

3ª edición Curso de Genética Humana de la SEG
Valencia, 24-26 de Enero de 2008

POLIMORFISMOS, MAPAS Y GENES EN LA ENFERMEDAD GENÉTICA

Carmen Espinós Armero

Unidad de Genética y Medicina Molecular (UGMM)

Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV)



UGMM

ciberer

Centro de Investigación Biomédica en Red
de Enfermedades Raras



¿Qué es una enfermedad mendeliana?



Carácter hereditario: cualidad susceptible de ser transmitida de generación en generación

Enfermedad mendeliana o monogénica: herencia exclusivamente relacionada con un locus

Leyes de Mendel

1ª Ley de segregación

2ª Ley de distribución independiente

3ª Ley de transmisión independiente de los genes

OMIM Online Mendelian Inheritance in Men
[http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim))

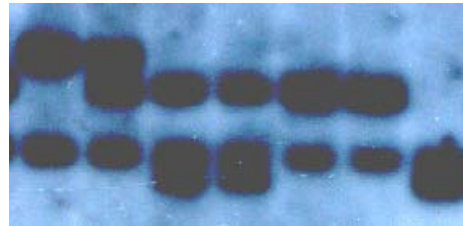
Marcaadores genéticos

RFLPs 1978-80

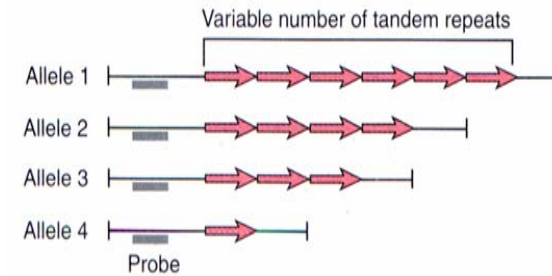


26P/*Bst*XI, FRDA - **Análisis restricción y Southern blot**

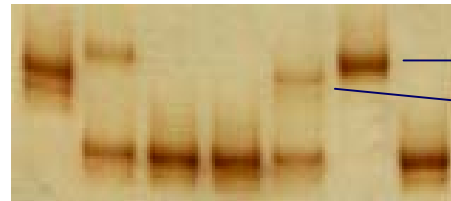
VNTRs, 1987



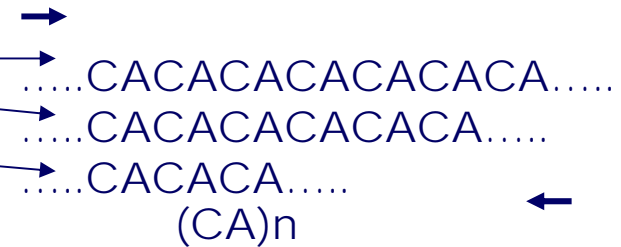
p68RS2.0/*Rsa*I, Rb - **Análisis restricción y Southern blot**



Microsatélites
o STRs, 1989

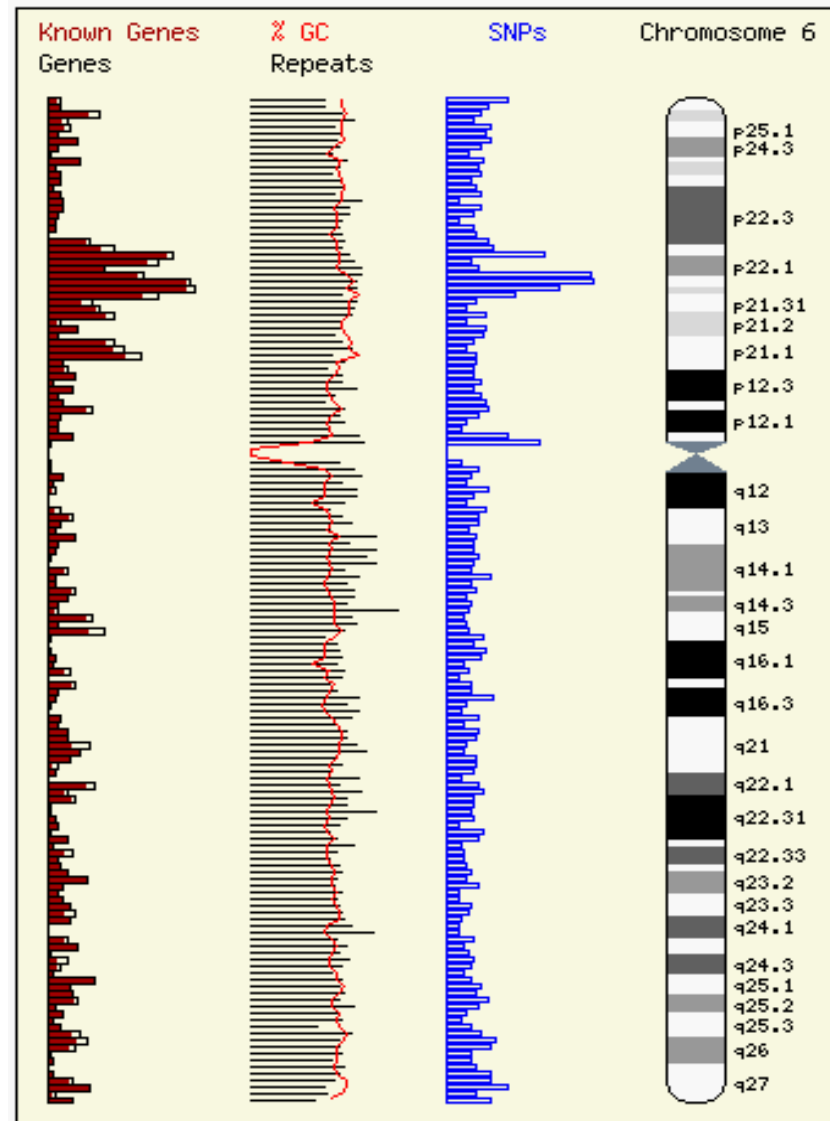


5'-DYS-I, DMD - **PCR y PAGE**



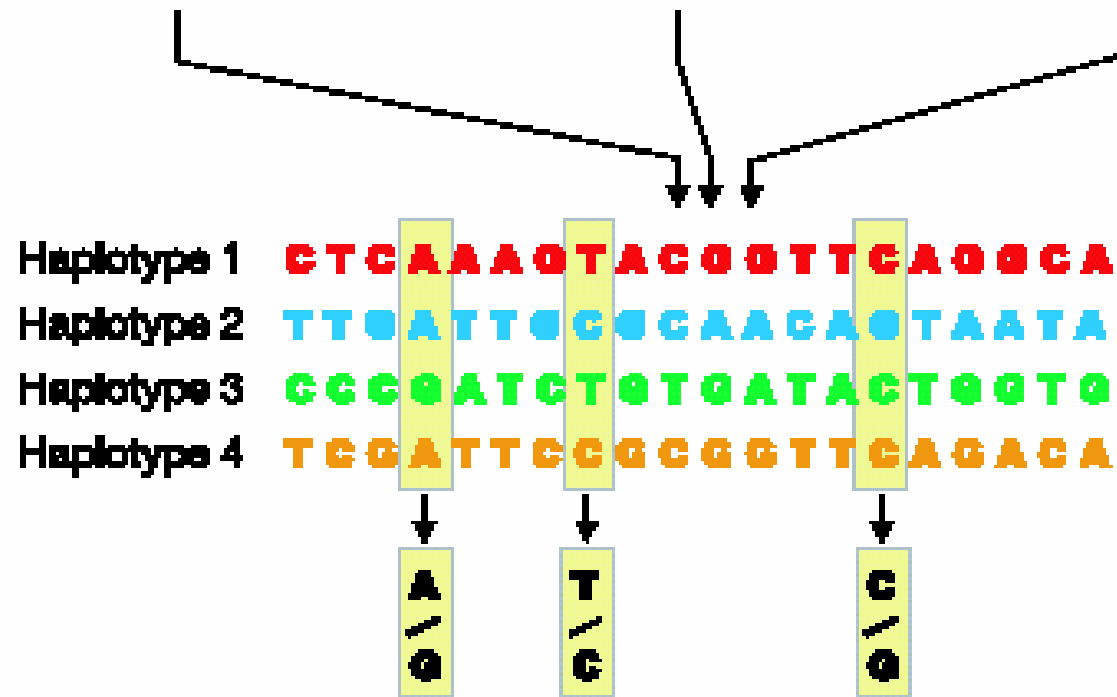
SNPs

- v 1SNP/200-300 bases
- v Tasa de mutación 10^{-8} - 10^{-9}
- v <http://www.hapmap.org>
<http://pupasuite.bioinfo.cipf.es>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- v 11.811.594 SNPs

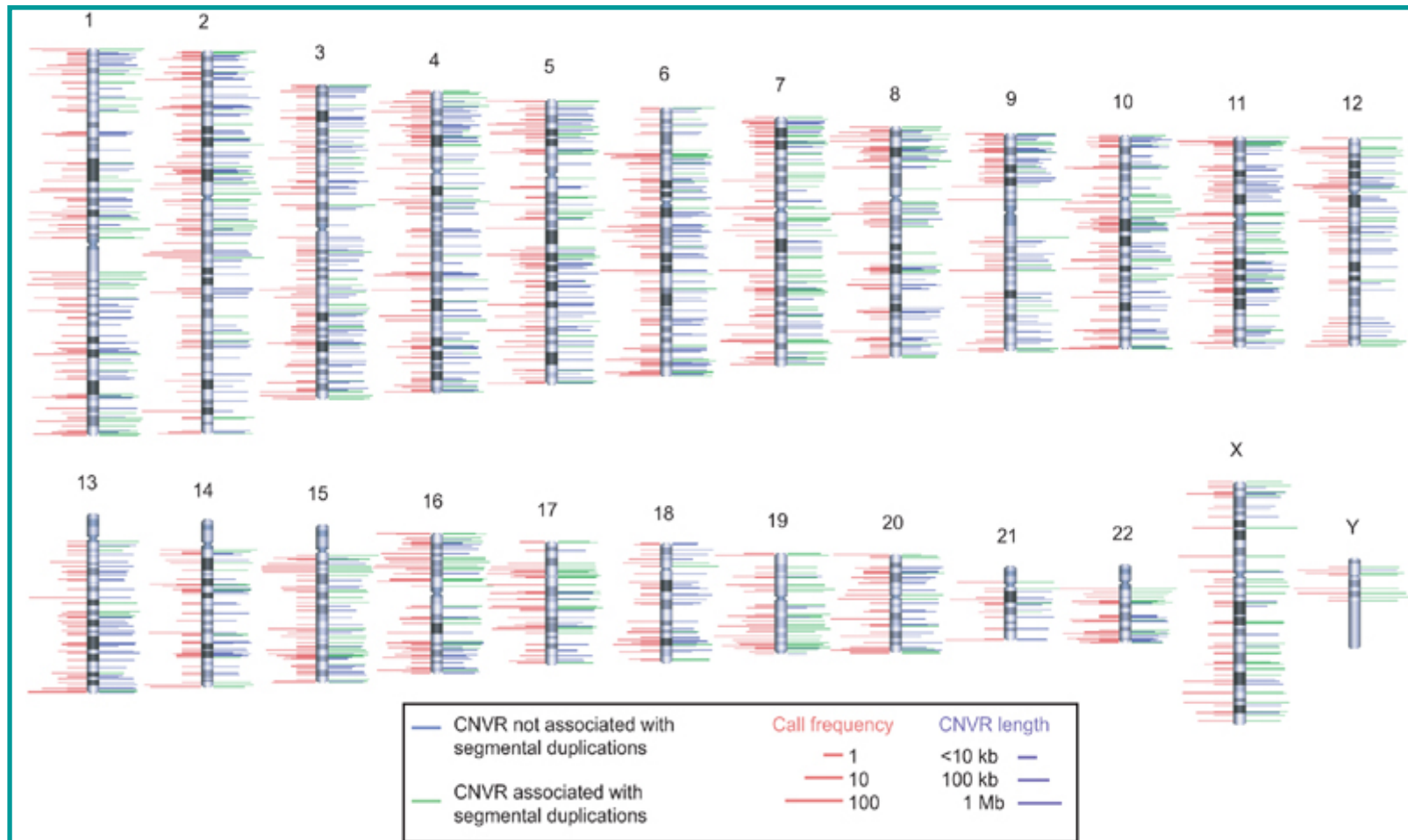


Tag-SNPs

AAGACGGCA.... TTCGGGTC.... AGTCGACCG..
AACAAGCA.... TTCGAGTC.... AGTCAGCG..
AAGATGGCA.... TTCGGGTC.... AGTCAGCG..
AACAAGCA.... TTCGAGTC.... AGTCAGCG..



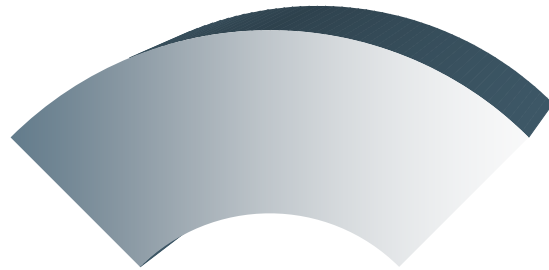
CNVR: copy number variable regions



Redon et al. Nature 2006

Clonación posicional

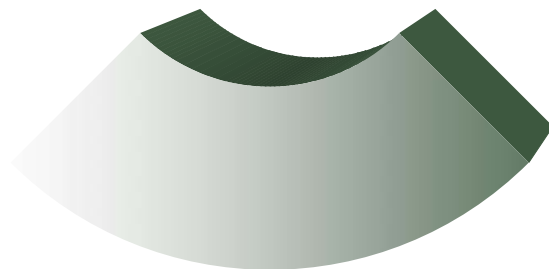
Cartografiado
Genotipado



Captura de la
variabilidad
genética

Enfermedad
Pacientes
Familias

Polimorfismos, mapas,
ligamiento



Localización cromosómica

Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth

- ✓ Es una neuropatía hereditaria sensitivo motora
- ✓ Prevalencia 1/2500
- ✓ Heterogeneidad clínica y genética (30 loci/genes)

Síntomas

- ✓ Debilidad muscular progresiva comenzando en pies y piernas, pudiendo extenderse a manos y brazos.
 - ✓ Caída del pie (incapacidad para sostenerlo horizontalmente), marcha de tipo equina.
 - ✓ Deformación del pie (pies cavos)
 - ✓ Deformación progresiva de la pierna (botella invertida)
 - ✓ Pérdida masa muscular de la extremidad inferior, delgadez de tobillos.
 - ✓ Disminución de la sensibilidad o entumecimiento en el pie o pierna.
-



Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth

CRITERIOS ELECTROFISIOLÓGICOS

- CMT desmielinizante o CMT1: VCN < 38 m/s; sugiere lesión en la célula de Schwann.

 - CMT axonal o CMT2: VCN normal o ligeramente reducida; lesión neuronal con atrofia y degeneración.
-

Formas Autosômicas Recessivas de CMT

	S. Dejerine-Sottas	<i>PO, PMP22, EGR2, PRX</i>	Desmielinizante	145900
	CMT4A	<i>GDAP1</i>		606598 607831 607706
	CMT4B	<i>MTMR2</i>		60355
	CMT4B2	<i>SBF2</i>		604563
	CMT4C	<i>SH3TC2</i>		608208
	CMT4D HSMN-Lom	<i>NDRG 1</i>		601455
	HSMN-Russe	10q23		605285
	CMT4E	<i>EGR2</i>		605253
	CMT4F	<i>Periaxin</i>		605725
	AR-CMT2A	<i>Lamin A/C</i>		Axonal
	AR-CMT2B	19q13	605589	
	CMT4A	<i>GDAP1</i>	606598 607831 607706	

The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease

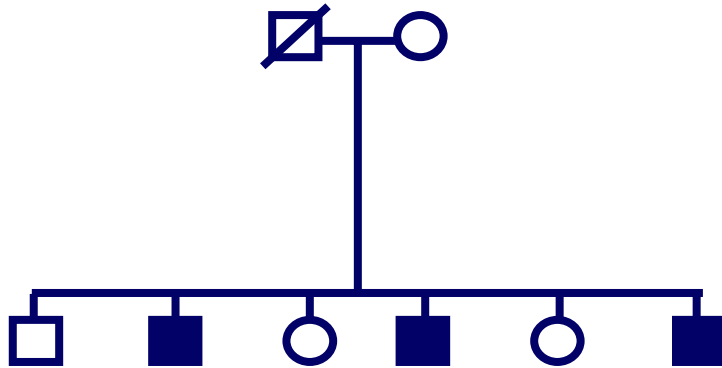
Published online: 17 December 2001, DOI: 10.1038/ng798

Ana Cuesta¹, Laia Pedrola¹, Teresa Sevilla², Javier Garcia-Planells¹, María José Chumillas³, Fernando Mayordomo⁴, Eric LeGuern^{5,6}, Ignacio Marín^{7,8}, Juan J. Vilchez² & Francesc Palau^{1,7}

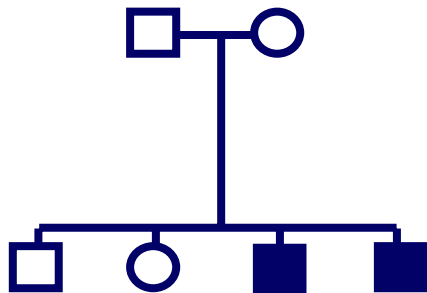
¹Laboratory of Genetics and Molecular Medicine, Instituto de Biomedicina, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 46010 Valencia, Spain. Departments of ²Neurology, ³Clinical Neurophysiology and ⁴Pathology, Hospital Universitari La Fe, Valencia, Spain. ⁵INSERM U289 and ⁶Departement de Génétique, Cytogénétique et Foetopathologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France. ⁷Department of Genetics and ⁸Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva, Universitat de València, Burjassot, Valencia, Spain. Correspondence should be addressed to F.P. (e-mail: fpalau@ibv.csic.es).

nature genetics • volume 30 • january 2002

Pacientes



- v Inicio precoz en la infancia
- v Neuropatía axonal
- v Disfonía por parálisis de cuerdas vocales
- v Herencia autosómica recesiva



- v CMT1A (*PMP22*)
 - v CMT1B (*MPZ*)
 - v CMTX (*GJB1*)
- } GENES CMT

- v CMT4A (8q13-21.1)
 - v CMT4B (11q23)
 - v CMT4C (5q23-q33)
 - v CMT2A (1p35-36)
 - v CMT2B (3q13-22)
- } LOCI CMT

I



2 3
2 2
2 1
3 3
3 3
3 3

1 2
1 2
1 1
2 1
1 2
1 2

Família LF20

II



2 1
2 1
1 1
3 2
3 1
3 1

3 2
2 2
1 1
3 1
3 2
3 2

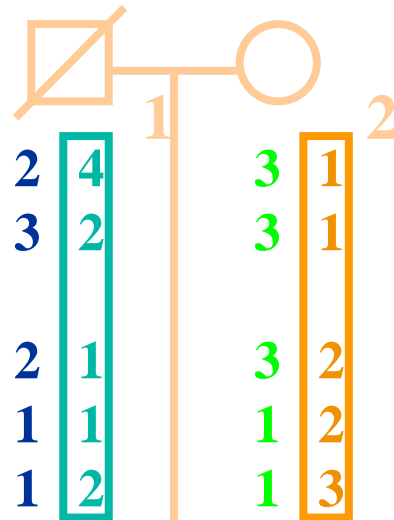
3 2
2 2
1 1
3 1
3 2
3 2

D8S279
D8S286
D8S164
D8S84
D8S275
D8S167

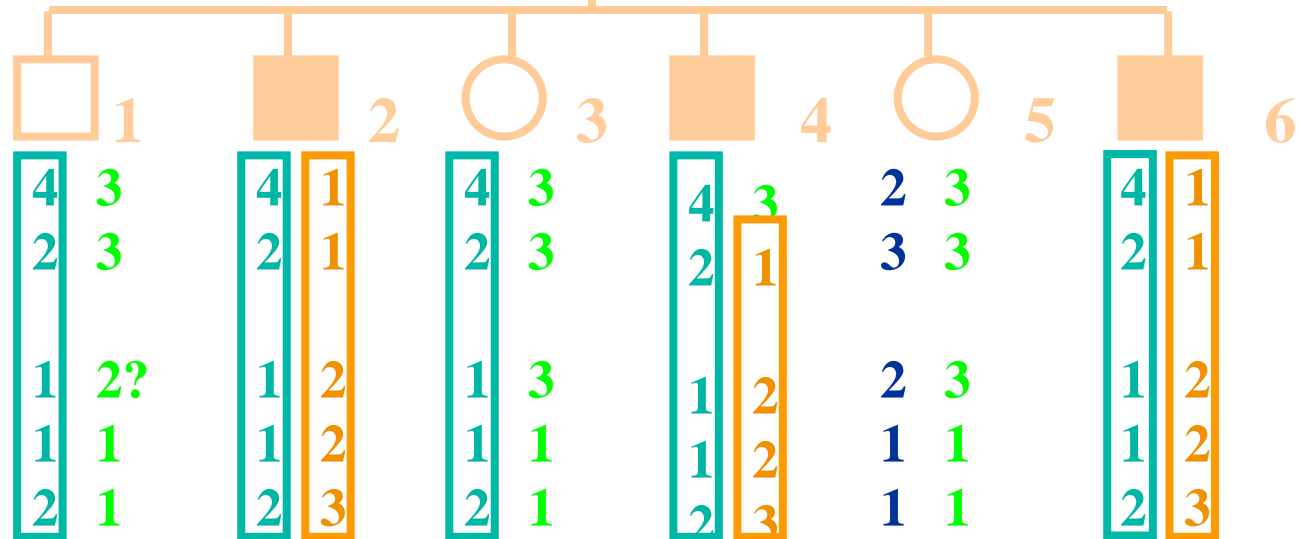
Familia LF20

3	2
2	2
1	1
3	1
3	2
3	2

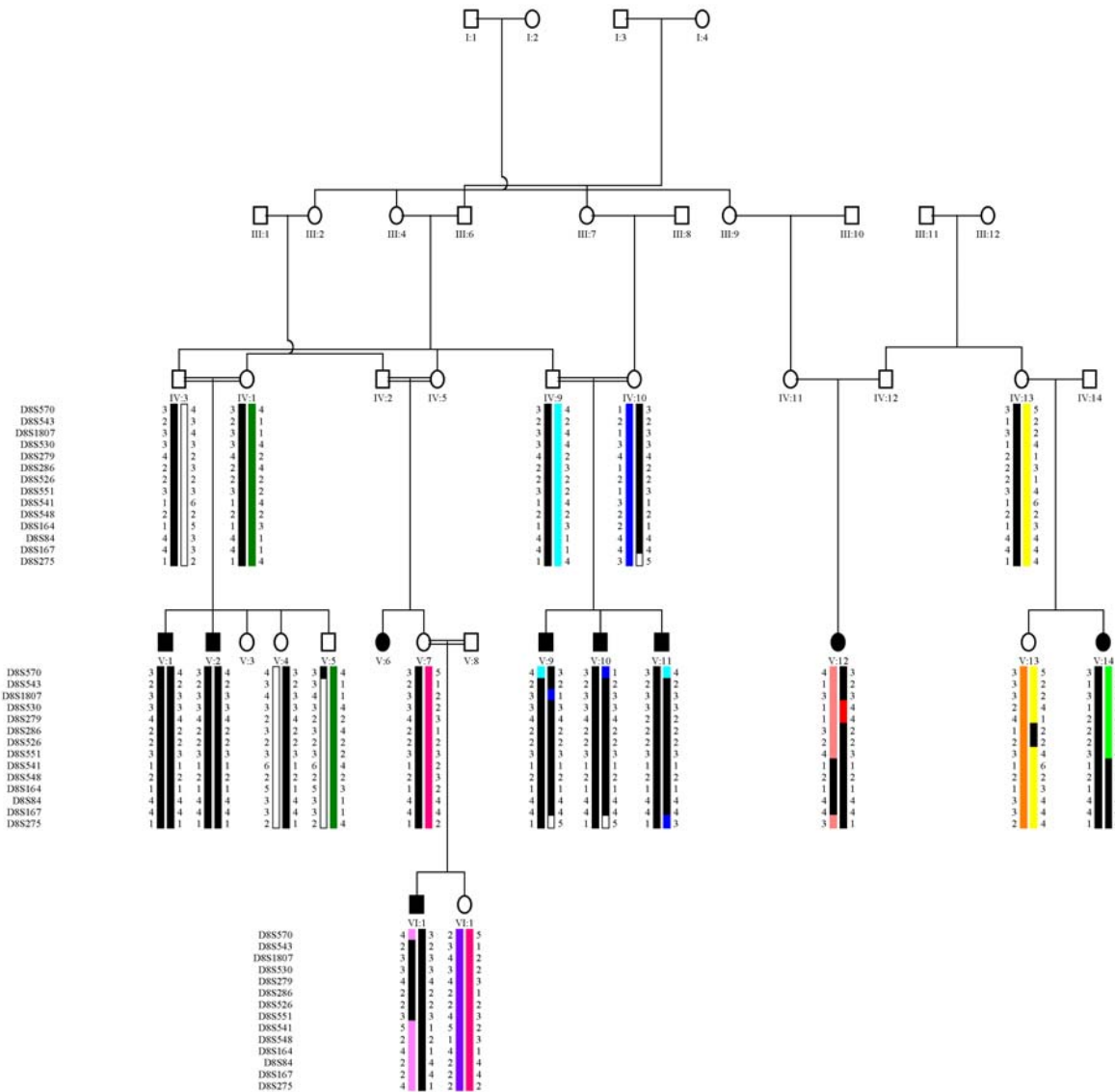
Familia LF249



D8S279
 D8S286
 D8S164
 D8S84
 D8S275
 D8S167



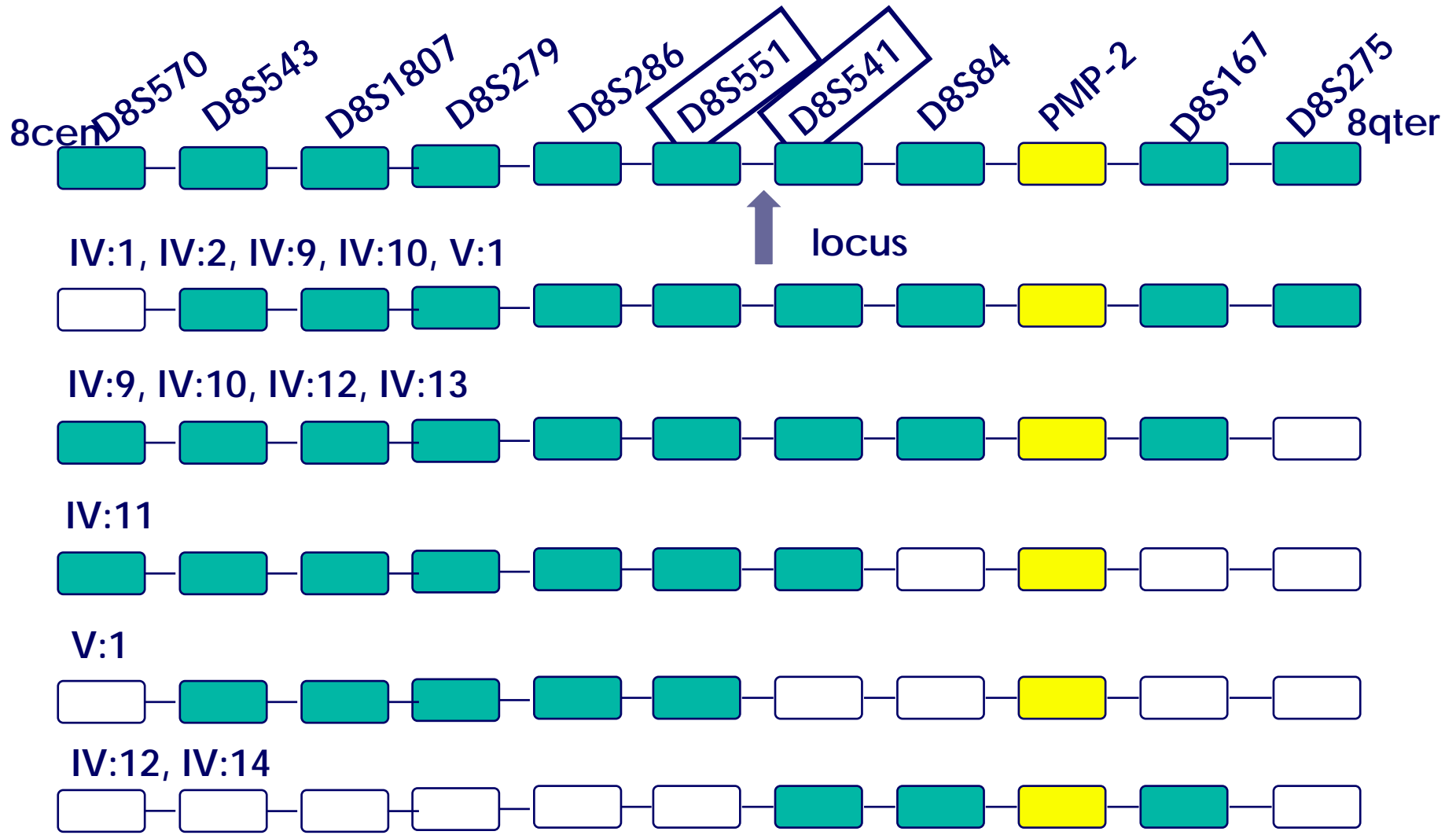
Familia LF38, cartografiado por homocigosidad



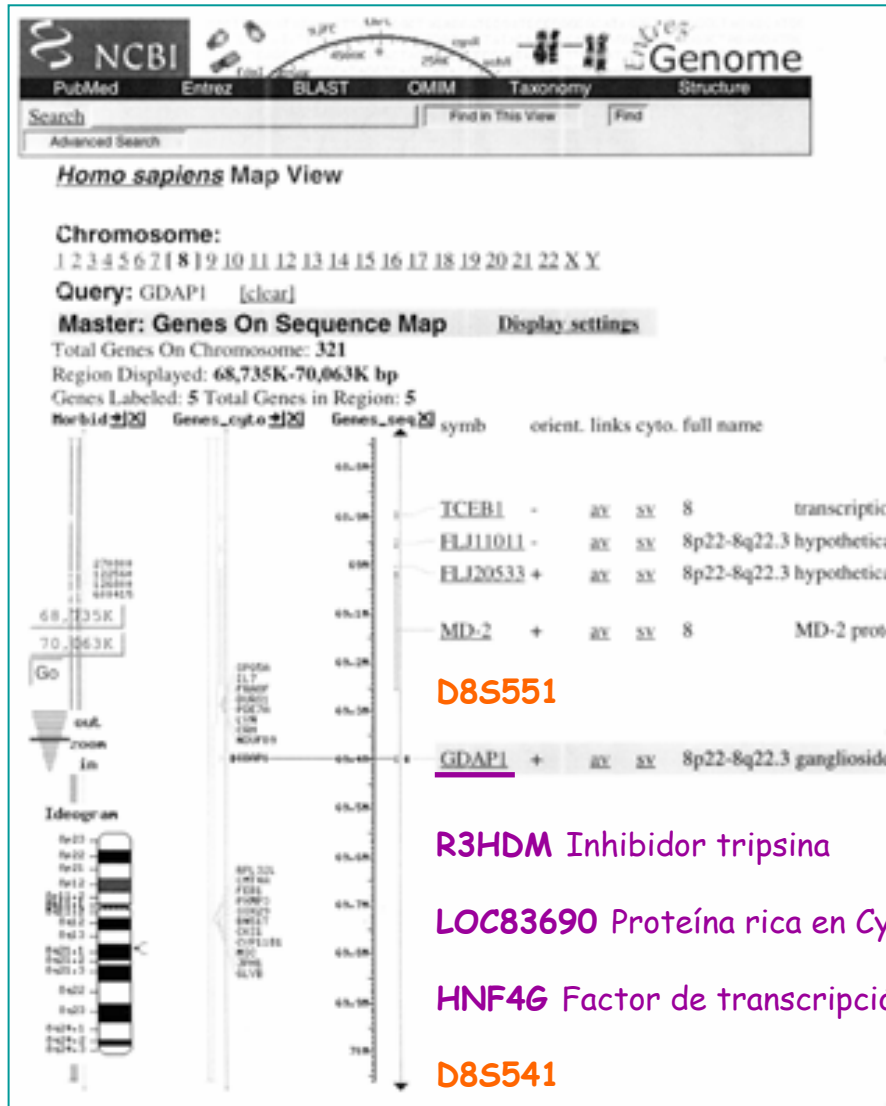
Lod Score (Z)
(θ) = 0.0

Markers	Lod Score (Z)
D8S541	4.61
D8S164	3.63
D8S286	4.19
D8S279	3.15

Análisis de haplotipos en la familia LF38



GDAP1, gen candidato posicional



- GDAP1 se sobreexpresa en un sistema de diferenciación de células de la línea Neuro2a derivada de neuroblastoma de ratón
- GDAP1 podría participar en el desarrollo neuronal
- GDAP1 tiene una expresión muy fuerte en cerebro de ratón

1,94 Mb

Análisis de Haplotipos

Cen-D8S279-D8S286-D8S551-D8S1474-D8S541-D8S84-tel

HAPLOTIPOS

A: 4-3-3-2-2-3 >>>> LF38 (homozigosis), LF20

B: 1-4-4-1-1-2 >>>> LF249

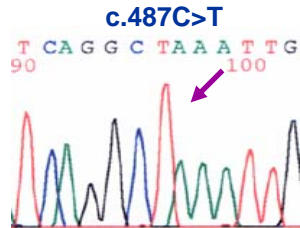
C: 3-3-2-1-1-1 >>>> LF20

D: 4-2-1-2-2-1 >>>> LF249

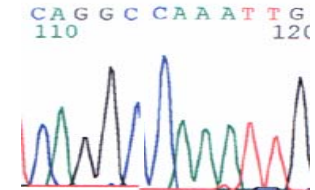
Alelos Mutantes

Silvestre

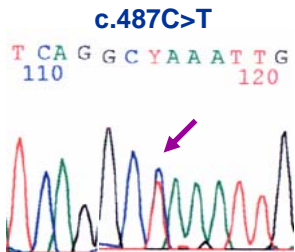
LF38



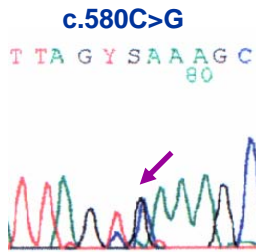
p.Q163X homocigoto



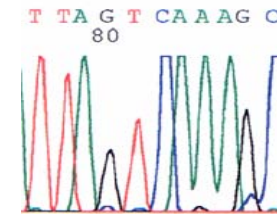
LF249



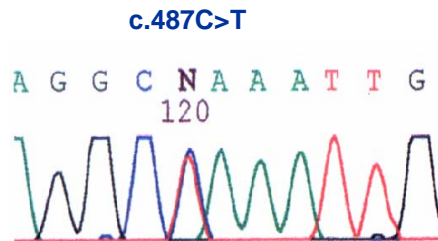
p.Q163X



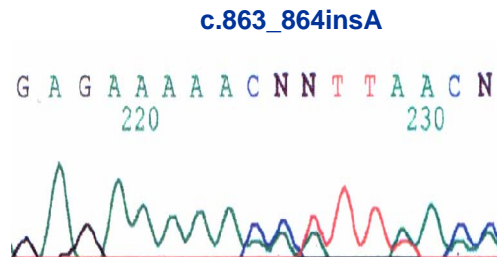
p.S194X



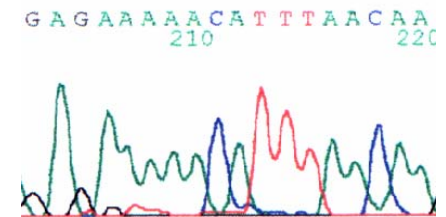
LF20



p.Q163X



p.T288fs



Análisis de Haplotipos

Cen-D8S279-D8S286-D8S551-D8S1474-D8S541-D8S84-tel

HAPLOTIPOS

A: 4-3-3-2-2-3 >>>> LF38 (homozigosis), LF20 >>>> p.Q163X

B: 1-4-4-1-1-2 >>>> LF249 >>>> p.S194X

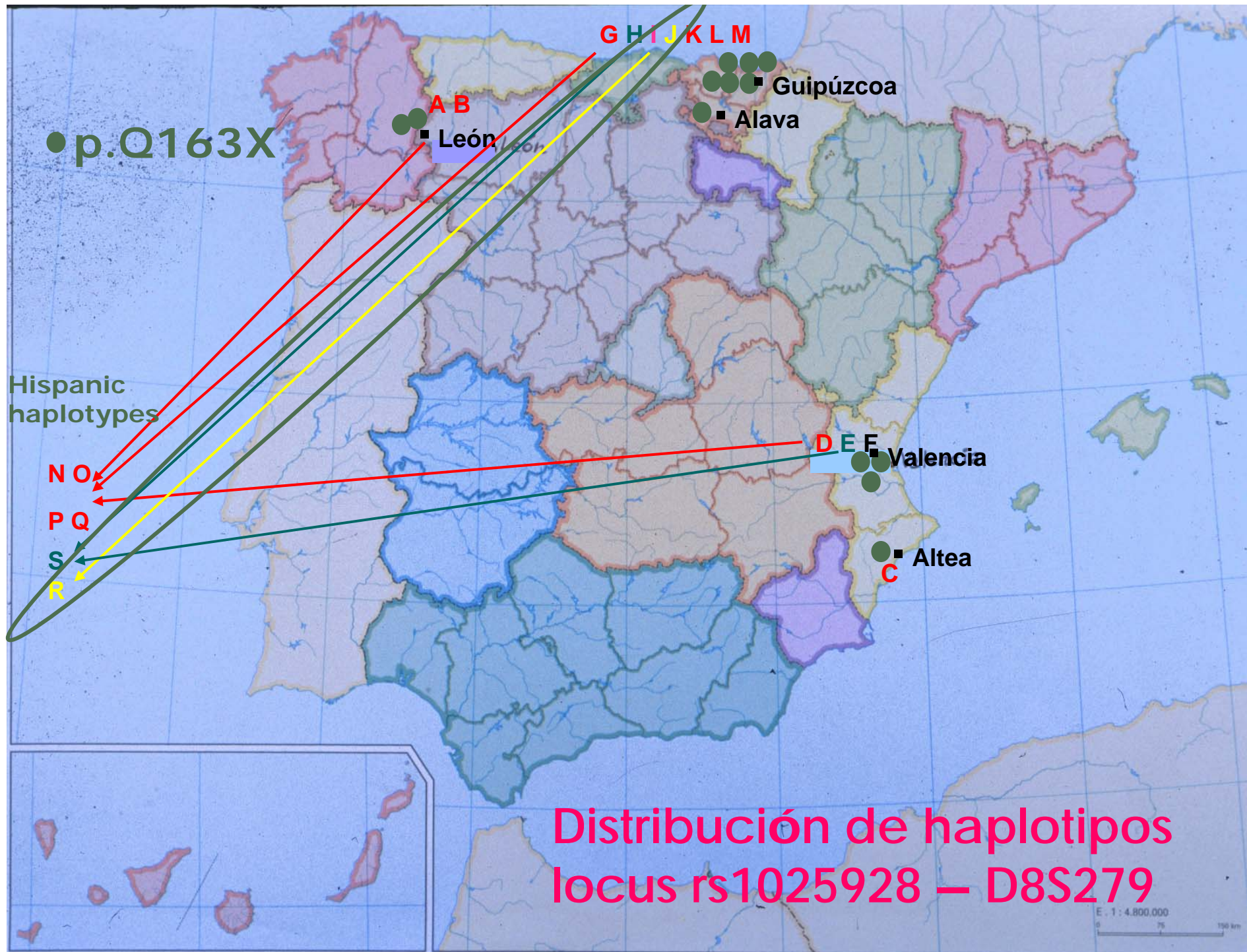
C: 3-3-2-1-1-1 >>>> LF20 >>>> p.T288fs

D: 4-2-1-2-2-1 >>>> LF249 >>>> p.Q163X

p.Q163X, mutación fundadora?

LF249	p.Q163X/p.S194X
LF20	p.Q163X/p.T288fs
LF38	p.Q163X/p.Q163X
LF127	p.S194X/p.T288fs
LF135	p.Q163X/p.Q163X
VAL1	p.Q163X/p.Q163X
VAL3	p.Q163X/p.Q163X
VAL4	p.Q163X/p.Q163X
VAL5	p.Q163X/p.E14fs

Cuesta et al. Nature Genet 2002
Claramunt et al. J Med Genet 2005



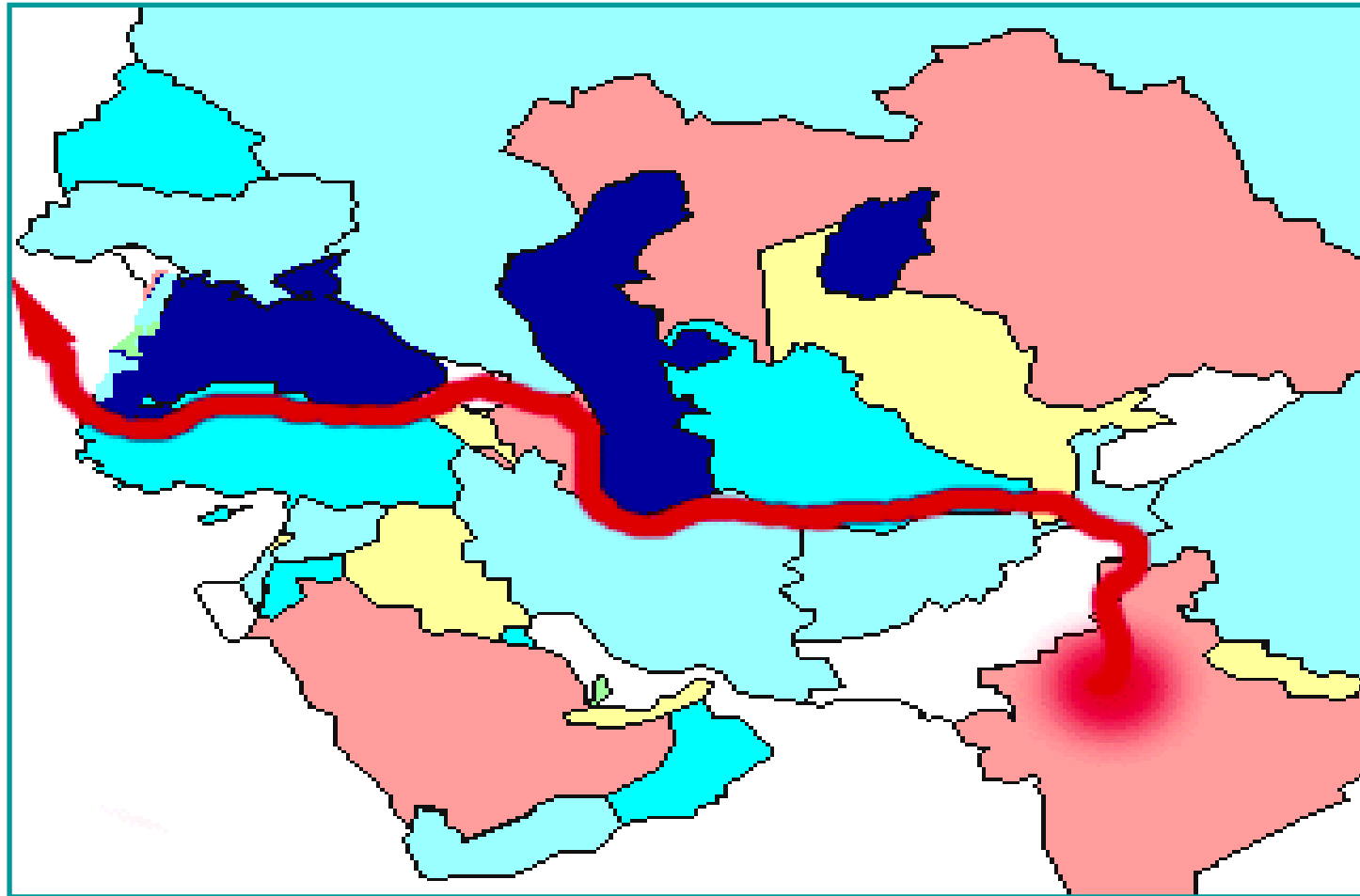
Short Report

The p.R1109X mutation in *SH3TC2* gene is predominant in Spanish Gypsies with Charcot–Marie–Tooth disease type 4

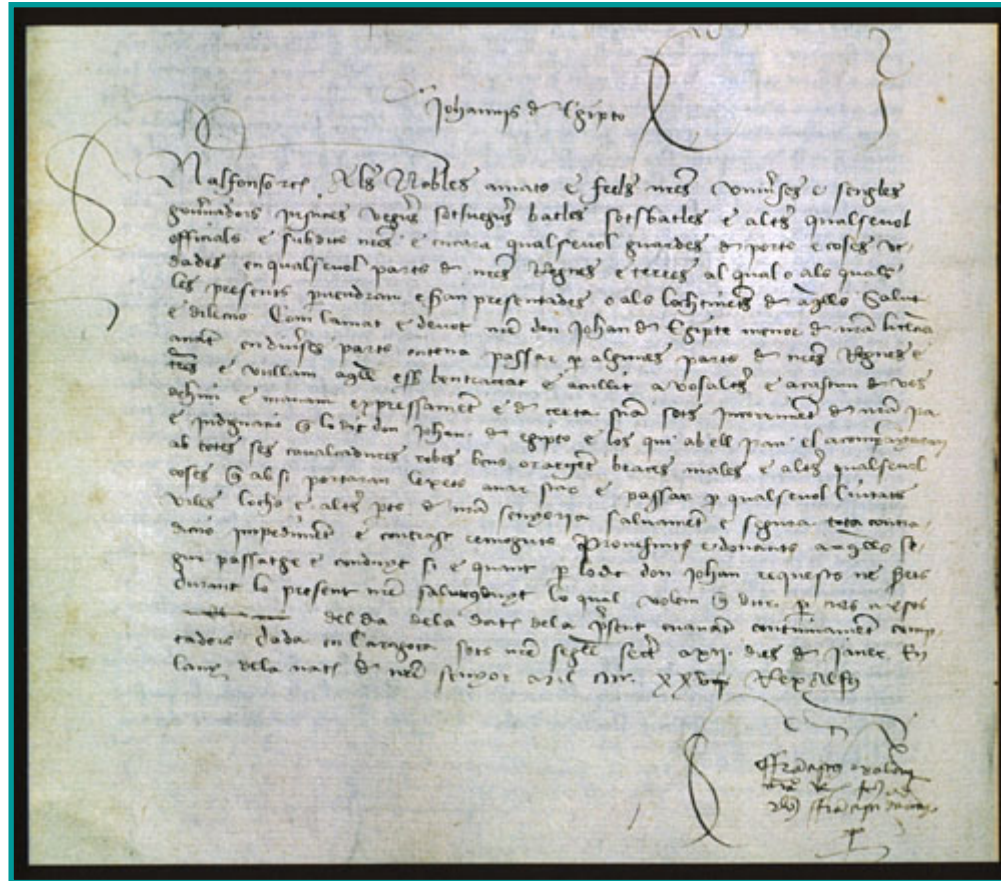
Claramunt R, Sevilla T, Lupo V, Cuesta A, Millán JM, Vilchez JJ, Palau F, Espinós C. The p.R1109X mutation in *SH3TC2* gene is predominant in Spanish Gypsies with Charcot–Marie–Tooth disease type 4. *Clin Genet* 2007; 71: 1–7. © Blackwell Munksgaard, 2007

R Claramunt^{a,b}, T Sevilla^c,
V Lupo^{a,b}, A Cuesta^{a,b},
JM Millán^d, JJ Vilchez^c,
F Palau^{a,b} and C Espinós^{a,b}

Origen de la población romaní

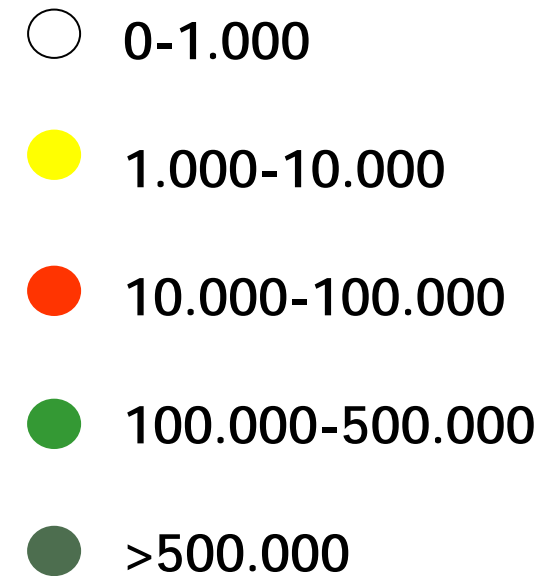


Primer documento sobre la llegada de los gitanos a España



Permiso de paso concedido por el rey Alfonso V de Aragón a Johannes de Egipto Menor y a quienes le acompañen. Zaragoza, 12 de enero de 1425

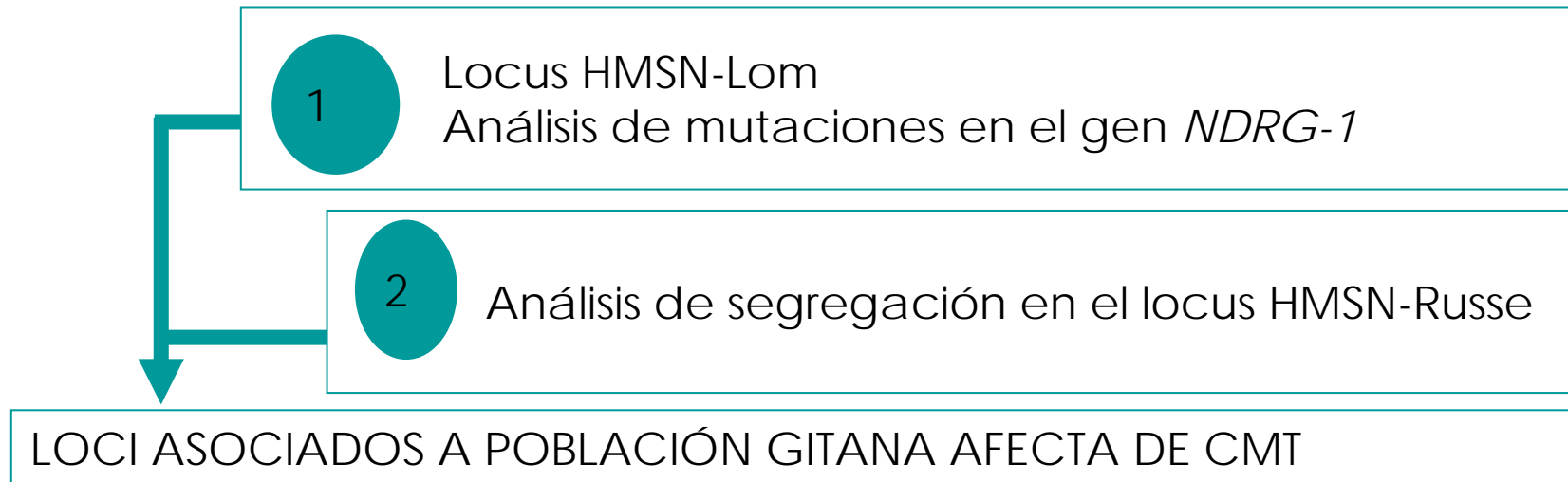
Distribución de la población romaní en Europa



Kalaydjeieva BMC Medical Genetics, 2001

Diseño estudio

20 familias de etnia gitana



Resultados

20 familias de etnia gitana

LOCI ASOCIADOS A POBLACIÓN GITANA AFECTA DE CMT

1

Locus HMSN-Lom
Análisis de mutaciones en el gen *NDRG-1*

p.R148X homocigosis → 4 familias

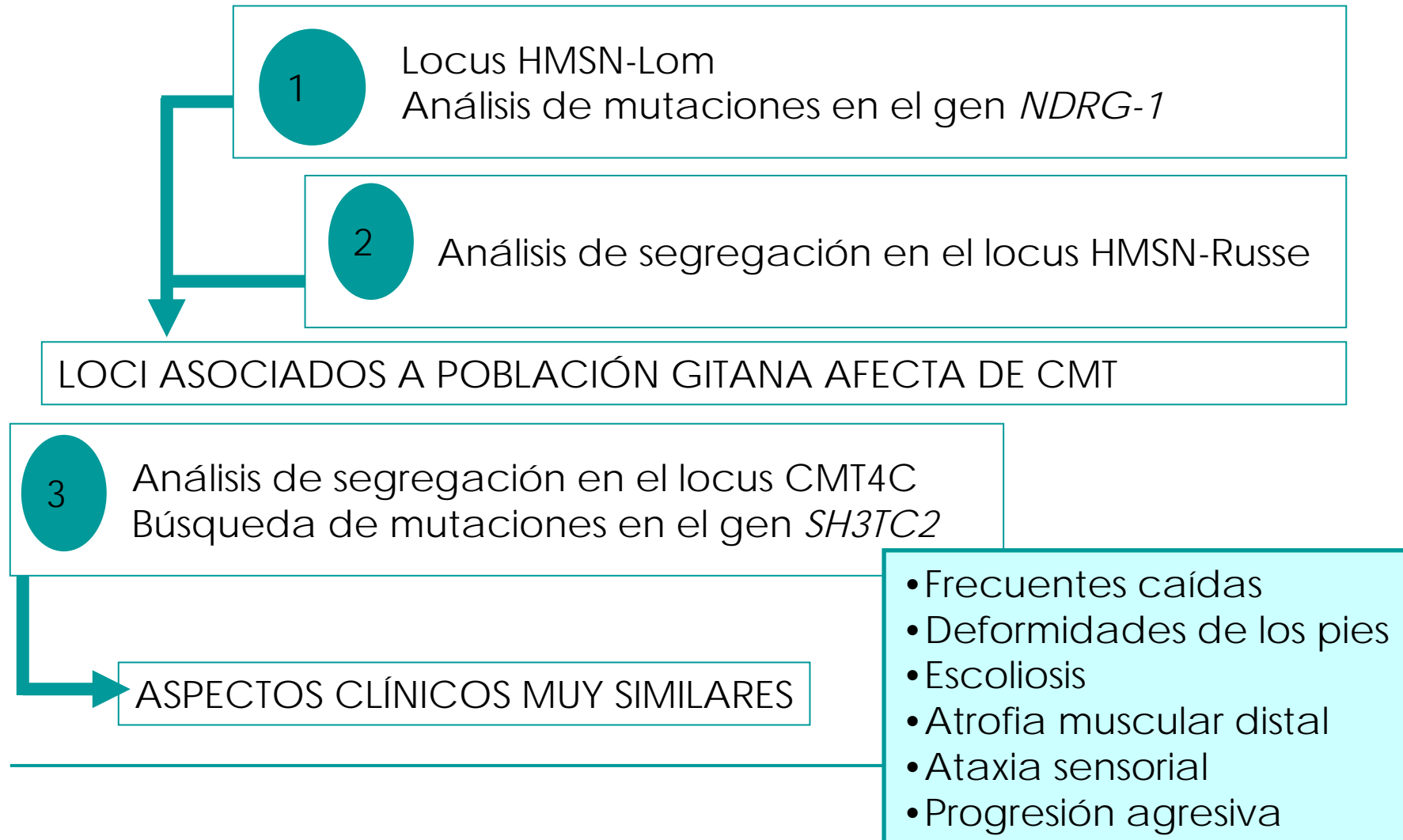
2

Análisis de segregación en el locus HMSN-Russe

16 fam: > 3 casos con haplotipo similar
> 7 familias descartadas
> 3 familias no concluyentes
> 3 casos aislados

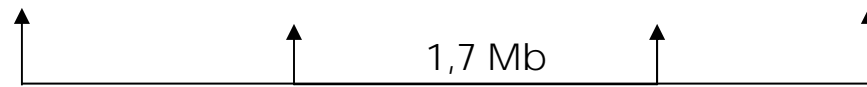
Diseño estudio

20 familias de etnia gitana



Análisis de ligamiento del locus CMT4C (5q32)

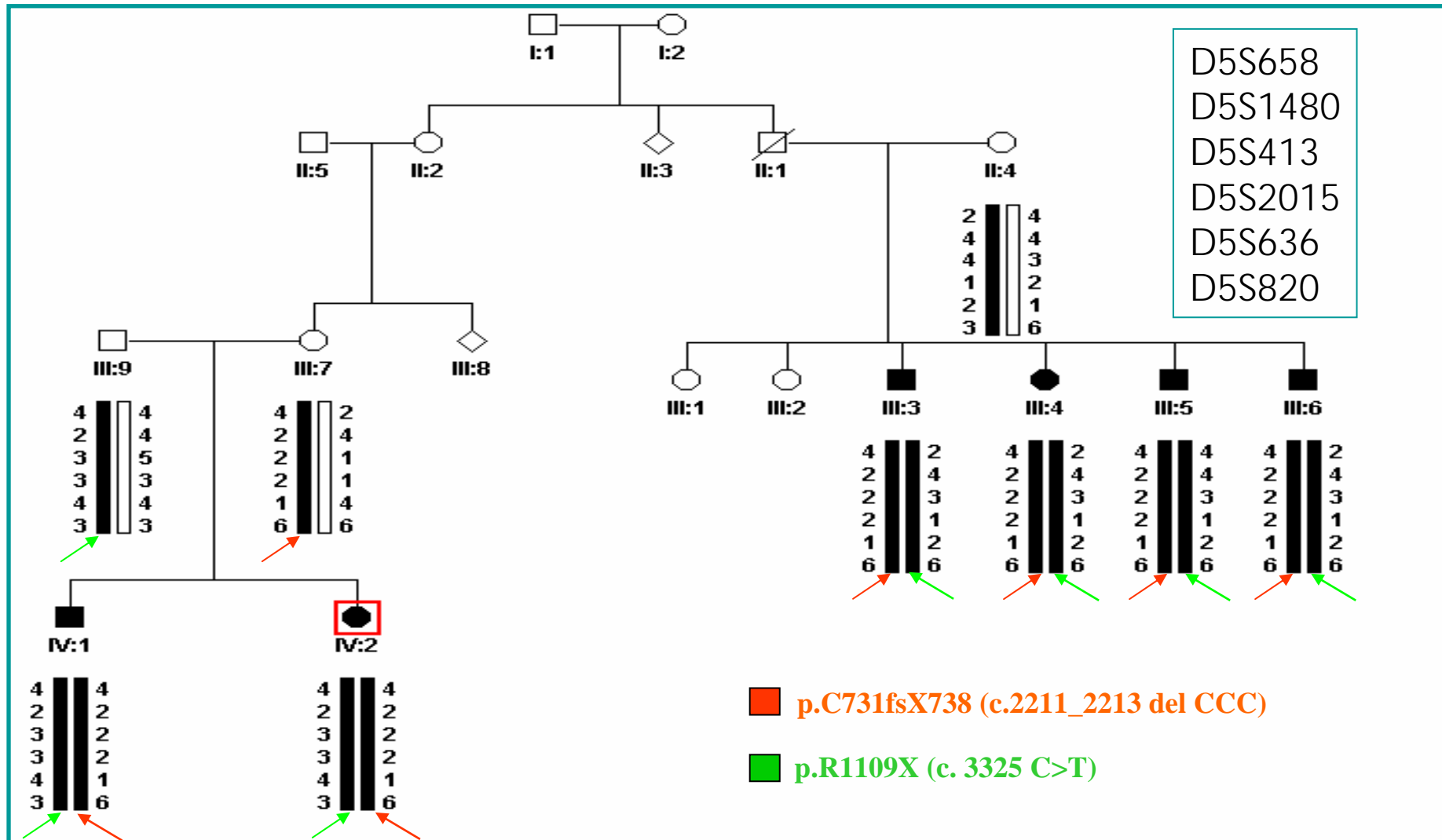
Familias	chromonas	D5S658	D5S1480	D5S413	IVS14+69CT	D5S2015	D5S636	D5S820
PED5	A	4	2	2	T	2	1	6
	B	2	4	3	C	1	2	6
	C	4	2	3	C	3	4	3
PED3	D	2	6	3	C	1	2	6
	E	2	2	3	C	2	3	3
PED4	F	2	2	3	C	1	2	4
	G	2	2	3	C	1	2	4
PED7	H	2	2	3	C	1	2	3
	I	2	2	3	C	1	2	3
PED8	J	4	2	3	C	1	2	3
	K	4	2	3	C	1	2	4
PED9	L	2	2	3	C	1	2	4
	M	2	2	3	C	1	2	4
PED10	N	2	2	3	C	1	2	6
	O	2	2	3	C	1	2	6
PED12	P	2	2	3	C	1	2	6
	Q	2	2	3	C	1	2	6
fCMT-2	R	1	2	3	C	1	2	6
	S	1/2	4	3	C	1	2	6



5,6 Mb

Análisis de ligamiento del locus CMT4C (5q32)

Búsqueda de mutaciones en *SH3TC2*



Análisis de mutaciones

Familias	cromosomas	D5S658	D5S1480	D5S413	IVS14+69C/T	D5S2015	D5S636	D5S820	Mutación
PED5	A	4	2	2	T	2	1	6	C731_738delinsX
	B	2	4	3	C	1	2	6	R1109X
	C	4	2	3	C	3	4	3	R1109X
PED3	D	2	6	3	C	1	2	6	R1109X
	E	2	2	3	C	2	3	3	R1109X
PED4	F	2	2	3	C	1	2	4	R1109X
	G	2	2	3	C	1	2	4	R1109X
PED7	H	2	2	3	C	1	2	3	R1109X
	I	2	2	3	C	1	2	3	R1109X
PED8	J	4	2	3	C	1	2	3	R1109X
	K	4	2	3	C	1	2	4	R1109X
PED9	L	2	2	3	C	1	2	4	R1109X
	M	2	2	3	C	1	2	4	R1109X
PED10	N	2	2	3	C	1	2	6	R1109X
	O	2	2	3	C	1	2	6	R1109X
	P	2	2	3	C	1	2	6	R1109X
fCME-2	Q	2	2	3	C	1	2	6	R1109X
	R	1	2	3	C	1	2	6	R1109X
	S	1/2	4	3	C	1	2	6	R1109X

Primeras conclusiones

20 familias de etnia gitana

13 Familias de etnia gitana supervisadas en el H. La Fe

Se seleccionan 10 familias para el estudio del locus CMT4C

>8 casos en homocigosis, p.R1109X

>1 caso p.R1109X/p.C731_738delinsX

>1 caso descartado CMT4C >>>> HETEROGENEIDAD GENÉTICA

Locus HMSN-Lom, mutación *NDRG-1* p.R148X en 4 familias

Locus HMSN-Russe, 3 casos con haplotipo similar

3 Familias de etnia gitana de fuera de la C. Valenciana

>1 familia CMT4C, en homocigosis p.R1109X

>2 familias con resultados no concluyentes

Datación alélica de la mutación *SH3TC2* p.R1109X

Aproximaciones:

- >bdmc21 (Slatkin & Rannala, Am. J. Hum Genet, 1997)
- >DMLE+ (Reeve & Rannala, Am. J. Hum Genet, 2001)

Datos empleados:

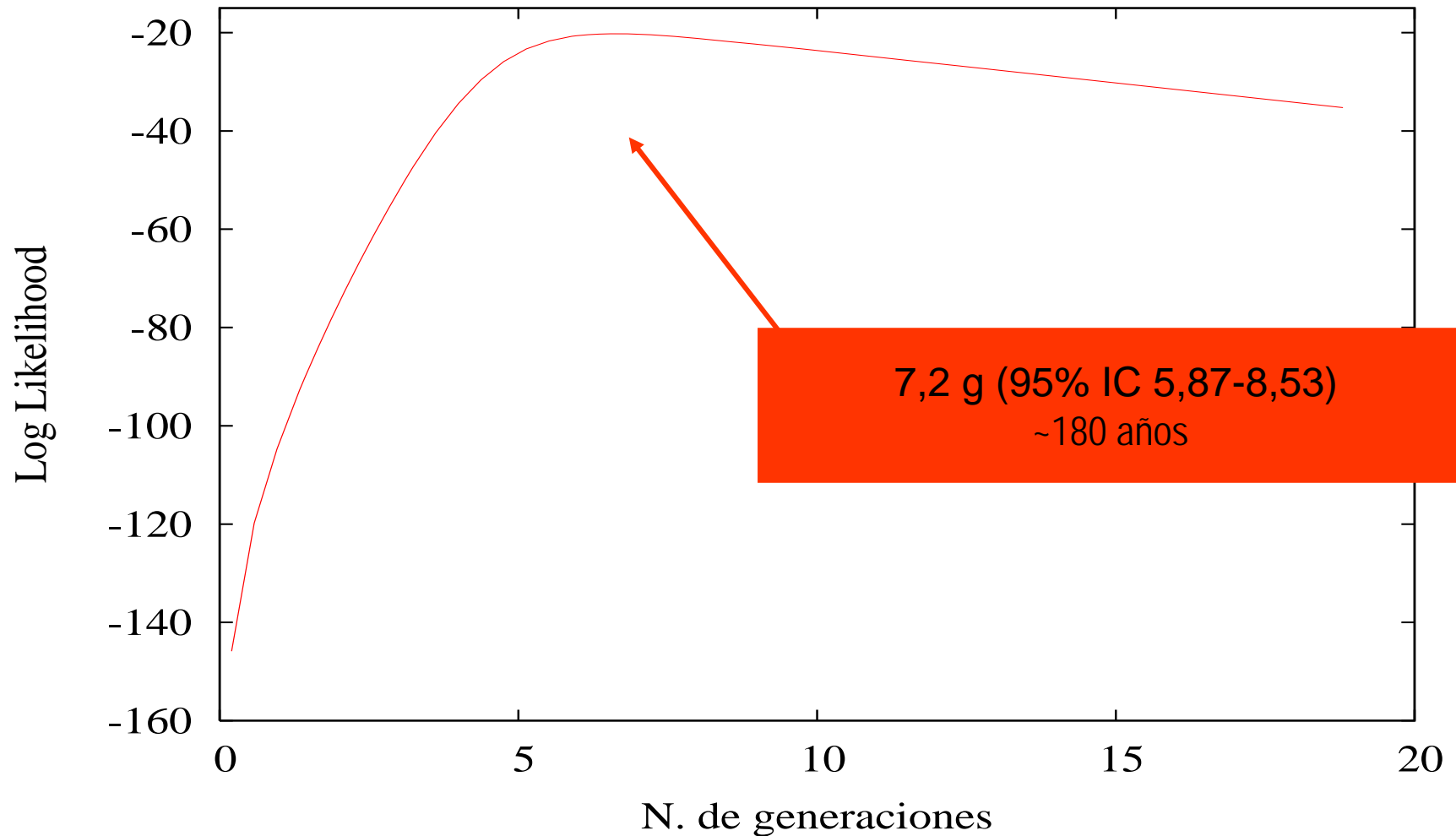
- >Tasa de crecimiento de 1,332 (Hunter et al., Pediatr Res, 2002)
- >Proporción muestral de 0,082
 - *Frecuencia de portadores 2/100
 - *Población actual romaní en España 550.000
 - *Cromosomas portadores del haplotipo común 18

>bdmc21: D5S1480 y D5S2015

>DMLE+: cen_D5S1480-D5S413-IVS14+69C/T-D5S2015-D5S636_tel

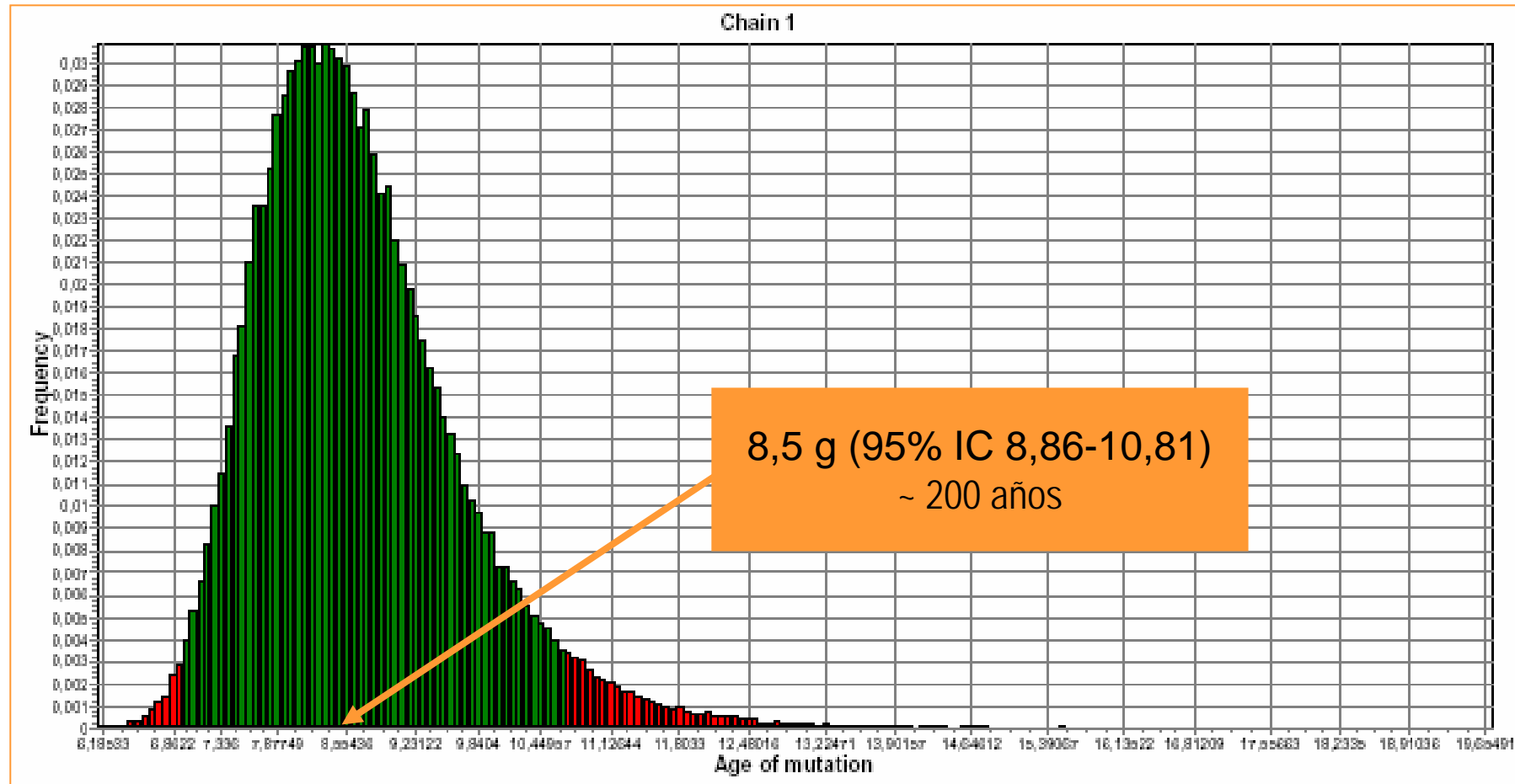
Datación alélica de la mutación *SH3TC2* p.R1109X

Método bdmc21



Datación alélica de la mutación *SH3TC2* p.R1109X

Método DMLE+



Conclusiones

10 Familias de etnia gitana CMT4C

>9 casos en homocigosis, p.R1109X

>1 caso en heterocigosis, p.R1109X/p.C731_738delinsX

p.R1109X, asociada a un haplotipo común
Data de finales del s.XVIII-principios del s.XIX

C731_738delinsX, más reciente



3º CURSO DE GENÉTICA HUMANA

24 - 26 de enero de 2008

Instituto de Biomedicina de Valencia,
CSIC y CIBER de Enfermedades Raras

Organiza:



Sociedad Española de Genética (SEG)