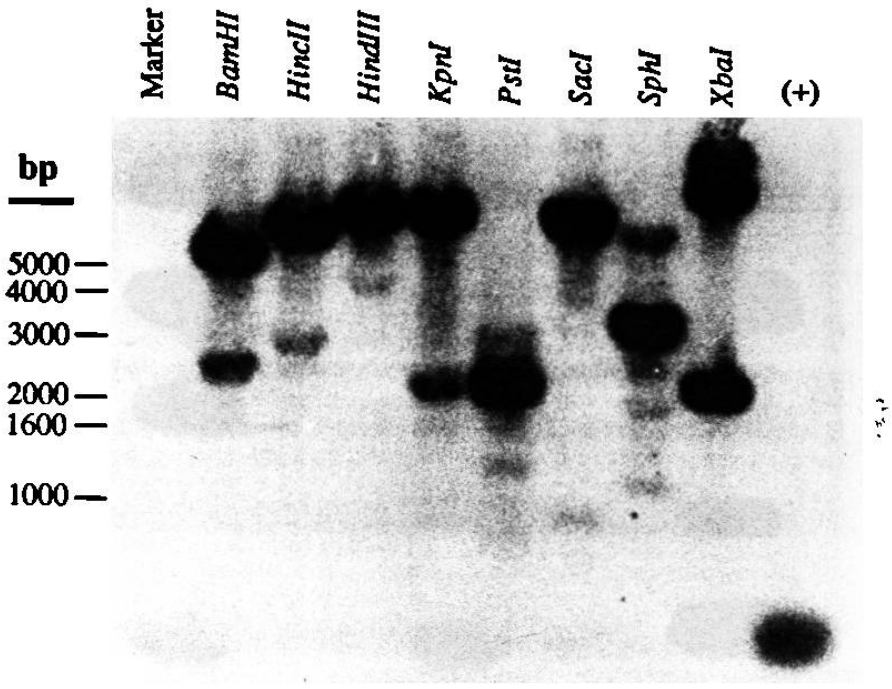


Figura 9. Detección de secuencias (GT)n por hibridación tipo Southern en fragmentos de restricción del marcador genético VAW409R1.

Este es un experimento similar al descrito en la figura 6, excepto que corresponde al marcador VAW409R1. Del fragmento *PstI* de ≈2000 pb positivo para una secuencia (GT)n, se identificó y subclonó en pTZ19R un fragmento *HaeIII* de 250 pb que contenía la secuencia (GT)n. El carril (+) representa un testigo positivo que corresponde a un fragmento de DNA de 150 pb con una secuencia (GT)n.

Note que la secuencia (GT)n del marcador c1541-GT está precedida por una secuencia repetida del trinucleótido TGC. Mientras que la secuencia (GT)n del marcador pRM11-GT está flanqueada por secuencias repetidas del dinucleótido adenina y timina.

En la Figura 11 se muestra únicamente la secuencia nucleotídica completa del marcador pRM11-GT, el cual es el marcador más relevante de este estudio. En ella se señalan las secuencias utilizadas para la síntesis de oligonucleótidos, así como la región de la secuencia repetida. De esta figura se puede deducir que el producto de una reacción de PCR a partir de este marcador, utilizando sus respectivos oligonucleótidos, corresponde a un tamaño de 159 pb. En base al tamaño de este producto se determinó por comparación el tamaño de todos los alelos (GT)n de las personas que se analizaron con este marcador.

Las secuencias nucleotídicas de los marcadores genéticos (GT)n que se seleccionaron para la síntesis de oligonucleótidos, en dirección 5'-3', son las siguientes:

RM7-GT: ATTATTTATTTTGATGTCTGAACAC y CTTGGTGAAACGCTGTCTGTCA
c1517-GT: CAGGTGCACAGTCACACACTGG y GGCTTAGCTGCTGTTTCATGGC
c1541-GT: CTCCCCAACATGCTTTCTCTC y AATGGCTCCAAAAGGAGATATTG
RM11-GT: CAGAACCACAAAATGTCTTGCATTC y GGCCAGACAGACCAGGCTCTGC

La funcionalidad de estos oligonucleótidos se determinó mediante la reacción de PCR utilizando como templados sus respectivos marcadores y DNA genómico humano. En el presente trabajo se describe el uso de los marcadores pRM11-GT y OS1-βGT; y en los artículos que se anexan de Greenberg y cols. (57) y Guzzetta y cols. (85) se describe el de los otros tres marcadores (GT)n.

```
GGCCAGACAG ACCAGGCTCT GCTCTACTTA AATAATCTTT ATGTATATAT ATATGCACAC   60
CCGGTCTGTC TGGTCCGAGA CGAGATGAAT TTATTAGAAA TACATATATA TATACGTGTG

ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAT ATATATATAT ATATAAATAA ACTGTGGTAG  120
TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTA TATATATATA TATATTTATT TGACACCTAC

CTTTATTTGT ATTTGAATGC AAGACATTTT GTGGTTCTGT AATTCCAAAA AAAAGAAGAA  180
GAAATAAACA TAAACTTACG TTCTGTAAAA CACCAAGACA TTAAGGTTTT TTTTCTTCTT

AGAAAGAGAA AGAGTGACTT CAGCAGAACA GCTCTCTGCA ATCAGCCAAG AACAAGGAAA  240
TCTTTCTCTT TCTCACTGAA GTCGTCTTGT CGAGAGACGT TAGTCGGTTC TTGTTCCTTT

CTGGGAGTGA AATAGGGCCT
GACCCTCACT TTATCCCGGA
```

Figura 11. Secuencia nucleotídica del marcador pRM11-GT.

En esta figura se muestra la secuencia de nucleótidos en cadena doble del marcador pRM11-GT. Esta secuencia nucleotídica se obtuvo de la autorradiografía del gel de secuenciamiento para este marcador mostrado en la figura 14. Se subrayan las secuencias de nucleótidos utilizadas para la síntesis de oligonucleótidos, mientras que la región repetida se delimita por los paréntesis.

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

Con cada uno de estos marcadores se analizó inicialmente en todos los individuos del árbol genealógico HOU89 (éste se escogió por que es el árbol con un número mayor de generaciones). Para nuestra sorpresa, al analizar los genotipos (GT)n que se obtuvieron con el marcador pRM11-GT, se observaron tres alelos (GT)n únicamente en tres individuos afectados con CMT1A. Además los tres individuos eran hermanos. En la Figura 12 se presentan los genotipos (GT)n de la familia del árbol genealógico HOU89 a la que pertenecen los pacientes con tres alelos (GT)n. Como se observa en la figura los individuos 89-342 y 89-343 muestran tres alelos (GT)n los cuales son similares a los alelos (GT)n de sus padres (89-341 y 89-373). Este resultado indicó que podría existir una duplicación de la secuencia de DNA del marcador pRM11-GT (marcador del locus D17S122), en los individuos afectados con CMT1A. Sin embargo, puesto que ésto se observó únicamente en tres de los trece individuos afectados con CMT1A del árbol genealógico HOU89, también cabía la posibilidad de que fuera un artefacto técnico.

Como se mencionó en resultados anteriores, el marcador pRM11-GT fué subclonado del marcador VAW409R1 el cual pertenece al locus D17S122. Puesto que el marcador VAW409R3 pertenece también al mismo locus se pensó que posiblemente la duplicación podría ser observada utilizando el polimorfismo tipo RFLP que se ha descrito para este marcador VAW409R3 con la enzima *MspI*. Ya que a los individuos de los árboles genealógicos presentes en la Figura 3 se les había analizado dicho polimorfismo con el marcador VAW409R3, nos enfocamos a analizar las autoradiografías de los Southern para determinar si los individuos afectados tenían un alelo extra para este marcador. En la siguiente sección se describen los hallazgos de este análisis.

IV. Confirmación de la duplicación del locus D17S122 por RFLP usando el marcador VAW409R3.

La probable duplicación del locus D17S122 que se observó en tres pacientes del árbol genealógico HOU89, dió pauta al análisis de los alelos RFLP de este locus. Por análisis tipo Southern se detectan en el locus D17S122 hasta tres diferentes alelos *MspI* en la población humana (y hasta dos alelos por individuo) utilizando el marcador VAW409R3; y únicamente dos diferentes alelos con el marcador VAW409R1 (56,86). Teniendo en cuenta

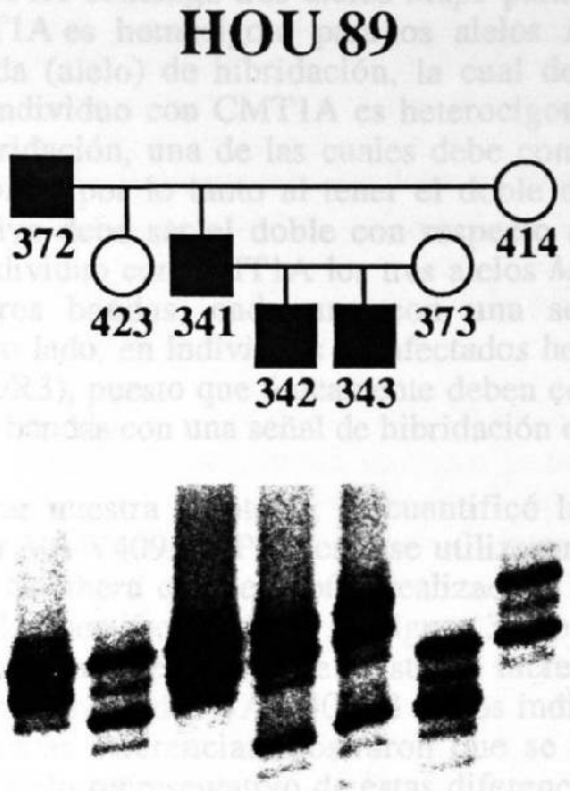


Figure 12. Observación inicial de tres alelos (GT)n en pacientes con CMT1A del árbol genealógico HOU89.

Alelos (GT)n para el marcador pRM11-GT en una familia del árbol genealógico HOU89. Se utilizan símbolos estandard y los individuos afectados se representan en negro. Las bandas de menor tamaño y menos intensas que las bandas principales de los alelos, son invariablemente observadas en los polimorfismos de secuencias repetidas; sin embargo es posible leer los genotipos sin ambiguedad (72). Note que en los pacientes 89-342 y 89-343 se observan tres bandas principales: tres alelos (GT)n (73).

que en individuos afectados con CMT1A hay tres copias del locus D17S122 y que el marcador VAW409R3 pertenece al mismo locus, cabe esperar que un individuo con CMT1A contenga tres alelos *MspI* para este marcador. Si el individuo con CMT1A es homocigoto para los alelos *MspI,* únicamente se observará una banda (alelo) de hibridación, la cual debe contener los tres alelos *MspI*; si el individuo con CMT1A es heterocigoto, se deben observar dos bandas de hibridación, una de las cuales debe contener dos de los tres posibles alelos *MspI,* y por lo tanto al tener el doble de DNA, su señal de hibridación radiactiva debe ser el doble con respecto a la señal de la otra banda; y si en el individuo con CMT1A los tres alelos *MspI* son diferentes se espera observar tres bandas, cada una con una señal de hibridación equivalente. Por otro lado, en individuos no afectados heterocigotos para este marcador (VAW409R3), puesto que únicamente deben contener dos alelos, se espera observar dos bandas con una señal de hibridación equivalente.

Para demostrar nuestra hipótesis, se cuantificó la dosis de los alelos *MspI* del marcador VAW409R3. Para esto se utilizaron las autoradiografías de los análisis tipo Southern que se habían realizado a los individuos de los siete árboles genealógicos presentes en la Figura 3. Los resultados de estas observaciones indican que efectivamente existe un incremento de la dosis de los alelos *MspI* para el marcador VAW409R3 en los individuos afectados con CMT1A. Además estas diferencias mostraron que se heredaban en forma mendeliana. Un ejemplo representativo de estas diferencias en la dosis de los alelos *MspI* se observa en la figura 3A del artículo anexo descrito por Lupski y cols. (73). Como se observa en esta familia, la señal de hibridación entre los dos alelos de un mismo individuo heterocigoto no afectado es equivalente (85-326 y 85-312) y por lo tanto les corresponde el genotipo AB. Por el contrario en los individuos heterocigotos afectados con CMT1A, aparentemente con el genotipo AB, la señal de hibridación entre sus dos alelos no es equivalente, y una de las bandas se observa con el doble de señal de hibridación con respecto a la otra (85-302, 85-303 y 85-304), por lo tanto, los genotipos reales para estos individuos afectados, 85-302, 85-303 y 85-304, deben ser respectivamente AAB, ABB y ABB. Si se analizan los genotipos de esta familia se deduce que el "cromosoma CMT1A" porta los alelos A y B, y que ambos se segregan en una forma Mendeliana con respecto a la enfermedad. Resultados similares se obtuvieron en todas las familias de los siete árboles genealógicos.

En la misma Figura (73) se observa también el resultado de una comparación por Southern utilizando el marcador VAW409R3, entre individuos heterocigotos afectados con CMT1A (panel C) y no afectados

(panel D). Nuevamente, se puede notar la presencia de un alelo extra al comparar la proporción de la señal de hibridación entre las bandas alélicas de un mismo individuo con CMT1A. Como se observa en el panel C, los individuos en los carriles 4-6 tienen el doble de señal para el alelo B, y por ende su genotipo es ABB, en tanto que los individuos en los carriles 7 y 8 muestran el doble de señal para el alelo A y por lo tanto su genotipo es AAB. La evidencia más concluyente de la presencia de tres alelos por RFLP, en pacientes con CMT1A, se observa en los individuos de los carriles 1 al 3 del panel C, los cuales tienen tres alelos polimórficos diferentes y además equivalentes en su señal de hibridación, y por ende les corresponde el genotipo ABC (este tercer alelo C, es raro en la población y únicamente se detectó en 3 de 131 pacientes con CMT1A).

Para corroborar que los individuos con CMT1A presentan un alelo extra, se cuantificó de acuerdo con la metodología, la señal en las bandas de hibridación de 76 individuos afectados heterocigotos para el marcador VAW409R3. Los resultados de este análisis indicaron que todos estos individuos afectados tenían cuantitativamente tres copias del locus D17S122. Por el contrario, en ninguno de 63 individuos no afectados heterocigotos para este marcador, se observó una diferencia cuantitativa en la dosis de sus alelos. Estos resultados demuestran que el genotipo con dos copias alélicas en una de las dos bandas de hibridación de los individuos heterocigotos fué específico para pacientes con CMT1A, y por lo tanto confirman que existe una duplicación del locus D17S122 en individuos afectados con CMT1A.

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

Con el marcador pRM11-GT se analizó el resto de los árboles genealógicos presentados en la Figura 3: cinco de ascendencia Acadio-Francés (HOU1, HOU2, HOU42, HOU85 y HOU89) y uno de ascendencia Judío Ashkenazic (HOU76) (73). En la Figura 13 se muestran los alelos correspondientes a cuatro familias de los árboles genealógicos HOU85, HOU1, HOU88 y HOU76. Como se observa en la figura, trece de quince individuos afectados con CMT1A tienen tres alelos (GT)n (por ejemplo, individuos 88-340 y 76-352), mientras que todos los individuos no afectados son ya sea homocigotos o heterocigotos para el marcador RM11-GT. Esto indica que existe una asociación entre la presencia de tres alelos detectados aquí por la secuencia (GT)n y la enfermedad de CMT1A. Los dos individuos afectados que no se les observa tres alelos (GT)n (88-339, 88-380) se debe a

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

Los genotipos (GT)n se obtuvieron por PCR como se describió en MATERIALES y METODOS , y se indican debajo da cada individuo. La línea diagonal en el genotipo se utilizó para separar en cada familia, el par de alelos que segrega con el CMT1A. Las bandas de menor tamaño y menos intensas que las bandas principales de los alelos, son invariablemente observadas en los polimorfismos de secuencias repetidas (72); sin embargo, no evitan el leer los genotipos sin ambigüedad. **A** y **B** son muestras de familias en donde todos los individuos afectados presentan tres alelos. **C** representa una familia en donde se puede observar a dos individuos afectados con únicamente dos alelos (88-339 y 88-380), debido a que los padres comparten alelos del mismo tamaño. **D** representa una familia de origen Judío Ashkenazic, donde también se observa la herencia de tres alelos en pacientes con CMT1A. A diferencia de las otras tres familias que son de origen Acadio-Francés (73).

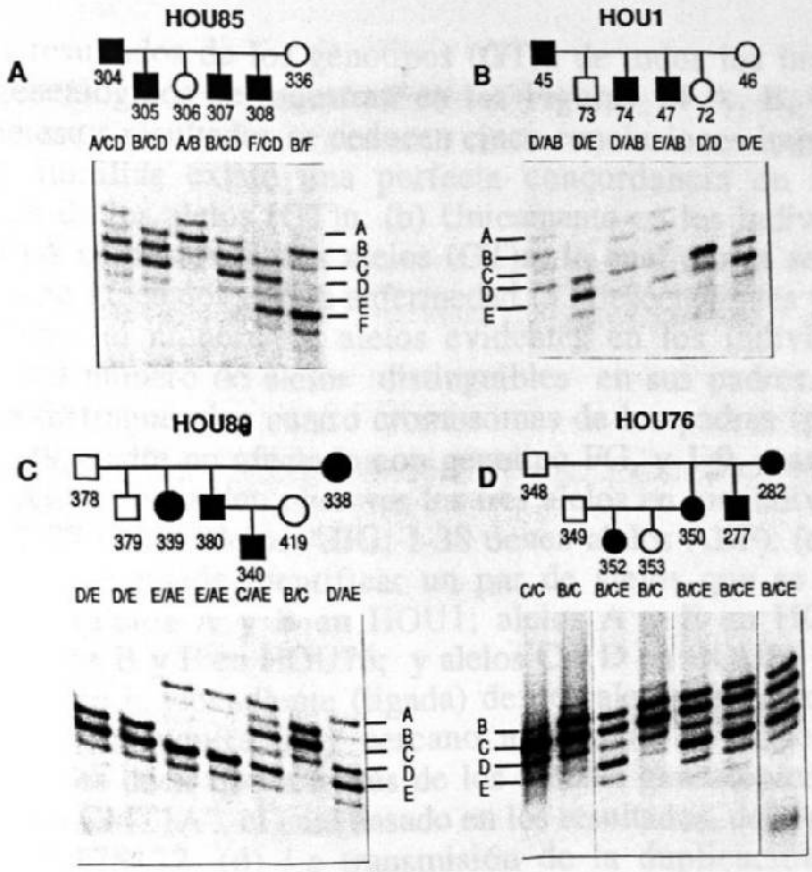


Figura 13. Detección de tres alelos (GT)n en pacientes con CMT1A utilizando el marcador pRM11-GT.

que heredaron de sus padres dos alelos del mismo tamaño (alelo E) los cuales migran en la misma posición y se observan como un solo alelo E (Figura 13 C). Estos resultados indican que pacientes con CMT1A tienen tres copias del locus D17S122 lo cual demuestra que existe una duplicación de este locus en pacientes con CMT1A.

Los resultados de los genotipos (GT)n de todos los individuos de los árboles genealógicos se muestran en las Figuras 14 A, B, C, D y E. Del análisis de estos resultados se deducen cinco conclusiones importantes. (a) En todas las familias existe una perfecta concordancia en la segregación Mendeliana de los alelos (GT)n. (b) Unicamente en los individuos afectados con CMT1A se observan tres alelos (GT)n, lo cual nunca se observó en 84 individuos no afectados con la enfermedad (53 descendientes y 31 conyuges). Sin embargo, el número de alelos evidentes en los individuos afectados dependió del número de alelos distinguibles en sus padres. Así entonces, cuando se distinguen los cuatro cromosomas de los padres (por ejemplo, los padres: 1-49, padre no afectado con genotipo FG, y 1-9, madre afectada con genotipo ABC) se pueden observar los tres alelos en los individuos afectados (1-153 y 1-37 tienen alelos ABG; 1-38 tienen alelos ABF). (c) En cada árbol genealógico, se puede identificar un par de alelos que se segrega con la enfermedad (alelos A y B en HOU1; alelos A y E en HOU2, HOU42 y HOU88; alelos B y E en HOU76; y alelos C y D en HOU85 y HOU89). Esta segregación no independiente (ligada) de dos alelos indica que el segmento duplicado se encuentra muy cercano a su sitio de origen en el mismo cromosoma, es decir que a través de los árboles genealógicos se segrega un "cromosoma CMT1A", el cual basado en los resultados, debe portar dos copias del locus D17S122. (d) La transmisión de la duplicación es sumamente específica. Si tomamos en cuenta todos las familias donde las meiosis son informativas, se observan 45 casos donde el padre afectado transmite la duplicación (dos alelos) a los descendientes afectados y 18 casos donde el padre afectado transmitió únicamente un alelo a sus descendientes no afectados con CMT1A. En estos apareamientos, ninguno de los descendientes no afectados recibió el segmento duplicado y ninguno de los descendientes afectados recibió un alelo único del padre afectado. Esto es, en 63 meiosis informativas, la duplicación se transmitió correctamente a la descendencia afectada y sin recombinación con el cromosoma normal. Y finalmente (e), esta mutación de duplicación ocurre en dos poblaciones con CMT1A de diferente origen étnico. Estos resultados demuestran completamente que existe una duplicación de DNA del locus D17S122 asociada con la enfermedad de CMT1A (73).

Figuras 14 A, B, C, D y E. Genotipos (GT)n del locus D17S122 de los árboles genealógicos segregando la enfermedad autosómica dominante CMT1A.

Los árboles genealógicos HOU1, HOU2 , HOU42, HOU85, HOU88, y HOU89, son de origen Acadio-Francés, mientras que el HOU76 es de origen Judío Ashkenazic. Se utilizan símbolos estandar; con los individuos afectados representados en negro. Los números corresponden a la identificación del laboratorio, y el genotipo (GT)n de cada individuo se indica debajo de su respectivo símbolo. Los genotipos (GT)n se obtuvieron por PCR como descrito en los métodos, y se les designó de acuerdo a su tamaño en pares de bases: A= 165, B=163, C=161, D=159, E=157, F=155 y G=153. Los individuos donde se observó únicamente una banda se registraron como portadores de dos copias de un mismo alelo. Los genotipos para cada individuo se leyeron de las autorradiografías sin conocer su estatus con respecto a la enfermedad, y se confirmaron independientemente por otros dos investigadores. Con excepción de los individuos: 1-45, 1-46, 1-47, 1-72, 1-73 y 1-74, a todos se les determinó la VCN. Note que hay una familia en donde ambos padres están afectados con CMT1A: 42-331, 42-332 y 42-333. En cada árbol genealógico se puede distinguir un par de alelos que se segrega con la enfermedad: A y E en HOU2, HOU42, y HOU88; A y B en HOU1; C y D en HOU85 y HOU89; y con alelos B y E en HOU76 (73).

HOU1

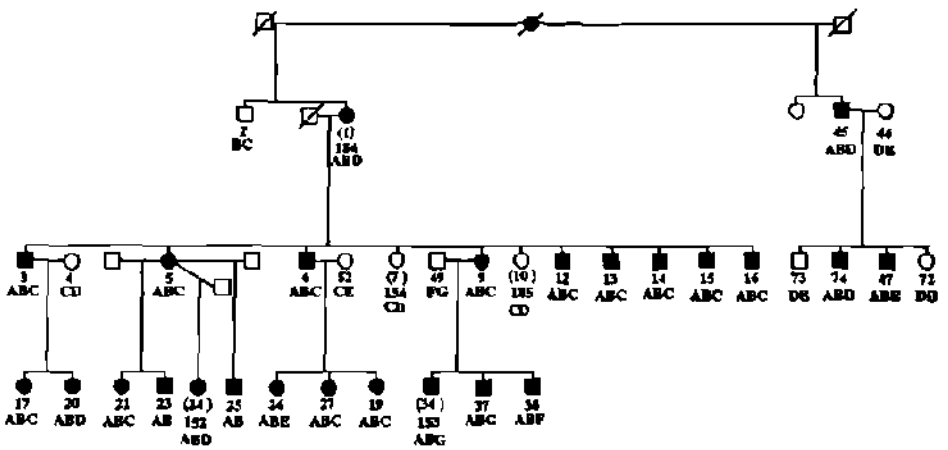


Figura 14 A . Genotipos (GT)n para el marcador pRM11-GT en el árbol genealógico HOU1, donde la enfermedad segrega con los alelos A y B (73).

HOU2

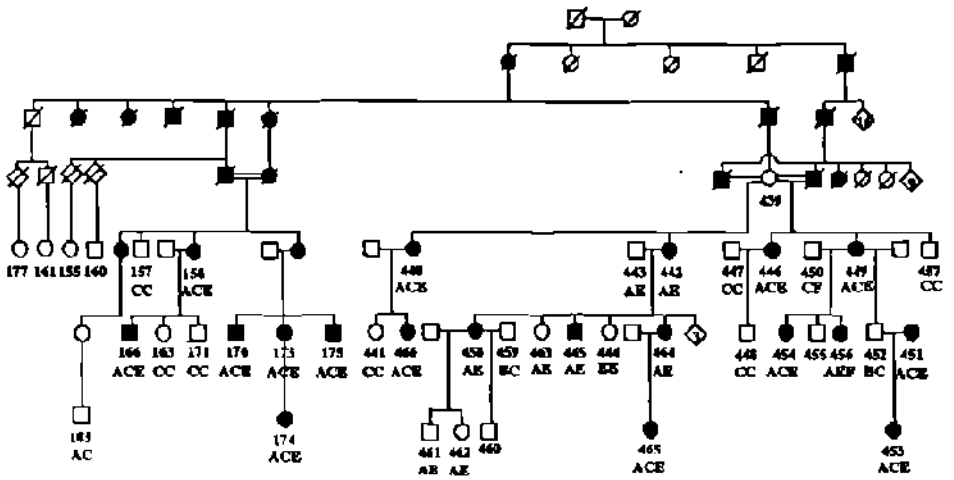


Figura 14 B. Genotipos (GT)n para el marcador pRM11-GT en el árbol genealógico HOU2, donde la enfermedad segrega con los alelos A y B (73).

HOU42

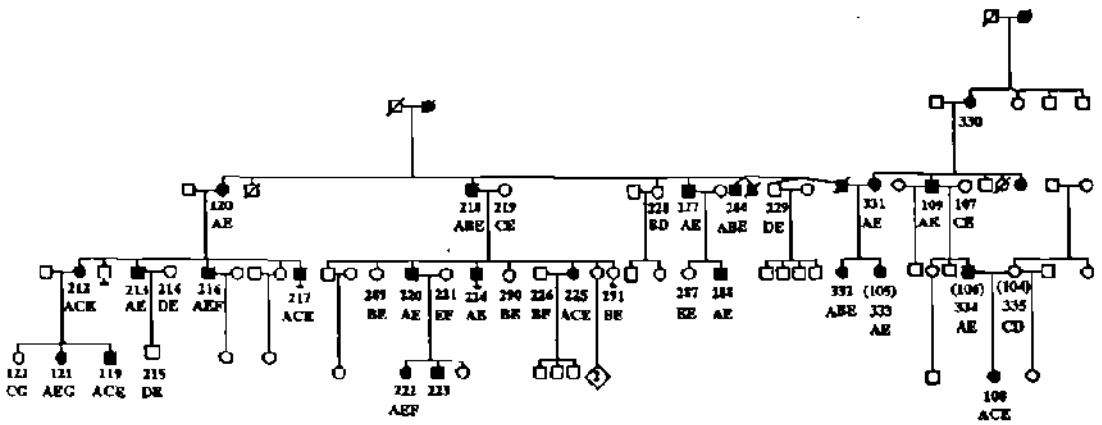


Figura 14 C. Genotipos (GT)n para el marcador pRM11-GT en el árbol genealógico HOU42, donde la enfermedad segrega con los alelos A y E. Note que hay una familia en donde ambos padres están afectados con CMT1A: 42-331, 42-332 y 42-333 (73).

HOU76

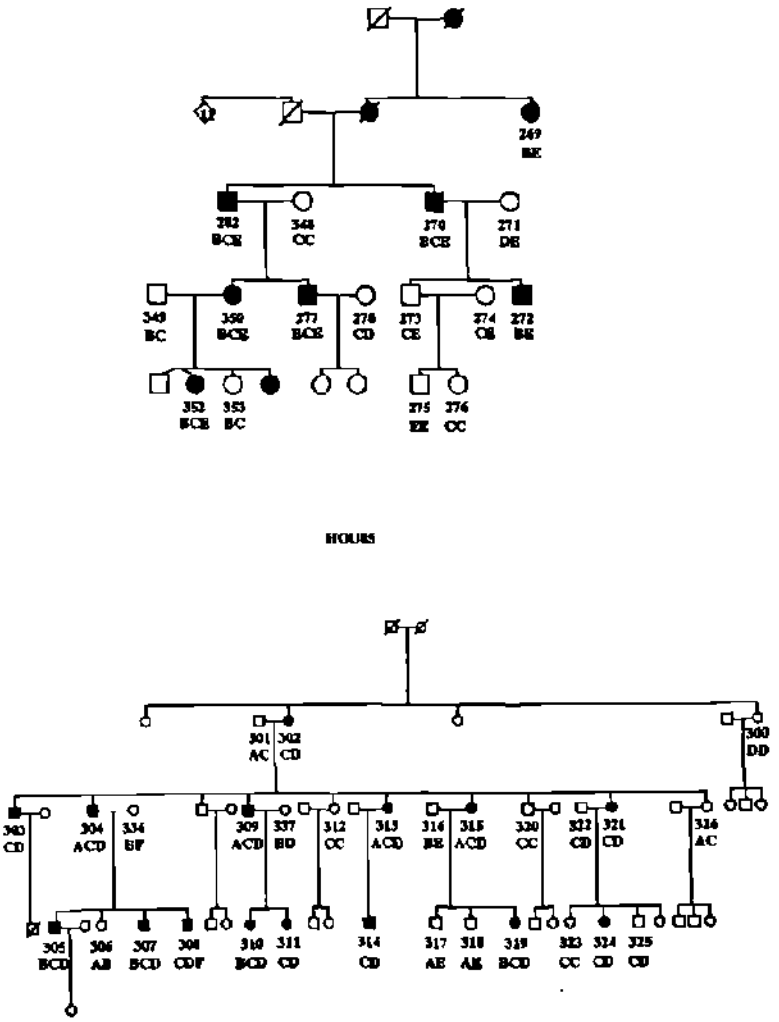
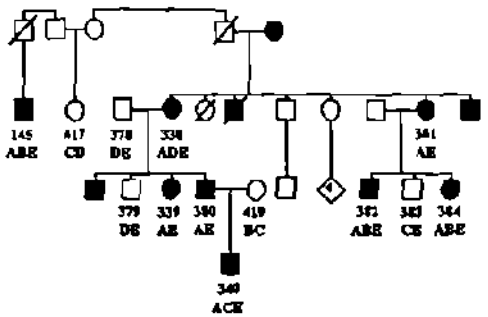


Figura 14 D. Genotipos (GT)n para el marcador pRM11-GT en los árboles genealógicos HOU76 y HOU85, donde la enfermedad segrega con los alelos B y E, y C y D, respectivamente (73).

HOU88



HOU89

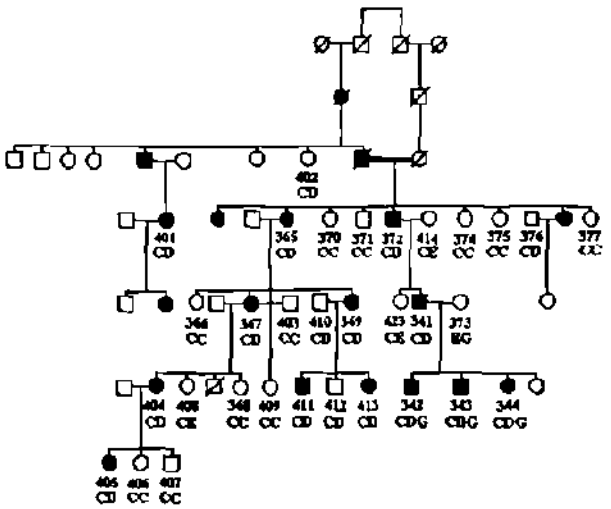


Figura 14 E. Genotipos (GT)n para el marcador pRM11-GT en los árbol genealógico HOU88 y HOU89, donde la enfermedad segrega con los alelos A y E, y C y D, respectivamente (73).

Además seguimos otra estrategia combinando los polimorfismos del marcador (GT)n pRM11-GT y RFLP, para demostrar la presencia de un alelo extra en las bandas alélicas con una señal doble de hibridación en individuos heterocigotos con CMT1A.

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

Con el propósito de determinar si la duplicación de DNA es un mecanismo general asociado con la enfermedad de CMT1A, y no específica para los árboles genealógicos analizados, se analizó con el marcador pRM11-GT pacientes con un fenotipo equivalente a CMT1 los cuales tenían diferentes orígenes familiares. Varios de estos pacientes mostraron tres alelos (GT)n, y en la mayoría de aquellos que mostraron dos alelos (GT)n se pudo observar una mayor intensidad en uno de sus dos alelos (resultados no mostrados). Estos resultados indican que la duplicación de DNA es una mutación común asociada con el CMT1.

VII. Los alelos RFLP *MspI* con una señal doble de hibridación en los pacientes con CMT1A tienen dos alelos (GT)n.

El propósito de este experimento fué demostrar, utilizando el marcador pRM11-GT, que las bandas alélicas *MspI* con una señal doble de hibridación efectivamente contienen dos alelos. Como se mencionó, el marcador pRM11-GT corresponde a un fragmento *HaeIII* de 250 pb que se aisló del marcador VAW40R1; esto significa que cada alelo *MspI* identificado por el marcador VAW409R1 debe de contener un alelo (GT)n correspondiente al marcador pRM11-GT. De acuerdo con ésto, en un individuo con CMT1A heterocigoto para el marcador VAW409R1, la banda de su alelo *MspI* que muestra una señal doble de hibridación debe de contener dos alelos (GT)n, y la banda de su alelo *MspI* con una señal sencilla debe de contener un alelo (GT)n.

Tal y como se describió en METODOS, se obtuvieron los fragmentos de DNA correspondientes a las bandas de los alelos *MspI* de diferentes individuos heterocigotos de una familia del árbol genealógico HOU42, detectadas con el marcador VAW409R1, y se sometieron a una reacción de PCR para determinar el número de alelos (GT)n utilizando el marcador RM11-GT.

En la Figura 15A se muestra la familia utilizada en este experimento, así

como sus correspondientes alelos *MspI* detectados por Southern con el marcador VAW409R1. Como se puede apreciar los individuos afectados (42-218 y 42-225) tienen el alelo A con una señal doble de hibridación (dos copias) con relación al alelo A de los individuos no afectados (42-289 y 42-219), mientras que el alelo B en los cuatro familiares se observan con una señal de hibridación similar (una copia). Al DNA de cada uno de estos alelos *MspI*, se le determinó por PCR el número de alelos (GT)n utilizando el marcador pRM11-GT.

En la figura 15B se muestra el resultado de la determinación del número de alelos (GT)n para cada uno de los alelos *MspI*, así como del DNA genómico total de cada uno de los individuos. Como se observa en la figura, en los carriles 218, 289, 225 y 219 se observan los alelos (GT)n obtenidos al utilizar el DNA genómico de estos individuos a los cuales les corresponde respectivamente los genotpios ABE, BE, ACE y CE (estos genotipos son exactamente igules a los resultados obtenidos previamente y mostrados en la Figura 17C). En el segundo y octavo carril se observa que los alelos A de los pacientes afectados (42-218 y 42-225) que tenían una señal doble de hibridación, tienen dos alelos (GT)n (218-A y 225-A); en tanto que el resto de los alelos A y B, con una señal sencilla de hibridación, tienen únicamente un alelo (GT)n. Si se comparan los alelos (GT)n que se obtuvieron de las diferentes bandas alélicas (carriles A y B) con las presentes en sus respectivos DNA genómicos, se puede observar una perfecta concordancia entre ellos.

Estos resultados demuestran que efectivamente las bandas de los alelos *MspI* con doble señal de hibridación, característico de los individuos heterocigotos afectados con CMT1A, contienen dos alelos (73); y además indican que este tipo característico de RFLP es un procedimiento confiable para determinar cuales otros marcadores genéticos están duplicados en los pacientes con CMT1A.

VIII. El tamaño de la duplicación es al menos de 100 kb.

Tomando en cuenta el característico RFLP que se observa en los individuos afectados con CMT1A, heterocigotos para un marcador de la región duplicada, se analizaron las autorradiografías de los RFLP correspondientes a diversos marcadores genéticos de la región 17p11.2-12 (resultados ya preexistentes en el laboratorio), y se encontró que los individuos con CMT1A, heterocigotos para los marcadores VAW412 y VAW401, tenían una banda alélica con una señal doble de hibridación (73)

Figura 15. Demostración de que en alelos polimórficos *MspI* del Locus D17S122 con doble señal de hibridación, hay dos alelos (GT)n.

A, análisis tipo Southern utilizando el DNA genómico de una familia del árbol HOU42, digerido con la enzima *MspI* e hibridado contra un fragmento de restricción *MspI* de 5.3 Kb del marcador VAW409R1 (locus D17S122). El genotipo de cada individuo se obtuvo tomando en cuenta la dosis de cada alelo. Note que los indiviuos afectados 42-218 y 42-225 tienen dos copias del alelo A y una del alelo B. El examen de la herencia de los alelos de este árbol genealógico, indicó que la enfermedad se segrega con los alelos A y B. En este polimorfismo el alelo A es cortado en dos bandas (alelo B) las cuales son reconocidas por la sonda radiactiva

B, alelos (GT)n presentes en cada uno de las bandas alélicas de cada individuo del panel A. El DNA correspondiente a cada una de las bandas alélicas polimórficas *MspI* se purificó de un gel de agarosa similar al utilizado en el panel A y se le determinó por PCR el número de alelos (GT)n. En los carriles 218, 289, 225 y 219 se observan los alelos (GT)n que se obtuvieron utilizando directamente su DNA genómico, y en los carriles marcados con A y B, se observan los alelos (GT)n correspondientes a cada una de sus dos bandas alélicas polimórficas *MspI*. Note que el alelo A de los individuos 42-218 y 42-225, el cual está presente con una señal doble de hibridación, tiene dos alelos (GT)n, mientras que el resto de los alelos presentes en una sola copia presentan un solo alelo (GT)n (73).

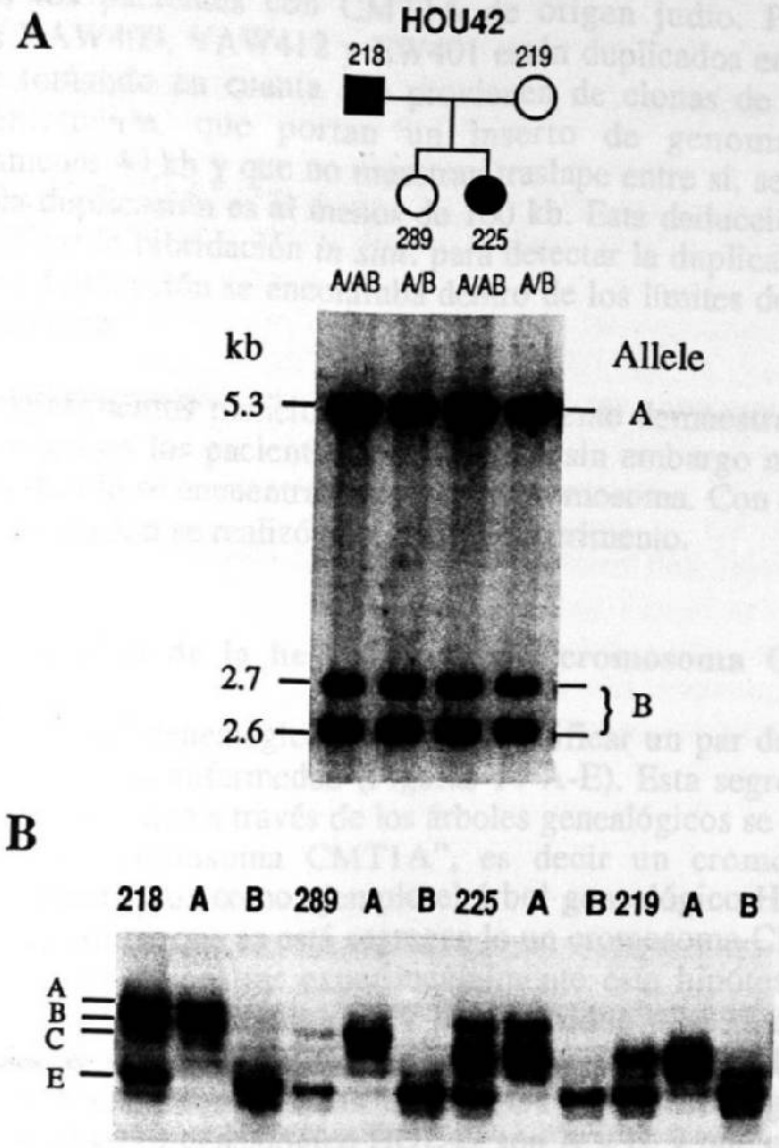


Figura 15. Demostración de dos alelos (GT)n en alelos polimórficos *MspI* del locus D17S122 (73).

(datos no mostrados). Es decir que estos marcadores también forman parte integral del segmento duplicado en los individuos con CMT1A. Cabe señalar que la duplicación detectada por RFLP con estos marcadores se observó también en los pacientes con CMT1A de origen judío. Puesto que los marcadores VAW409, VAW412 y EW401 están duplicados en pacientes con CMT1A, y tomando en cuenta que provienen de clonas de fagos aisladas independientemente, que portan un inserto de genoma humano de aproximadamente 40 kb y que no muestran traslape entre si, se deduce que el tamaño de la duplicación es al menos de 100 kb. Esta deducción dió pauta al hecho de utilizar la hibridación *in situ*. para detectar la duplicación, ya que el tamaño de la duplicación se encontraba dentro de los límites de resolución de este procedimiento.

Los experimentos mencionados anteriormente demuestran la presencia de un alelo extra en los pacientes con CMT1A, sin embargo no indican si el segmento duplicado se encuentra en el mismo cromosoma. Con el propósito de dilucidar esta cuestión se realizó el siguiente experimento.

IX. Demostración de la herencia de un "cromosoma CMT1A".

En cada árbol genealógico se puede identificar un par de alelos (GT)n que se segrega con la enfermedad (Figuras 14 A-E). Esta segregación ligada de dos alelos sugiere que a través de los árboles genealógicos se segrega con la enfermedad un "cromosoma CMT1A", es decir un cromosoma con la duplicación. Si tomamos como ejemplo el árbol genealógico HOU42 (Figura 14C) podemos deducir que se está segregando un cromosoma CMT1A con los alelos A y E. Para demostrar experimentalmente esta hipótesis, decidimos separar los cromosomas homólogos 17 del individuo 42-332 en híbridos de células somáticas y determinar en cada uno de ellos los alelos (GT)n que contienen. Si postulamos que los alelos (GT)n que se segregan con la enfermedad en el árbol genealógico HOU42 son A y E, y que el genotipo del individuo 42-332 es ABE, esperamos que un cromosoma 17 porte el alelo B y que su homólogo, en este caso el "cromosoma CMT1A" porte los alelos A y E. El resultado de este experimento se observa en la Figura 16.

Tal y como se describió en METODOS, se obtuvieron los híbridos celulares, y se utilizó el marcador OS1-βGT para identificar dos híbridos celulares que contuvieran por separado cada uno de los dos cromosomas homólogos 17. El resultado se muestra en los tres primeros carriles del panel B de la Figura 20. En el primer carril (332) se observan los alelos (GT)n que

se obtuvieron al utilizar el DNA genómico de este individuo como templado, y como se aprecia el individuo es heterocigoto para este marcador ya que tiene dos alelos (GT)n, designados arbitrariamente A y B. En otras palabras, el individuo 332 posee un cromosoma 17 con el alelo A y su otro cromosoma 17 porta el alelo B. En los siguientes dos carriles (**a** y **b**), se encuentran los productos de amplificación que corresponden a dos híbridos celulares que se derivaron de este indiviudo. Como se puede observar el híbrido celular del carril **a** retuvo el cromosoma 17 con el alelo A y el híbrido celular del carril **b** retuvo el cromosoma 17 con el alelo B. Esto demuestra que efectivamente se logró separar los cromosomas homólogos 17 del individuo 332.

Una vez que se demostró la separación de los cromosomas homólogos 17 del individuo 332 en híbridos celulares se procedió a determinar cuales alelos (GT)n, para el marcador pRM11-GT, contenían cada uno de ellos. En la figura 16A se muestra el resultado de este análisis. En el carril 332 correspondiente al DNA genómico se observa que este individuo afectado posee tres alelos (GT)n: A, B y E (tal y como se había determinado anteriormente en la Figura 14C). En los siguientes dos carriles (**a** y **b**) se encuentra el resultado de los dos híbridos celulares. Como se puede observar uno de ellos (carril **a**) porta el alelo B, mientras que el otro híbrido (carril **b**) porta los alelos A y E. Esto indica que el individuo afectado con CMT1A heredó un cromosoma 17 con la duplicación portando los alelos A y E. Este resultado está acorde con la segregación ligada de los alelos A y E con la enfermedad en el árbol genealógico HOU42, y confirma nuestra hipótesis de la segregación de la enfermedad con un cromosoma portando una duplicación ("cromosoma CMT1A") en los diferentes árboles genealógicos (73).

Este mismo experimento se realizó para el árbol genealógico HOU1 utilizando el individuo afectado 1-14, en donde se pudo demostrar que uno de sus dos cromosomas homólogos 17 separados en híbridos celulares portaba los alelos (GT)n A y B para el marcador pRM11-GT. Lo cual es congruente con la segregación de un "cromosoma CMT1A" con los alelos A y B en los individuos afectados de este árbol genealógico (datos no mostrados).

Los resultados hasta aquí obtenidos, aun y cuando concluyen que existe una perfecta correlación entre una duplicación de DNA y la enfermedad de CMT1A, no demuestran si la duplicación es responsable de la aparición del fenotipo. Con el propósito de obtener una evidencia que indicara una relación entre el genotipo y el fenotipo, se determinó si un individuo con un fenotipo de CMT1A muy severo era homocigoto para la duplicación de DNA, es decir si portaba dos "cromosomas CMT1A".

Figura 16. Demostración de un individuo homocigoto para el CMT1A, por análisis de (GT)n de sus dos cromosomas homólogos separados en híbridos de células somáticas.

A los individuos 42-332 y 42-333, hijos de un matrimonio entre dos personas afectadas con CMT, y a su madre afectada (42-331), se les separaron sus cromosomas 17 homólogos en híbridos de células somáticas, tal y como se describió en METODOS. Lisados de los híbridos seleccionados se sometieron a otra reacción de PCR para determinar el número de alelos (GT)n del locus D17S122. En el panel **A** se muestran los resultados de este análisis, en donde los carriles 332, 333 y 331 corresponden a los alelos (GT)n presentes en estos individuos, y en los carriles con las letras **a** y **b** se encuentran los productos de amplificación correspondientes a los cromosomas 17 homólogos separados en los híbridos de células somáticas. En el panel **B** se muestran los productos de amplificación del marcador OS1-βGT de los individuos 42-332 y 42-333, y sus correspondientes híbridos, en donde se muestra el éxito en la separación de los cromosomas 17 homólogos. La enfermedad segrega con los alelos (GT)n A y E en las familias de ambos padres del individuo 42-333, quien como se observa en el panel **A**, es homocigoto para los cromosomas que contienen la duplicación. Los símbolos en la familia reflejan el genotipo con respecto a los alelos de la enfermedad.

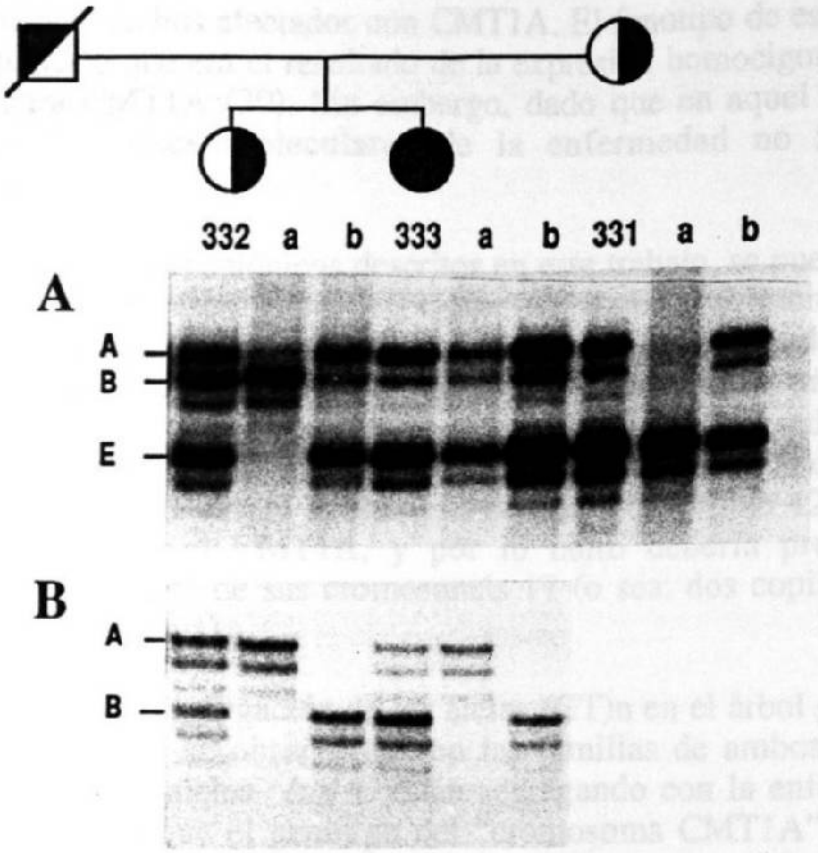


Figura 16. Demostración de un individuo homocigoto para el CMT1A, por análisis de (GT)n de sus dos cromosomas homólogos separados en híbridos de células somáticas.

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

En la literatura se encuentra descrito el caso de un individuo con un fenotipo clínico severo de CMT1A, descendiente de un matrimonio entre primos hermanos, ambos afectados con CMT1A. El fenotipo de este individuo se había propuesto que era el resultado de la expresión homocigota de un gen dominante para CMT1A (30). Sin embargo, dado que en aquel entonces se desconocían las bases moleculares de la enfermedad no fué posible demostrarlo.

En los árboles genealógicos descritos en este trabajo, se puede observar que en una familia del árbol HOU42 (Figura 3A) hay un matrimonio entre dos individuos afectados con dos descendientes afectados. Uno de sus dos hijos (42-333) tiene un fenotipo clínico severo de CMT1A, incluyendo una aparición temprana de los síntomas (< 1 año) y una VCN marcadamente reducida (< 10 m/s, vs. 20-40 m/s en individuos afectados y >60 m/s en individuos no afectados). Nuevamente surgió la hipótesis de que el individuo 42-333 podría ser homocigoto para el CMT1A, y por lo tanto debería presentar una duplicación en cada uno de sus cromosomás 17 (o sea, dos copias del locus D17S122 por cromosoma).

Si se analiza la segregación de los alelos (GT)n en el árbol genealógico HOU42 (Figura 17C), se observa que en las familias de ambos padres del individuo 42-333, los alelos A y E están segregando con la enfermedad de CMT1A (esto indica que el genotipo del "cromosoma CMT1A", en ambos padres debe ser AE). Esto está congruente con el genotipo AE de la madre (42-331), aunque desafortunadamente como el padre ya había fallecido, no se pudo determinar su genotipo. Sin embargo, tomando en cuenta que el genotipo de su hija (42-332) es ABE, y que la madre no posee ningun alelo B, se deduce que el genotipo del padre debería ser ABE. Por lo tanto, puesto que el genotipo del individuo en cuestión (42-333) es AE, se deduce que ha heredado dos "cromosomas CMT1A", siendo homocigoto para la duplicación. Cabe recalcar que su hermana (42-332), por tener el genotipo ABE, ha heredado únicamente un cromosoma con la duplicación y por ello tiene un fenotipo menos severo.

Para confirmar la observación de que el individuo 42-333 posee dos cromosomas CMT1A, cada uno con dos alelos (GT)n, A y E, se siguió la misma estrategia del experimento anterior de separar sus cromosomas

homologos 17 en híbridos de células somáticas, y determinar a cada uno de ellos los alelos (GT)n que contienen. Además se incluyeron en este experimento tanto células de su madre (42-331) como de su hermana (42-332), que también están afectadas.

Una vez obtenidos los híbridos celulares se utilizó el marcador OS1-βGT para identificar dos híbridos celulares de cada persona que llevasen por separado cada uno de los dos cromosomas homologos 17 (Figura 16B). El DNA de estos híbridos celulares, se analizó por PCR con el marcador polimórfico pRM11-GT, para determinar el número de alelos (GT)n por cromosoma. En la Figura 16A se muestra el resultado de este análisis. Como se observa, el individuo 42-332 tiene un cromosoma con el alelo B y otro cromosoma con los alelos A y E, lo cual es congruente con su genotipo ABE (primer carril); el individuo 42-331 tiene un cromosoma con el alelo E y otro cromosoma con los alelos A y E, de aquí que su genotipo se observe únicamente como AE (séptimo carril); y el individuo 42-333 tiene dos cromosomas, cada uno con los dos alelos del mismo tamaño, A y E, por lo que su genotipo se observa simplemente como AE (cuarto carril). En resumen, los individuos 42-331 y 42-332 son heterocigotos para el cromosoma portando la duplicación, mientras que el individuo 42-333 es homocigoto para la duplicación, con cada uno de sus dos cromosomas homólogos conteniendo dos copias del locus D17S122 (73). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la duplicación es la responsable del fenotipo clínico de la enfermedad de CMT1A, y que el CMT1A es una mutación semidominante ya que la homocigosidad para la duplicación resulta en un fenotipo clínico más severo.

XI. *Identificación de un nuevo marcador genético* para la duplicación de DNA en pacientes con CMT1A.

Los marcadores genéticos tipo RFLP que detectaron la duplicación (VAW409R3, VAW409R1, VAW412 y EW401) corresponden a marcadores genéticos que ya habían sido descritos en la literatura. Con la finalidad de determinar el area duplicada en los pacientes con CMT1A se inició el aislamiento de YAC (cromosomas artificiales de levadura), los cuales pueden portar insertos de DNA hasta de 1000 kb. Utilizando los oligonucleótidos del marcador pRM11-GT se aisló un YAC, y de uno de los extremos del inserto se amplificó por PCR un fragmento de 500 bp. A su vez, utilizando este fragmento como sonda se aisló un cósmido el cual fué designado como cO8H4. Puesto que los fragmentos genómicos de DNA humano se clonaron en el sitio *EcoRI* del cósmido, éste se digirió con la enzima *EcoRI* para separar el

inserto. La digestión produjo al menos 8 fragmentos de 8.5, 7.5, 6.5, 4.8, 2.5, 2, 1.8 y 1.3 kb, y varios fragmentos de menor tamaño. Los cinco fragmentos de mayor tamaño se purificaron independientemente de un gel de agarosa, y se utilizaron para buscar RFLP de las enzimas *BglII*, *TaqI* y *MspI*, mediante hibridaciones tipo Southern, en los individuos de los árboles genealógicos segregando la enfermedad de CMT1A. El fragmento *EcoRI* de 7.5kb denominado cO8H4-R2 detectó un RFLP para la enzima *TaqI* compuesto por dos diferentes alelos *TaqI* de 2.2 y 2.1 kb designados como alelos A y B, respectivamente. En la Figura 17 se presenta un resultado representativo de este experimento y como se observa, los tres individuos afectados con CMT1A, heterocigotos para este marcador, muestran el característico RFLP de los individuos con CMT1A: un alelo en doble dosis con respecto al otro. De estos resultados se deduce que uno de los extremos del YAC contiene DNA que se localiza en la región duplicada. De acuerdo con esto se podría utilizar el fragmento de 500 pb anteriormente mencionado para aislar un nuevo YAC y aplicar la misma estrategia para determinar hasta donde se extiende la región duplicada.

XII. Diagnóstico molecular del CMT1A con el marcador pRM11-GT.

Tanto el hecho de que existe una perfecta correlación entre la enfermedad de CMT1A y la presencia de tres alelos, así como la observación de que el individuo homocigoto estaba severamente afectado, indican que en los individuos con CMT1A la duplicación del locus D17S122 es la característica más definida y asociada con la enfermedad. Por lo tanto, la detección de la duplicación se puede considerar como un medio de diagnóstico de la enfermedad de CMT1A. Con este propósito, se evaluó el potencial del marcador pRM11-GT, como una herramienta para el diagnóstico del CMT1A. Para este estudio, a treinta y tres individuos con fenotipo clínicamente de CMT1 se les determinó el número de alelos (GT)n utilizando el marcador pRM11-GT. Cabe señalar que estos individuos no forman parte de los árboles genealógicos descritos anteriormente, ni son familiares entre sí. Los resultados se muestran en la Figura 18, y como se observa, 11 de los 33 pacientes tienen tres alelos (GT)n. Esto significa que la probabilidad de detectar la duplicación con el marcador pRM11-GT es de un 33%. Cabe señalar que aproximadamente la mitad de estos individuos, incluyendo sus padres (no mostrados en la Figura 18), se habían analizado previamente para llevar a cabo el experimento de la sección VI.

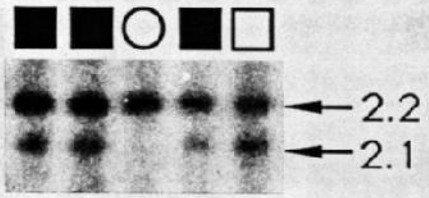


Figura 17. Identificación de un nuevo marcador para la región duplicada de los pacientes con CMT1A.

Análisis tipo Southern del DNA genómico de una familia representativa del árbol genealógico HOU85. El DNA se digirió con *TaqI* y se hibridó con la sonda cO8H4-R2. Note la diferencia característica que existe entre los dos alelos de individuos con CMT1A (símbolos negros) versus individuos no afectados.

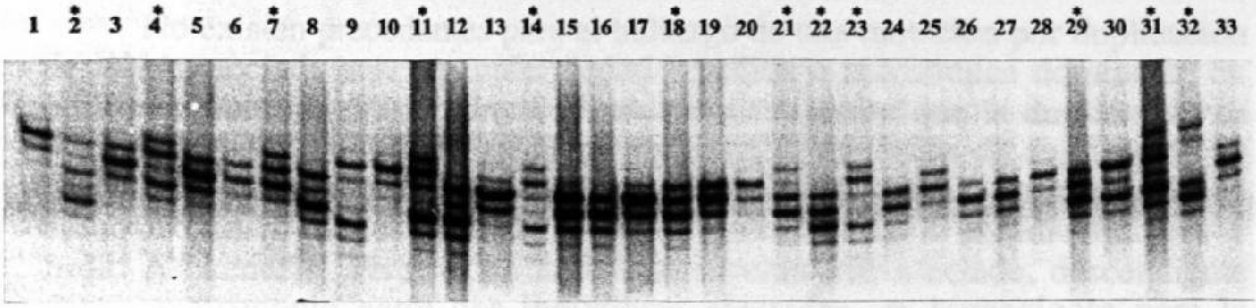


Figura 18. Diagnóstico molecular del CMT1A utilizando el marcador pRM11-GT.

En este estudio se analizaron treinta y tres individuos que no tenían nexos familiares entre sí y que se diagnosticaron clínicamente como afectados con CMT1. A cada uno de ellos se le determinó por PCR el número de alelos (GT)n utilizando los oligonucleótidos para el marcador pRM11-GT. Con asteriscos se indican aquellos individuos que mostraron tres alelos (GT)n, y que por lo tanto son diagnosticados genéticamente como CMT1A.

DISCUSION

En el presente trabajo se demostró que la enfermedad de CMT1A se asocia con una duplicación de DNA. Esta duplicación se detectó con un total de tres marcadores polimórficos del locus D17S122 (VAW409R3, VAW409R1, y RM11-GT). Con cada uno de ellos se observó una perfecta correlación entre el genotipo de la duplicación y el fenotipo de la enfermedad CMT1A. Análisis por RFLP usando los marcadores VAW412R3 (D17S125) y VAW401 (D17S61) (86), indican que estos también están duplicados en pacientes con CMT1A.

No existen precedentes para el hallazgo de una mutación por duplicación de DNA asociada con una enfermedad hereditaria autosómica dominante en múltiples familias. Varias líneas de evidencia sugieren que la duplicación es responsable del fenotipo de CMT1A. Primero, la mutación de duplicación se observó únicamente en pacientes con CMT1A. Segundo, la duplicación se demostró en pacientes con CMT1A de diferente origen, Acadio-Francés y Judío Ashkenazic. Tercero, un individuo severamente afectado, descendiente de un matrimonio entre dos individuos afectados, es homocigoto para la duplicación (73).

Se desconoce el mecanismo por el cual la duplicación da como resultado el fenotipo de CMT1A. Algunos mecanismos posibles son: primero, una sobreexpresión de algun(os) gen(es) en la región duplicada; segundo, si la duplicación se origina en la parte interna de un gen puede inhibir la expresión del mismo o expresar un producto génico alterado con un efecto dominante deletereo; tercero, la duplicación puede cambiar la posición física de un gen y ocasionar que se altere la regulación de su expresión.

Un posible gen candidato del CMT1A era el gen para la subunidad β del receptor muscular de la acetilcolina, localizado en la región 17p11.2-p12 (87). Este gen juega un papel muy importante en la transducción de la señal a nivel de la unión neuromuscular (88). Nos propusimos determinar si este gen se encontraba en la región duplicada. Puesto que la demostración más concluyente de la presencia de una duplicación fué mediante el uso de un marcador genético (GT)n (pRM11-GT), se decidió obtener un marcador similar para este gen. Para lo cual utilizando como sonda radiactiva el DNA complementario al RNA mensajero de este gen se aisló un cósmido y de éste se clonó una repetición (GT)n. De acuerdo con la secuencia nucleotídica se determinó que esta secuencia repetida estaba incluida en el primer intrón del

gen. Afortunadamente este marcador (OS1-βGT) resultó más polimórfico que el pRM11-GT (se detectaron hasta 14 diferentes alelos en únicamente 17 individuos), sin embargo al analizar los individuos de los árboles genealógicos no se detectó la presencia de tres alelos característico de un marcador en la región duplicada asociada con el CMT1A. Claro que este experimento no descarta la posibilidad de que la duplicación se origine en otra parte del gen. Por otro lado, una evidencia que excluye este gen como un posible candidato, es que de acuerdo con nuestros resultados acerca de la posición de este gen, demostramos que no se localiza en la región 17p11.2-p12 como se había descrito (87); su ubicación real es en la banda 17p13 (58), la cual está considerablemente muy alejada de la región involucrada en la duplicación. La importancia de este experimento, además de eliminar este gen como un posible candidato, es que se identificó dentro de el un marcador genético (GT)n sumamente polimórfico, el cual se puede utilizar en estudios moleculares o estudios de ligamiento genético de este gen con respecto a otras enfermedades donde se sospeche que sea el gen responsable (58).

Se desconoce también el mecanismo de origen de la mutación que conduce a la duplicación. Se han descrito mutaciones *de novo,* como deleciones y duplicaciones, en la región proximal del brazo corto del cromosoma 17 (89-91). Es posible que los mismos mecanismos de recombinación que originan una deleción de un cromosoma pueden ocasionar una duplicación en su cromosoma homólogo. Estudios recientes acerca de duplicaciones en *Escherichia coli* y humanos, han demostrado que las duplicaciones ocurren en regiones que contienen secuencias repetidas, por ejemplo las secuencias REP en bacterias (92) y las secuencias Alu en el humano (93,94). Otro ejemplo de duplicación cromosómica ocurre en el locus *Bar* de *Drosophila melanogaster* (95). Esta mutación es semidominante y frecuentemente se asocia con una duplicación en tandem de las bandas cromosómicas 16A1-A7 (96). Análisis moleculares recientes sugieren que existe un elemento transposón (B104) en la unión de la duplicación, por lo que se propuso que este transposón está involucrado en la producción de la duplicación. Basados en el análisis de la secuencia de DNA del elemento B104 que se encuentra en las uniones de la duplicación, se propuso como modelo que la duplicación se genera por un evento de recombinación entre dos elementos B104, localizados uno en la banda 16 A1 y el otro en 16 A7 (97). Un análisis detallado de la región duplicada en pacientes con CMT1A de diferente origen étnico, especialmente a nivel de las uniones, podría dilucidar el mecanismo responsable de la generación de esta duplicación (73).

Existen dos posibles modelos animales para el CMT los cuales

corresponden a los ratones mutantes designados como "trembler" (tr, el cual es dominante) (98) y trembler-J (tr^J, el cual es semidominante) (99). Estos ratones presentan una neuropatía desmielinizante con un decremento en la VCN similar al observado en el CMT1; además, su mutación se localiza en el cromosoma 11 el cual es el homólogo del cromosoma 17 en el humano. Las bases moleculares del CMT1A se podrán delucidar más claramente al definir y caracterizar los límites de la región duplicada mediante el aislamiento de clonas genómicas humanas que se sobrepongan, así como al identificar genes que se localizen en esta región duplicada.

Otra cuestión interesante es si la duplicación ocurrió dentro del mismo cromosoma, o si el segmento duplicado proviene de su cromosoma homólogo por un evento de recombinación. El hecho de que en todos los árboles genealógicos analizados los dos alelos (GT)n en el "cromosoma CMT1A" (es decir los dos alelos ligados que se segregan con la enfermedad) sean diferentes, apoyan la hipótesis de que el segmento duplicado se haya originado del cromosoma homólogo.

Otro punto importante de discutir es el hecho de haber detectado la duplicación en pacientes con CMT1A de dos orígenes diferentes: Acadio-Francés y Judío-Ashkenazic, además de varios individuos con CMT1A de diferente ascendencia, sin nexos familiares entre sí. Esto sugiere que el evento de la mutación de duplicación sea un mecanismo inherente a esta enfermedad, es decir independiente del origen de los individuos.

I. Implicaciones en el diagnóstico molecular del CMT1A.

Una implicación sumamente importante de este trabajo es el uso del marcador RM11-GT para el diagnóstico molecular del CMT1A, y de cualquier otro marcador que se localize en la región duplicada. Como se demostró en este trabajo existe una perfecta correlación entre la presencia de una duplicación de DNA y la enfermedad de CMT1A. Por esta razón se evaluó el potencial del marcador pRM11-GT, como una herramienta para el diagnóstico del CMT1A. Desafortunadamente cuando los padres tienen alelos (GT)n similares no es posible observar tres alelos en los pacientes con CMT1A, de aquí que únicamente se pudieron diagnosticar el 33% de los 33 pacientes analizados con el marcador pRM11-GT. Puesto que un sólo marcador no detecta la duplicación de cualquier individuo afectado, se puede combinar el uso de ellos para incrementar el potencial de diagnóstico. Teniendo en cuenta que la presencia de un alelo extra se detecta también por

RFLP en los individuos heterocigotos, se puede utilizar el polimorfismo *MspI* de los marcadores VAW409R1 y VAW409R3 para detectar la duplicación. Resultados preeliminares indican que usando en combinación los tres marcadores anteriormente mencionados se incrementó al doble el porcentaje de individuos diagnosticados (67%). Sin tomar en cuenta los marcadores VAW401 y VAW412R3, que también detectan la duplicación. Un procedimiento alternativo muy efectivo es el uso de la Hibridación Fluorescente *in situ* , ya que para esto no se requieren polimorfismos (73). El uso de marcadores genéticos muy polimórficos, como el utilizado en este estudio, incrementa la posibilidad de detectar trisomías submicroscópicas parciales que pudiesen ser la alteración molecular para otras enfermedades genéticas humanas (73).

II. Consecuencias de la duplicación en los estudios de ligamiento genético para la localizacion del gen del CMT1A.

Diferentes grupos de investigación, tanto en Estados Unidos como en Europa, estaban aún enfocados hasta mediados del año 1991, a la localización del locus del CMT básicamente por estudios de ligamiento genético. El objetivo de estos estudios es el de encontrar un marcador genético que se cosegrege con la enfermedad, es decir que esté ligado a ella. En un estudio de ligamiento genético, las recombinaciones que ocurran entre la enfermedad y el marcador, son los datos más importantes que van a determinar la distancia que existe entre ellos. Así por ejemplo, un marcador con 1% de recombinación (un evento de recombinación por cada 100 meiosis informativas) equivale a un Centimorgan y esto indica que el marcador se encuentra a una distancia de un millón de bases nucleotídicas con respecto al locus de la enfermedad.

El número de recombinantes entre el marcador VAW409 y el locus del CMT1A se sabía que era más frecuente en comparación con otros marcadores localizados fuera de la región duplicada. **¿Cómo es posible que un marcador genético localizado en el locus de la enfermedad, tal y como es el caso para el marcador VAW409, muestre un mayor número de recombinantes y por ende un menor grado de ligación con la enfermedad, con respecto a otros marcadores fuera del locus de la enfermedad?**. Este resultado obviamente es incorrecto, puesto que el marcador VAW409 forma parte del locus del CMT1A. Sin embargo, el hecho de existir una duplicación, implica la presencia de un alelo extra para este marcador y da como consecuencia la observación de falsos recombinantes (73).

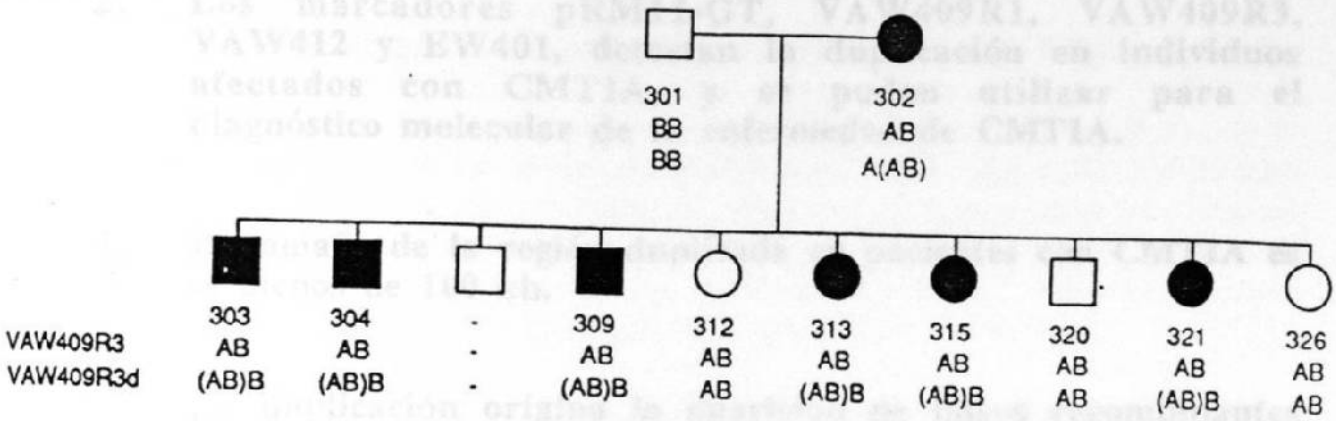


Figura 19. Observación de falsos recombinantes debido a la duplicación.

En esta figura se muestra una familia del árbol genealógico HOU85 mostrando la clasificación incorrecta de los alelos *MspI* del marcador VAW409R3. Debajo del símbolo de cada individuo, se encuentra en orden descendiente primero el número de identificación del individuo, segundo el genotipo para el marcador VAW409R3 sin tomar en cuenta la dosis de los alelos, y tercero el genotipo considerando la diferente dosis alélica. La segregación de los alelos del marcador demuestra que sin considerar la dosis alélica, el cromosoma CMT1A del individuo 85-302 porta el alelo A, en tanto que si se considera la dosis, el cromosoma CMT1A porta los alelos A y B. Los individuos 85-312, 85-20 y 85-326 aparecen como recombinantes para el marcador VAW409R3; sin embargo, considerando la dosis alélica, se demuestra que los recombinantes son debidos a una interpretación incorrecta (73).

CONCLUSIONES

1. **La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 1A está asociada con una duplicación de DNA, e involucra al menos los loci D17S122, D17S125 y D17S61.**

2. **Los marcadores pRM11-GT, VAW409R1, VAW409R3, VAW412 y EW401, detectan la duplicación en individuos afectados con CMT1A, y se puden utilizar para el diagnóstico molecular de la enfermedad de CMT1A.**

3. **El tamaño de la región duplicada en pacientes con CMT1A es al menos de 100 kb.**

4. **La duplicación origina la aparición de falsos recombinantes en estudios de ligamiento genético utilizando RFLP.**

PERSPECTIVAS

I. Desde el punto de vista científico.

Esta es la primera vez que se encuentra una duplicación, como un mecanismo molecular generalizado responsable de una enfermedad autosómica dominante. Este hecho se debe tomar en cuenta como un posible mecanismo para otras enfermedades genéticas humanas.

Diversos grupos de investigación en Estados Unidos y Europa, habían dirigido sus esfuerzos para identificar el gen responsable de producir la enfermedad de CMT1A mediante estudios de ligamiento genético. Este tipo de estudios son bastante laboriosos e implican métodos muy sofisticados para "caminar en los cromosomas" hasta encontrar el gen responsable. El hecho de haber encontrado una duplicación asociada con el CMT1A, define el locus de esta enfermedad y hace que ahora los esfuerzos se concentren específicamente en esta región para identificar el gen(es) responsable del CMT1A.

Estudios de ligamiento genético se utilizan actualmente para la identificación del gen responsable de diferentes enfermedades genéticas humanas. En este trabajo se demostró que por una duplicación de DNA se originan falsos recombinantes en los análisis por RFLP, y como consecuencia, un resultado erróneo en el grado de ligamiento de un marcador genético con el locus de una enfermedad.

II. Desde el punto de vista de desarrollo tecnológico.

En el presente trabajo se sentaron las bases para el establecimiento de una nueva prueba para el diagnóstico molecular de la enfermedad de CMT1A.

¿Qué tan importante sería esta prueba de diagnóstico molecular de la enfermedad de CMT1A? Actualmente los métodos de diagnóstico del CMT incluyen métodos electrofisiológicos para medir la conducción nerviosa, histometría para cuantificar las fibras nerviosas en biopsias de nervio y microscopía electrónica para examinar la ultraestructura de los nervios involucrados. Estos métodos son dolorosos, tienen cierto riesgo para el paciente y son caros (el costo estimado de este tipo de diagnóstico, en los Estados Unidos, es alrededor de $5000.00 dólares).

Por el contrario una prueba de diagnóstico molecular, como la descrita

en el presente trabajo, origina la posibilidad de que se obtenga el diagnóstico utilizando simplemente el DNA genómico aislado de sangre periférica. Este método de diagnóstico molecular tendría las ventajas de que es más económico, sin ningún riesgo para el paciente y el diagnóstico se puede realizar desde el primer día de nacimiento. Otra ventaja sumamente importante es la posibilidad de realizar un diagnóstico prenatal, lo cual no era posible con los métodos actuales.

III. Desde el punto de vista de beneficios sociales y de salud.

Como se mencionó en la Introducción, la edad promedio de aparición de los síntomas del CMT1A es a los 12 años de vida. El establecimiento de un método más económico, dará posibilidad a que un mayor número de personas se efectue una prueba de diagnóstico. El hecho de diagnosticar la enfermedad antes de la aparición de los síntomas, brinda la oportunidad a realizar una apropiada intervención farmacológica y quirúrgica para disminuir los trastornos de la enfermedad. Además una detección temprana de la enfermedad ofrece la posibilidad al individuo afectado de orientar su vida de acuerdo con los impedimentos que va a manifestar.

BIBLIOGRAFIA

1. McKusick, V.A. (1992). Mendelian Inheritance in Man. 10th Edition. Johns Hopkins University Press.

2. Orkin, S.H., and Kazazian, H.H. (1984). Mutation and polymorphism o f the human ß-globin gene and its surrounding DNA. Ann. Rev. Genet. 18:131-171.

3. Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 232: 34-47.

4. Rommens, J.H., Iannuzzi, M.C., Kerem, B.S., Drumm, M.L., Melmer, G., et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. Science 245:1059-1065.

5. Riordan, J., Rommens, J.M., Kerem, B.S., Alon, N., Rozmahel, R., et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. Science 245:1066-1073.

6. Kerem, B.S., Zielenski, J., Markiewicz, D., Bozon, D., Gazit, E., et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 245:1073-1080.

7. Gusella, J.F., Wexler, N.S., Conneally, P.M., Naylor, S.L., Anderson, M.A., et al. (1983). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. Nature 306:234-238.

8. Reeders, S.T., Breuning, M.H., Davies, K.E., Nicholls, R.D., Jarman, A.P., et al. (1985). A highly polymorphic DNA marker linked to adult polycystic kidney disease on chromosome 16. Nature 317:542-544.

9. Francke, U., Ochs, H.D., de Martinville, B., Giacalone, J., Lindgren, V., et al. (1985). Minor Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of Duchenne Muscular Dystrophy, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa, and McLeod syndrome. Am. J. Hum. Genet. 37: 250-267.

10. Worton, R.G., Duff, C., Sylvester, J.E., Schmickel, R.D., and Willard, H.F. (1984). Duchenne muscular dystrophy involving translocation of the *dmd* gene next to ribosomal RNA genes. Science 224: 1447-1449.