

Caracterización del marcador microsatélite IVS17bTA y seis mutaciones del gen CFTR en 21 familias cubanas con fibrosis quística

Laura González, ✉ Teresa Collazo, Yulia Clark, Manuel Gómez, Lidice Reyes

Laboratorio de Biología Molecular, Centro Nacional de Genética Médica, CNGM
Ave. 31 Esq. 146 No. 3102, Reparto Cubanacán, Playa, CP 11400, La Habana, Cuba
✉ tcollazo@infomed.sld.cu

RESUMEN

La fibrosis quística es una enfermedad autosómica recesiva. Su incidencia en Cuba es de 1 de cada 5000 recién nacidos vivos. La causa molecular que provoca esta enfermedad son las mutaciones en el gen regulador transmembranal de la fibrosis quística (CFTR). En este estudio se detectaron las mutaciones más frecuentes en 21 familias cubanas y se estandarizaron las técnicas para el estudio del marcador microsatélite IVS17bTA, lo cual constituyó nuestro objetivo principal. Para la identificación de estas mutaciones y la estandarización del microsatélite, se emplearon las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa y electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida (tinción con plata). De los 22 pacientes, se encontraron siete homocigóticos, cuatro heterocigóticos compuestos y 11 con una sola mutación, por lo que se caracterizaron molecularmente 33 cromosomas, lo que representa el 75 %. En el estudio del microsatélite IVS17bTA se encontraron 12 variantes alélicas, los alelos más frecuentes fueron el 31 y el 7. El alelo asociado a la mutación F508del fue el 31 y a la mutación R334W fue el 46. De las 21 familias analizadas, 18 resultaron completamente informativas para el marcador, lo que representa el 85.7 %. Este estudio ha ayudado a completar aún más el diagnóstico en los pacientes en los que aún no se han identificado las mutaciones responsables en ambos cromosomas o en uno de ellos. Además se han podido identificar mutaciones asociadas a diferentes alelos del marcador, sin necesidad de secuenciar el gen, lo que aumentaría el costo.

Palabras clave: marcador microsatélite IVS17bTA, fibrosis quística, reacción en cadena de la polimerasa

Biotechnología Aplicada 2013;30:257-261

ABSTRACT

Characterization IVS17bTA microsatellite marker and six CFTR gene mutations in 21 Cuban families with cystic fibrosis. Cystic fibrosis is an autosomal recessive disease. Its incidence in Cuba is 1 in 5000 live births. The molecular cause underlying this disease is related to mutations in the regulatory gene encoding the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR). In this study, the techniques for the study of IVS17bTA microsatellite marker were standardized, and the most frequent mutations in the CFTR gene were also detected for 21 Cuban families. Polymerase chain reaction, agarose and polyacrylamide (plus silver staining) gel electrophoresis techniques were used for both, identification of mutations and microsatellite standardization. Among the 22 Cuban patients, seven were found homozygous, four compound heterozygous and 11 with a single mutation so, 33 chromosomes were molecularly characterized for the 75 %. Twelve allelic variants were found for the IVS17bTA microsatellite; alleles 31 and 7 the most frequent ones. Alleles 31 and 46 were associated to the F508del and R334W mutations, respectively. Among the 21 families, 18 were completely informative for the IVS17bTA microsatellite marker, accounting for 85.7 %. This study helped to complete the diagnosis in those patients in which the responsible mutations in one or both chromosomes had not yet been identified. Besides, we were also able to identify mutations associated with different alleles of the marker without gene sequencing, also helping to decrease the cost of screening.

Keywords: marker microsatellite IVS17bTA, cystic fibrosis, polymerase chain reaction

Introducción

La fibrosis quística (FQ) es una de las enfermedades genéticas más frecuentes en poblaciones de origen caucásico y constituye un problema de salud mundial. En Cuba se ha reportado una incidencia de aproximadamente uno por cada 5000 recién nacidos vivos [1]. Esta enfermedad es multisistémica y se caracteriza clínicamente por insuficiencia pancreática, afectación pulmonar progresiva y concentración elevada de electrolitos en el sudor. Los pacientes con FQ sufren limitaciones físicas y psicológicas. Su tratamiento clínico suele ser prolongado y costoso pues con frecuencia necesitan antibióticos, reemplazo de enzimas pancreáticas, adecuada nutrición e ingresos hospitalarios de larga duración.

El patrón de herencia de esta enfermedad es autosómico recesivo; la provocan mutaciones en el gen

regulador de la conducción transmembranal de la fibrosis quística (CFTR), ubicado en el cromosoma 7 en la región 7q31. Este gen abarca 250 kb y contiene 27 exones que codifican una proteína de 1480 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 170 kDa [2]. Se han detectado más de 1800 mutaciones en el gen CFTR [3].

En Cuba, el diagnóstico de esta enfermedad tiene en cuenta el cuadro clínico y el resultado positivo de la prueba de electrolitos en el sudor. Además se detectan seis mutaciones más frecuentes en nuestro país [4, 5]: F508del (37.9 %), G542X (6.9 %), R334W (5.2 %), R553X (2.2 %), R1162X (2.0 %) y 3120+1G→A (1.3 %). Sin embargo, con la detección de estas seis mutaciones se analiza solamente el 55 % de los cromosomas afectados, por lo que para ampliar las posibilidades

1. Collazo T, Piloto Y, Clark Y, Boffil AM, Gómez M, Hernández Y. Detección de mutaciones en pacientes cubanos con fibrosis quística. *Biotechnol Apl.* 2008;25(4): 345-9.

2. Scriver CR, Beaudet AL, Sly GW, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*. 7th ed. Vol. 3. New York; Mc Graw-Hill; 1995.

3. Cystic Fibrosis Mutation Database (CFMDB) [Internet]. Ontario: Cystic Fibrosis Consortium. c2011 [cited 2013 Aug 9]; Available from: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>

4. Collazo T, Boffil AM, Clark Y, Hernández Y, Gómez M, Rodríguez F, et al. Common mutations in Cuban cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* 2009;8(1):47-9.

de diagnóstico se deben utilizar marcadores moleculares, entre los que se encuentran los microsatélites IVS17bTA, IVS17bCA y el IVS8CA.

Los microsatélites son secuencias de ADN que contienen repeticiones variables de mononucleótidos, dinucleótidos (TG)_n o trinucleótidos (CAA)_n, cuyos alelos están constituidos por diversos números de unidades [6]. Estos se usan para la caracterización y pesquisa de mutaciones, los estudios evolutivos del gen y el diagnóstico indirecto de enfermedades [7].

Los microsatélites del gen CFTR se ubican en las regiones intrónicas (Figura 1). El microsatélite IVS17bTA se encuentra localizado en el intrón 17b del gen CFTR, del cual se han identificado 30 alelos [8], en el rango de 7 a 56 unidades repetitivas del dinucleótido TA. Los alelos comunes tienen 7, 30 y 31 unidades dinucleotídicas, con frecuencia de 0.22; 0.19 y 0.12, respectivamente, entre los cromosomas no fibroquísticos [9]. Este microsatélite tiene una alta heterocigocidad que permite alcanzar información cercana al 99 % cuando se combina con el estudio de las mutaciones más frecuentes, según estudios en la población de origen caucásico [8].

Se reporta que a escala mundial el más informativo de los tres marcadores microsatélites es el IVS17bTA ya que suele presentar muchos alelos. Por esta razón, el trabajo se basó en la estandarización y el análisis de este microsatélite en pacientes fibroquísticos cubanos.

Materiales y métodos

Sujetos de estudio

Se estudiaron 64 individuos agrupados en 21 familias de los cuales 22 padecían fibrosis quística. Los diagnósticos se efectuaron según sus características clínicas y la prueba de electrolitos en sudor. Estos pacientes fueron diagnosticados por la Comisión Nacional de Fibrosis Quística de Cuba (Ministerio de Salud Pública).

En los 64 individuos se evaluó la presencia de las mutaciones F508del, G542X, R1162X, R553X, 3120+1G→A y R334W.

Extracción de ADN

El ADN se obtuvo a partir de una muestra de 10 mL de sangre periférica usando etilendiaminetetracético (EDTA 56 mg/mL) como anticoagulante. La extracción se realizó por el método de precipitación salina, descrito por Miller *et al.* en 1988 [10]. Una vez obtenidas las muestras de ADN, se codificaron y almacenaron hasta el momento que se fueran a usar.

Detección de las mutaciones

Las mutaciones F508del, G542X y R1162X se detectaron por el método de amplificación refractaria de mutaciones específicas (ARMS), descrito por Newton [11]. Se emplearon por reacción: 100 ng de ADN, 1 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, EE.UU.), 0.85 pmol/μL de cada cebador (Biosource, EE.UU.), dNTP 0.1 mM, MgCl₂ 1.0 mM en un volumen final de 25 μL. En todos los casos se hicieron controles internos de amplificación. La reacción de amplificación consistió en la desnaturalización durante 5 min a 94 °C; posteriormente se adicionó la Taq ADN Polimerasa (Promega, EE.UU.), seguido de 29 ciclos de repeticiones con las

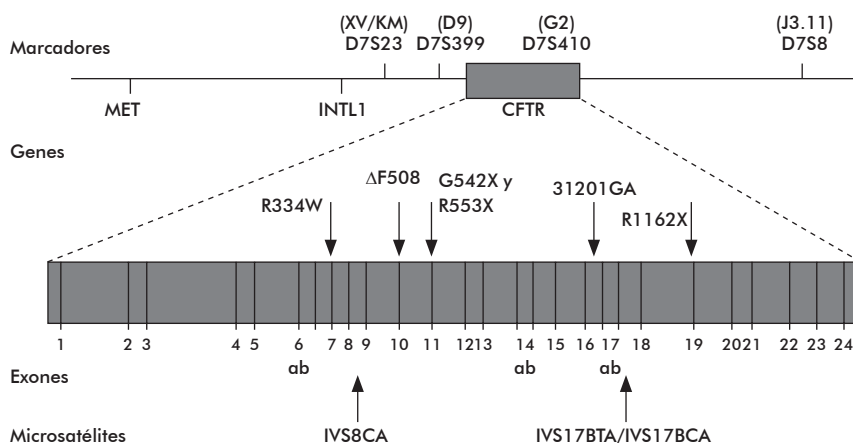


Figura 1. Representación del gen CFTR, de las mutaciones más frecuentes estudiadas y los marcadores microsatélites.

siguientes etapas: 1 min de desnaturalización a 94 °C; 1 min de alineación a 60 °C, 1 min y 30 s de extensión a 72 °C y finalmente un ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min. Los fragmentos obtenidos se corrieron a 250 V durante 25 min en un gel de agarosa al 2 % que contenía bromuro de etidio, y se visualizaron en transiluminador de luz ultravioleta.

Para identificar las mutaciones 3120+1G→A, R334W y R553X se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el producto amplificado se digirió con las enzimas de restricción correspondientes a cada mutación.

Para la detección de la mutación 3120+1G→A se establecieron las siguientes condiciones: 100 ng de ADN, 1 U por reacción de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, EE.UU.), cada cebador a 6.5 pmol/μL (Biosource, EE.UU.), dNTP 0.1 mM, MgCl₂ 2.5 mM, en un volumen final de reacción de 25 μL. La reacción de amplificación consistió en la desnaturalización durante 5 min, seguidamente 35 ciclos de repeticiones con las siguientes etapas: 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de hibridación a 57 °C, 1 min de extensión a 67 °C y finalmente un ciclo de extensión final a 67 °C durante 5 min. Se realizó una corrida electroforética para comprobar que el PCR ocurrió en óptimas condiciones en un gel de agarosa al 2 %. El producto amplificado se digirió a 60 °C durante 4 h, usando 20 u por muestra de la enzima de restricción BstNI (Bio Labs, EE.UU.), en un volumen final de 35 μL. La corrida se realiza en un gel de agarosa al 2 % y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

Para la detección de la mutación R334W se emplearon las siguientes condiciones: 100 ng de ADN, 1 U por reacción de Taq ADN Polimerasa (Invitrogen, EE.UU.), cada cebador de 6.5 pmol/μL (Biosource, EE.UU.), dNTP 0.1 mM, MgCl₂ 1.5 mM, en un volumen de reacción de 25 μL. La reacción de amplificación consistió en la desnaturalización durante 3 min, seguidamente 35 ciclos de repeticiones con las siguientes etapas: 20 s de desnaturalización a 94 °C, 30 s de alineación a 55 °C, 30 s de extensión a 74 °C y finalmente un ciclo de extensión final a 74 °C durante 5 min. El producto amplificado se digirió a 37 °C durante 3 h, empleando 25 U de la enzima de restricción HpaII (Promega, EE.UU.), en un volumen final de

5. Collazo T, López I, González L, Clark Y, Piloto Y, Gómez M, *et al.* Estudio molecular de la fibrosis quística en Cuba. In: Memorias Convención Internacional de Salud Pública. Cuba Salud 2012. La Habana 3-7 de diciembre de 2012, Cuba. La Habana: Ministerio de Salud Pública; 2002.

6. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet.* 1989;44(3):388-96.

7. Estivill X, Morral N, Casals T, Nunes V. Prenatal diagnosis of cystic fibrosis by multiplex PCR of mutation and microsatellite alleles. *Lancet.* 1991;338(8764):458.

8. Visich AA, Barreiro CZ, Chertkoff LP. Caracterización de tres microsatélites del gen de fibrosis quística en familias argentinas. *Medicina (Buenos Aires).* 2001; 61(1):23-7.

9. Zielinski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z, Riordan JR, *et al.* Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics.* 1991;10(1): 214-28.

10. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215-8.

11. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, *et al.* Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 1989;17(7):2503-16.

35 µL. Posteriormente se realizó la electroforesis en un gel de agarosa al 2 % y el producto obtenido se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

Y para la detección de la mutación R553X se emplearon las siguientes condiciones por reacción: 100 ng de ADN, 1 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, EE.UU.), cada cebador a 6.5 pmol/µL (Biosource, EE.UU.), dNTP 0.1 mM, MgCl₂ 1.5 mM, en un volumen final de 25 µL. La reacción de amplificación consistió en la desnaturalización durante 5 min, seguida de 30 ciclos de repeticiones con las siguientes etapas: 30 s de desnaturalización a 94 °C, 30 s de hibridación a 55 °C, 1 min de extensión a 72 °C y por último un ciclo de extensión final a 72 °C durante 5 min. El producto amplificado fue digerido a 37 °C durante 3 h, empleando 25 U de la enzima de restricción *Hinc* II (Bio Labs, EE.UU.), para un volumen final de 35 µL. Posteriormente se corrió el producto digerido en un gel de agarosa al 3 % y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

Estudio del marcador microsatelite IVS17bTA

La amplificación del microsatélite IVS17bTA se realizó mediante PCR con las siguientes condiciones por reacción: 100 ng de ADN, 1 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, EE.UU.), 5 pmol/µL de cada cebador (Biosource, EE.UU.), dNTP 0.1 mM, MgCl₂ 1.5 mM en un volumen final de 25 µL. La reacción de amplificación consistió en la desnaturalización durante 4 min, seguida de 30 ciclos de repeticiones con las siguientes etapas: 30 s de desnaturalización a 94 °C, 30 s de hibridación a 50 °C, 30 s de extensión a 72 °C; y finalmente un ciclo de extensión final a 72 °C durante 7 min. En la [tabla 1](#) se muestran las secuencias de los cebadores para la amplificación de los alelos del marcador microsatélite IVS17bTA. La amplificación se comprobó en un gel de agarosa al 2 %, para observar bandas con un tamaño desde 202 pb hasta 294 pb, según sean las variantes alélicas obtenidas.

El producto amplificado se corrió en una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5 % con un tiempo de migración de 4 a 5 h a 150 V, y a una temperatura de 15 °C. Luego de la corrida se procedió a la tinción con plata para la visualización del ADN siguiendo las instrucciones del kit PlusOne DNA Silver Staining (Amersham Biosciences, EE.UU.; 2002).

Resultados

De las 64 personas analizadas, 22 padecían fibrosis quística y 42 eran portadores. De estos últimos, nueve no presentaron las mutaciones estudiadas; por lo que 33 eran portadores de la mutación identificada. En 11 de los pacientes se identificaron las dos mutaciones y en los otros 11 solo se les identificó la mutación de uno de sus alelos afectados. De manera general, entre heterocigóticos, homocigóticos y heterocigóticos compuestos se caracterizaron 55 personas, de las 64 estudiadas.

En la [tabla 2](#) se muestran los resultados para la detección de las mutaciones en las 21 familias.

Las mutaciones R1162X, R553X y 3120+1G→A no se detectaron en las familias analizadas.

De los 22 pacientes estudiados, se encontraron siete homocigóticos (seis con F508del y uno con G542X), cuatro heterocigóticos compuestos (dos con F508del/

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos del microsatélite IVS17bTA utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa

Oligonucleótidos	Secuencias (5´-3´)	Temperatura de hibridación (°C)
AT17D1.2	GAC AAT CTG TGT GCA TCG	54
AT17R1.2	GCT GCA TTC TAT AGG TTA TC	56

Tabla 2. Distribución genotípica de las mutaciones F508del, G542X, R1162X y R334W en los 64 casos estudiados, correspondientes a 21 familias cubanas con fibrosis quística

Mutación	Homocigóticos	Heterocigóticos
F508del	6	35
G542X	1	7
R334W	-	10

R334W, uno con F508del/G542X y uno para G542X/R334W)y 11 con una sola mutación (F508del o R334W) por lo que se caracterizaron molecularmente 33 cromosomas (75 %).

En la [figura 2](#) se muestran las frecuencias de los alelos del marcador IVS17bTA identificados en los 64 individuos, donde se encontraron 12 de las 30 variantes alélicas descritas en otras poblaciones de origen caucásico [8].

Los alelos más frecuentes en los 64 individuos fueron 31, 7, 32, 46 y 53, en orden de frecuencia. Los menos frecuentes resultaron ser 33, 35, 20 y 30.

En la [figura 3](#) se encuentran representadas las frecuencias de las combinaciones alélicas del marcador microsatélite IVS17bTA identificados en los 64 individuos.

Las combinaciones más frecuentes por orden descendente fueron: 7/31, 31/53, 31/31 y 32/46. Se detectó que el alelo 31 del marcador microsatélite IVS17bTA es el más frecuente en la población cubana, al igual que en España y otras poblaciones caucásicas [12], dato que se toma como referencia por la contribución genética de la población española al genoma cubano.

En la [figura 4](#) se muestra la frecuencia de los alelos del marcador microsatélite IVS17bTA encontrados en los 22 pacientes. Los alelos más frecuentes en ellos

12. Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Gimenez J, et al. The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. Nat Genet. 1994;7(2):169-75.

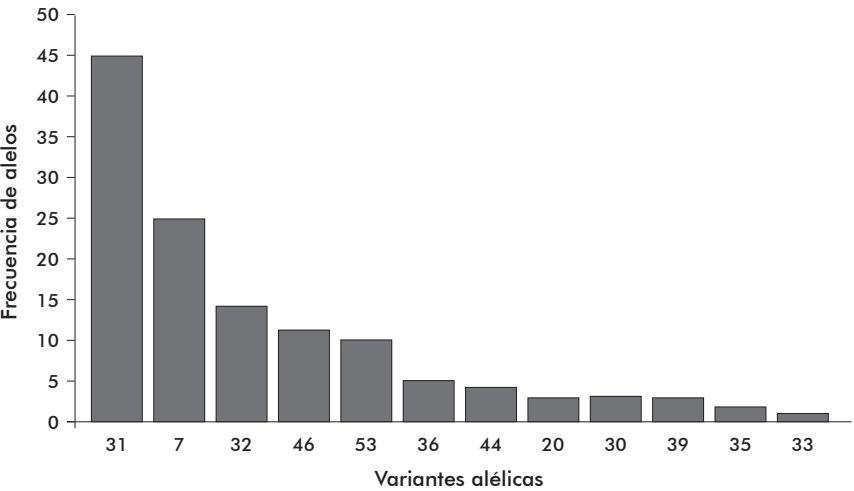


Figura 2. Frecuencia de las variantes alélicas del marcador microsatélite IVS17bTA identificados en las 21 familias con fibrosis quística.

por orden descendente fueron: 31, 7, 46, 32, y 53. Los menos frecuentes resultaron 35, 39 y 44.

Se ha observado que los alelos 31 y 32 del marcador microsatélite IVS17bTA son los más frecuentes en los pacientes fibroquísticos de esta muestra, al igual que en las poblaciones europeas [12].

La figura 5 muestra las combinaciones alélicas del marcador microsatélite IVS17bTA identificadas en los 22 pacientes estudiados. Las combinaciones más frecuentes resultaron ser 31/31, 7/31, 31/53 y 32/46. Las combinaciones menos frecuentes detectadas fueron 31/46, 32/36, 7/32, 39/46, 7/7, 7/35 y 31/44.

Al relacionar los resultados expuestos con la identificación de las mutaciones en los 64 individuos se obtuvo que el alelo 31 de este marcador microsatélite está relacionado con la mutación F508del, pues se encontró en 34 individuos. La mutación R334W se relacionó con el alelo 46 del marcador, en seis individuos. Para la mutación G542X, la relación fue con el alelo 32, encontrada en seis individuos. Estos resultados coinciden con lo reportado a escala mundial y orienta la búsqueda de mutaciones en la población cubana.

Además se estudió la heterocigocidad del marcador microsatélite IVS17bTA en los 64 individuos. Hubo 55 individuos heterocigóticos y nueve homocigóticos para los alelos del marcador, que presentaron una heterocigocidad de 85.93 %, por lo que el marcador microsatélite IVS17bTA es muy informativo. En el análisis de informatividad realizado en las 21 familias se encontró que 18 de ellas resultaron completamente informativas, lo cual representa el 85.7 % y solo tres familias fueron seminformativas.

Discusión

El empleo de marcadores genéticos es una alternativa para observar la transmisión de los alelos mutados en los grupos familiares, amén del conocimiento de las mutaciones responsables de la enfermedad. El descubrimiento de estos marcadores polimórficos estrechamente ligados al gen CFTR, dentro del gen afectado, es un importante avance para brindar de forma indirecta el diagnóstico prenatal y de portadores. Además se pueden realizar diagnósticos presintomáticos en pacientes recién nacidos, lo que posibilita que se tomen medidas de prevención, un tratamiento más específico y mejorar así la calidad de vida de estos pacientes.

Teniendo en cuenta el origen de la población cubana, en los pacientes estudiados se buscaron las mutaciones más frecuentes del gen CFTR en España (F508del, G542X, R1162X, R334W y R553X) y en África (3120+1G→A). Como en la mayoría de las poblaciones estudiadas en el mundo, la mutación F508del suele ser la causa predominante de la fibrosis quística presente en los cuadros clínicos severos.

Se logró caracterizar el genotipo del 69 % de los individuos estudiados y el 75 % de los cromosomas fibroquísticos, lo que demuestra la alta heterogeneidad molecular de la enfermedad en la muestra analizada.

Las asociaciones de los alelos del marcador microsatélite IVS17bTA con las mutaciones más frecuentes en la muestra analizada, permite ampliar las posibilidades de diagnóstico. En estudios en poblaciones españolas se ha identificado que el alelo 31 del marcador microsatélite IVS17bTA se asocia con la mutación F508del, y los alelos 46 y 47 a la mutación R334W [12].

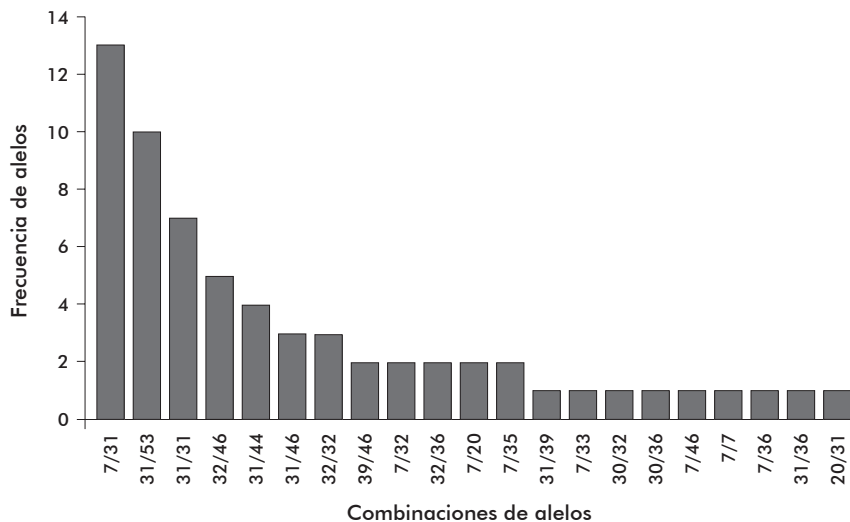


Figura 3. Representación de los alelos del marcador microsatélite IVS17bTA identificados en las 21 familias con fibrosis quística.

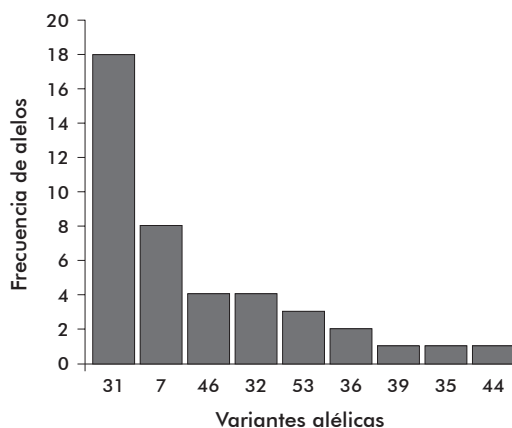


Figura 4. Representación de la distribución de los alelos del marcador microsatélite IVS17bTA en 22 pacientes cubanos, procedentes de 21 familias con fibrosis quística.

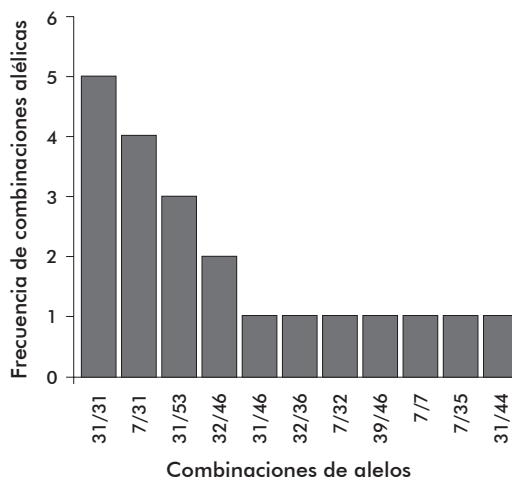


Figura 5. Representación de las combinaciones alélicas del marcador microsatélite IVS17bTA identificadas en 22 pacientes cubanos, procedentes de 21 familias con fibrosis quística.

También en los países cercanos al Mediterráneo y en las Islas Británicas la mutación F508del se asocia con el alelo 31 del marcador en estudio [10].

Este es el primer estudio en Cuba en el que se estandarizaron las condiciones de PCR y electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida para el marcador microsatélite IVS17bTA. Con la identificación de los alelos del marcador microsatélite y su alta heterocigosidad en los 64 individuos analizados, se obtuvo un 85.7 % de familias informativas para los alelos del marcador. Ello evidencia la gran informatividad del marcador microsatélite IVS17bTA, descrito como el más informativo de los tres marcadores microsatélites ubicados en el gen CFTR. La figura 6 muestra una familia informativa para el marcador y un ejemplo de diagnóstico prenatal.

Una familia es completamente informativa cuando los padres son heterocigóticos para los alelos de ese marcador, ya que en cada padre así se puede determinar qué alelo se segrega con la enfermedad, y estudiar el ligamiento. Este estudio se puede hacer solo si en la familia existe al menos un miembro afectado. Los alelos que se segregan con la enfermedad son el alelo 31 del marcador presente en la madre y el alelo 53 del marcador presente en el padre. Con anterioridad se conoce (por el antecedente familiar) que los

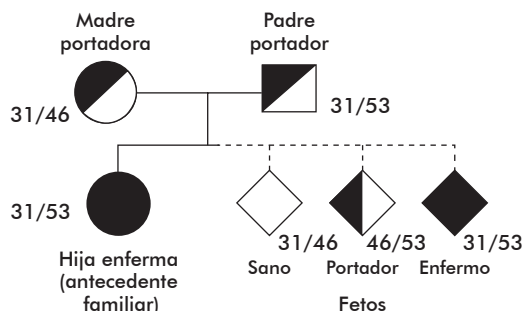


Figura 6. Familia informativa para los alelos del marcador microsatélite. Las fracciones corresponden a las variantes alélicas para el microsatélite según las posibles combinaciones de los alelos parentales, predictivas en la pesquisa prenatal.

alelos asociados a la enfermedad son el 31/53. De esta manera se puede llegar al diagnóstico prenatal y a los posibles resultados (Figura 6).

En resumen, el microsatélite IVS17bTA es un excelente marcador genético para el estudio de ligamientos en las familias con FQ, para la detección de portadores y para el diagnóstico prenatal. Con la implementación de su estudio se amplían las posibilidades de diagnóstico molecular en las familias cubanas.

Recibido en octubre de 2012.

Aprobado en mayo de 2013.

Characterization of the IVS17bTA microsatellite marker and six CFTR gene mutations in 21 Cuban families with cystic fibrosis

Laura González, ✉ Teresa Collazo, Yulia Clark, Manuel Gómez, Lidice Reyes

Laboratorio de Biología Molecular, Centro Nacional de Genética Médica, CNGM
Ave. 31 Esq. 146 No. 3102, Reparto Cubanacán, Playa, CP 11400, La Habana, Cuba
✉ tcollazo@infomed.sld.cu

ABSTRACT

Cystic fibrosis is an autosomal recessive disease. Its incidence in Cuba is 1 in 5000 live births. The molecular cause underlying this disease is related to mutations in the regulatory gene encoding the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR). In this study, the techniques for the study of IVS17bTA microsatellite marker were standardized, and the most frequent mutations in the CFTR gene were also detected for 21 Cuban families. Polymerase chain reaction, agarose and polyacrylamide (plus silver staining) gel electrophoresis techniques were used for both, identification of mutations and microsatellite standardization. Among the 22 Cuban patients, seven were found homozygous, four compound heterozygous and 11 with a single mutation so, 33 chromosomes were molecularly characterized for the 75 %. Twelve allelic variants were found for the IVS17bTA microsatellite; alleles 31 and 7 the most frequent ones. Alleles 31 and 46 were associated to the F508del and R334W mutations, respectively. Among the 21 families, 18 were completely informative for the IVS17bTA microsatellite marker, accounting for 85.7 %. This study helped to complete the diagnosis in those patients in which the responsible mutations in one or both chromosomes had not yet been identified. Besides, we were also able to identify mutations associated with different alleles of the marker without gene sequencing, also helping to decrease the cost of screening.

Keywords: IVS17bTA microsatellite marker, cystic fibrosis, polymerase chain reaction

Biotecnología Aplicada 2013;30:262-266

RESUMEN

Caracterización del marcador microsatélite IVS17bTA y seis mutaciones del gen CFTR en 21 familias cubanas con fibrosis quística. La fibrosis quística es una enfermedad autosómica recesiva. Su incidencia en Cuba es de 1 de cada 5000 recién nacidos vivos. La causa molecular que provoca esta enfermedad son las mutaciones en el gen regulador transmembranar de la fibrosis quística (CFTR). En este estudio se detectaron las mutaciones más frecuentes en 21 familias cubanas y se estandarizaron las técnicas para el estudio del marcador microsatélite IVS17bTA, lo cual constituyó nuestro objetivo principal. Para la identificación de estas mutaciones y la estandarización del microsatélite, se emplearon las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa y electroforesis en geles de agarosa y poliácridamida (tinción con plata). De los 22 pacientes, se encontraron 7 homocigóticos, 4 heterocigóticos compuestos y 11 con una sola mutación, por lo que se caracterizaron molecularmente 33 cromosomas, lo que representa el 75 %. En el estudio del microsatélite IVS17bTA se encontraron 12 variantes alélicas, los alelos más frecuentes fueron el 31 y el 7. El alelo asociado a la mutación F508del fue el 31 y a la mutación R334W fue el 46. De las 21 familias analizadas, 18 resultaron completamente informativas para el marcador, lo que representa el 85.7 %. Este estudio ha ayudado a completar aún más el diagnóstico en los pacientes en los que aún no se han identificado las mutaciones responsables en ambos cromosomas o en uno de ellos. Además se han podido identificar mutaciones asociadas a diferentes alelos del marcador, sin necesidad de secuenciar el gen, lo que aumentaría el costo.

Palabras clave: marcador microsatélite IVS17bTA, fibrosis quística, reacción en cadena de la polimerasa

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is one of the most common genetic diseases in Caucasian populations, becoming a worldwide health problem. Cuba has reported an incidence of approximately one per 5000 live births [1]. This multisystemic disease is clinically characterized by pancreatic insufficiency, progressive lung disease and high concentration of electrolytes in sweat. CF patients suffer from physical and psychological limitations. The clinical treatment to overcome this disease is often lengthy and costly, because of the required antibiotics and pancreatic enzyme replacement, proper nutrition and long-term hospitalization.

The inheritance pattern of CF is autosomal recessive, caused by mutations in the Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) gene, which is located

on chromosome 7 region 7q31. This gene of approximately 250 kDa contains 27 exons encoding for a 1480 amino acids protein with a molecular weight of approximately 170 kDa. [2]. More than 1800 mutations in the CFTR gene have been detected [3].

In Cuba, CF diagnosis is done based on the patient's clinical picture, joined to the positive result of electrolytes test in sweat. Besides, six mutations are detected frequently in our country [4, 5]: F508del (37.9 %), G542X (6.9 %), R334W (5.2 %), R553X (2.2 %), R1162X (2.0 %) and 3120+1G→A (1.3 %). However, the coverage of the affected chromosome reaches only 55 % with the detection of these six mutations. Therefore, a broader range of diagnostic, molecular markers like IVS17bTA, IVS8CA and IVS17bCA microsatellites are required.

1. Collazo T, Piloto Y, Clark Y, Boffil AM, Gómez M, Hernández Y. Detección de mutaciones en pacientes cubanos con fibrosis quística. *Biotechnol Apl.* 2008;25(4): 345-9.

2. Scriver CR, Beaudet AL, Sly GW, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*. 7th ed. Vol. 3. New York; Mc Graw-Hill; 1995.

3. Cystic Fibrosis Mutation Database (CFMDB) [Internet]. Ontario: Cystic Fibrosis Consortium. c2011 [cited 2013 Aug 9]; Available from: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>

4. Collazo T, Boffil AM, Clark Y, Hernandez Y, Gomez M, Rodriguez F, et al. Common mutations in Cuban cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* 2009;8(1):47-9.

Microsatellites are DNA sequences containing variable mononucleotide, dinucleotide (TG) or trinucleotide (CAA)_n repeats, with alleles constituted by different numbers of units [6]. They are used to screen and characterize mutations, in gene evolutionary studies and indirect disease diagnosis [7].

CFTR microsatellites are located in intronic regions (Figure 1). Particularly, the IVS17bTA microsatellite is located in intron CFTR 17b, of which 30 alleles have been identified bearing 7 to 56 TA repeat units [8]. The most common alleles bear 7, 30 and 31 dinucleotide units, for 0.22, 0.19 and 0.12 frequencies, respectively, among non-fibrocystic chromosomes [9]. This microsatellite is highly heterozygous and allows reaching information close to 99 % when combined with the most common mutations, according to studies in Caucasian populations [8].

IVS17bTA is globally reported as the most informative among the three microsatellite markers mentioned, due to a high number of alleles. For this reason, our work was based on standardization and the analysis of this particular microsatellite in Cuban fibrocystic patients.

Materials and methods

Study subjects

Sixty-four individuals from 21 families were studied, 22 suffering from CF. Diagnoses were made according to patients' clinical features and the sweat electrolyte test results. The patients were diagnosed by the National Cystic Fibrosis Cuban Commission (Cuban Ministry of Health, MINSAP).

Mutations F508del, G542X, R1162X, R553X, 3120+1G→A and R334W were evaluated in all the individuals.

DNA extraction

DNA was obtained from a 10-mL peripheral blood sample using 56 mg/mL ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as anticoagulant. DNA extraction was carried out by the salting-out method described by Miller *et al.* in 1988 [10]. Once the DNA was isolated, samples were coded and stored until further use.

Detection of mutations

F508del, G542X and R1162X mutations were detected by the amplification refractory mutation specific (ARMS) method described by Newton *et al.* [11]. Each reaction contained: 100 ng of DNA, 1 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA), 0.85 pmol/L of each primer (Biosource, USA), 0.1 mM dNTP, 1.0 mM MgCl₂ in a final volume of 25 µL. In all cases, internal amplification controls were also used. The amplification reaction was carried out according to the following steps: denaturing at 94 °C for 5 min and thereafter *Taq* DNA polymerase (Promega, USA) was added, followed by 29 cycles of denaturing at 94 °C for 1 min, annealing at 60 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 90 s, followed by a final extension cycle at 72 °C for 5 min. The DNA fragments obtained were run at 250 V for 25 min in a 2 % agarose gel containing ethidium bromide and visualized on a UV light transilluminator.

Mutations 3120+1G→A, R553X and R334W, were detected by polymerase chain reaction (PCR), followed

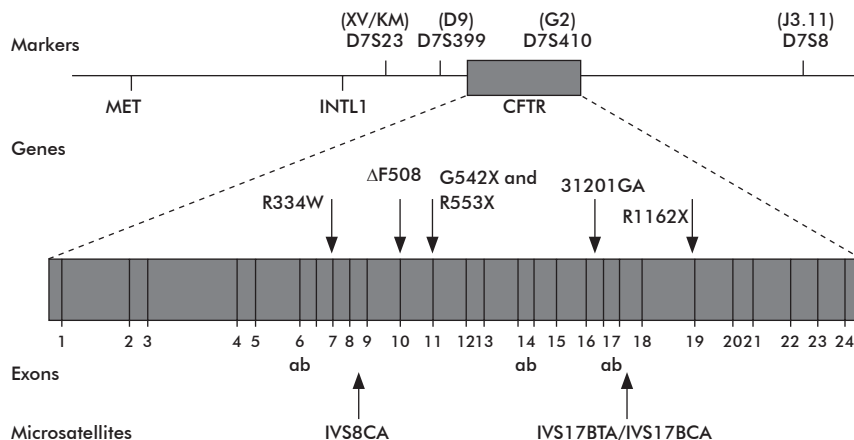


Figure 1. Cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene representation. Shown are the positions of the relevant common mutations and microsatellite markers.

by enzyme restriction analysis specific for each mutation and agarose gel electrophoresis.

To detect 3120+1G→A, the following conditions were established per reaction: 100 ng DNA, 1 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA), each primer at 6.5 pmol/µL (Biosource, USA), 0.1 mM dNTP, 2.5 mM MgCl₂ in a final reaction volume of 25 µL. The amplification reaction consisted of denaturing at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturing at 94 °C for 1 min, annealing at 57 °C for 1 min, extension at 67 °C for 1 min; and a final extension cycle at 67 °C for 5 min. The amplified product was further digested with 20 U of *Bst*NI (Bio Labs, USA) per sample in a final volume of 35 µL, at 60 °C for 4 h.

The R334W mutation was analyzed under the following conditions per reaction: 100 ng DNA, 1 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA), 6.5 pmol/µL (Biosource, USA) for each primer, 0.1 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, in a reaction volume of 25 µL. The amplification reaction consisted of denaturing for 3 min, followed by 35 cycles of repetitions consisting of 20 s of denaturing at 94 °C, annealing at 55 °C for 30 s, extension at 74 °C for 30 s and a final extension cycle at 74 °C for 5 min. The amplified product was digested with 25 U of the restriction enzyme *Hpa*II (Promega, USA) in a final volume of 35 µL, at 37 °C for 3 h.

The digested amplification products for the 3120+1G→A and R334W mutations were electrophoresed in 2 % agarose gels containing ethidium bromide and bands were visualized under UV light.

In the case of the R553X mutation, amplification reaction conditions were: 100 ng DNA, 1 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA), each primer at 6.5 pmol/µL (Biosource, USA), 0.1 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂ in a final volume of 25 µL. The reaction mixtures were denatured at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturing at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, extension at 72 °C for 1 min, and a final extension cycle at 72 °C for 5 min. The amplified product was digested with 25 U of *Hinc*II (Bio Labs, USA) to a final volume of 35 µL, at 37 °C for 3 h. The digested product was subsequently run on a 3 % agarose gel and visualized on a UV light transilluminator.

5. Collazo T, López I, González L, Clark Y, Píloto Y, Gómez M, et al. Estudio molecular de la fibrosis quística en Cuba. In: Memorias Convención Internacional de Salud Pública. Cuba Salud 2012. La Habana 3-7 de diciembre de 2012, Cuba. La Habana: Ministerio de Salud Pública; 2002.

6. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet.* 1989;44(3):388-96.

7. Estivill X, Morral N, Casals T, Nunes V. Prenatal diagnosis of cystic fibrosis by multiplex PCR of mutation and microsatellite alleles. *Lancet.* 1991;338(8764):458.

8. Visich AA, Barreiro CZ, Chertkoff LP. Caracterización de tres microsatélites del gen de fibrosis quística en familias argentinas. *Medicina (Buenos Aires).* 2001; 61(1):23-7.

9. Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z, Riordan JR, et al. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics.* 1991;10(1): 214-28.

10. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215-8.

11. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 1989;17(7):2503-16.

Microsatellite marker analysis

The microsatellite IVS17bTA was amplified by PCR under the following conditions per reaction: 100 ng DNA, 1 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA), 5 pmol/L of each primer (Biosource, USA), 0.1 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂ in a final volume of 25 µL. The amplification reaction was carried out by an initial denaturing step at 94 °C for 4 min, followed by 30 cycles with the following steps: denaturing at 94 °C for 30 s, annealing at 50 °C for 30 s, extension at 72 °C for 30 s; and a final cycle of extension at 72 °C for 7 min. PCR primer sequences are shown in table 1. Amplification products were verified by electrophoresis in a 2 % agarose gel, with bands ranging 202-294 bp, according to the obtained allelic variants.

The products were further subjected to 12.5 % polyacrylamide gel electrophoresis, with a migration time from 4 to 5 h at 150 V and a temperature of 15 °C. Subsequently, DNA was visualized through gel silver staining with the PlusOne DNA Silver Staining Kit (Amersham Biosciences, USA, 2002) according to manufacturers' instructions.

Results

Among the 64 tested people, 22 were suffering from CF and 42 were carriers. From these last, only 33 carried the identified mutations.

In 11 patients two mutated alleles were present, with the other 11 carrying only one mutated allele. In total, heterozygous, homozygous and heterozygous compound alleles were carried by 55 people.

Table 2 shows the results of detected mutations in the 21 families under study. Mutations R1162X, R553X and 3120+1G→A were not present in the analyzed families.

Among the 22 studied patients, seven were homozygous (six with F508del and one with G542X), four were compound heterozygous (two with F508del/R334W, one with F508del/G542X and one with G542X/R334W) and 11 carried a single mutation (F508del or R334W), accounting for 33 molecularly characterized chromosomes (75 %). Figure 2 shows the frequencies of the IVS17bTA marker alleles identified in the 64 individuals; 12 out of the 30 allelic variants described in other Caucasian populations were found [8].

The most frequent alleles in descending order in the 64 studied individuals were 31, 7, 46, 32 and 53. The less frequent ones were 33, 35, 20 and 30.

The IVS17bTA microsatellite marker frequencies for the allelic combinations identified in the study are shown in figure 3. The most common allelic combinations in descending order were: 7/31, 31/53, 31/31 and 32/46. It was found that the IVS17bTA microsatellite marker allele 31 is the most common in the Cuban population, as in Spain and other Caucasian populations [12]. These data are taken as reference because of the genetic background contribution of the Spanish population to the Cuban genome.

Figure 4 shows the frequency of the IVS17bTA microsatellite marker alleles found in the 22 CF patients; the most frequent in descending order were 31, 7, 46, 32, and 53. The less frequent ones were 35, 39 and 44.

Similar to European populations [12], it was observed that the IVS17bTA microsatellite marker alleles 31 and 32 were the most common in the Cuban

Table 1. Oligonucleotide sequence of microsatellite IVS17bTA primers used for polymerase chain reaction

Primer	Sequences (5'-3')	Hybridation temperature (°C)
AT17D1.2	GAC AAT CTG TGT GCA TCG	54
AT17R1.2	GCT GCA TTC TAT AGG TTA TC	56

Table 2. Genotype distribution of mutations F508del, G542X, R1162X and R334W in the 64 studied cases, corresponding to 21 Cuban families

Mutation	Homozygous	Heterozygous
F508del	6	35
G542X	1	7
R334W	-	10

CF patients.

The allelic combinations of the IVS17bTA microsatellite marker identified in the 22 CF patients are shown in figure 5, the most common: 31/31, 7/31,

12. Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Gimenez J, et al. The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat Genet.* 1994;7(2):169-75.

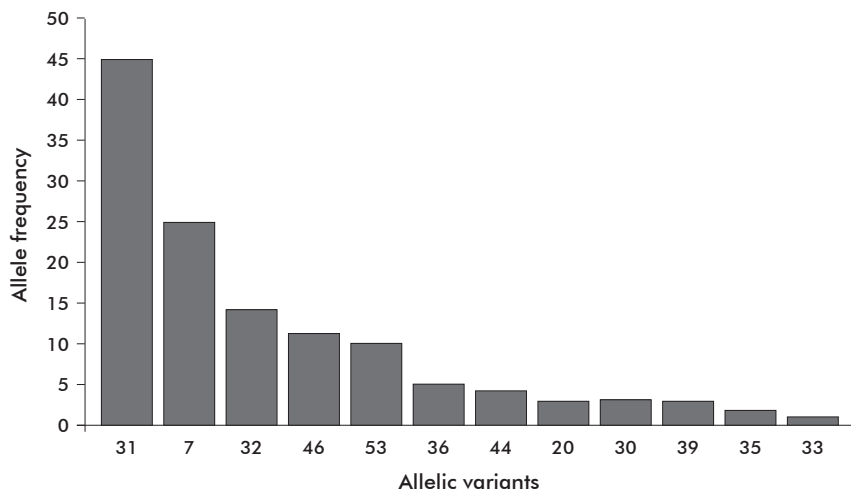


Figure 2. Frequency of allelic variants for the IVS17bTA microsatellite marker alleles identified in the 21 Cuban cystic fibrosis families studied.

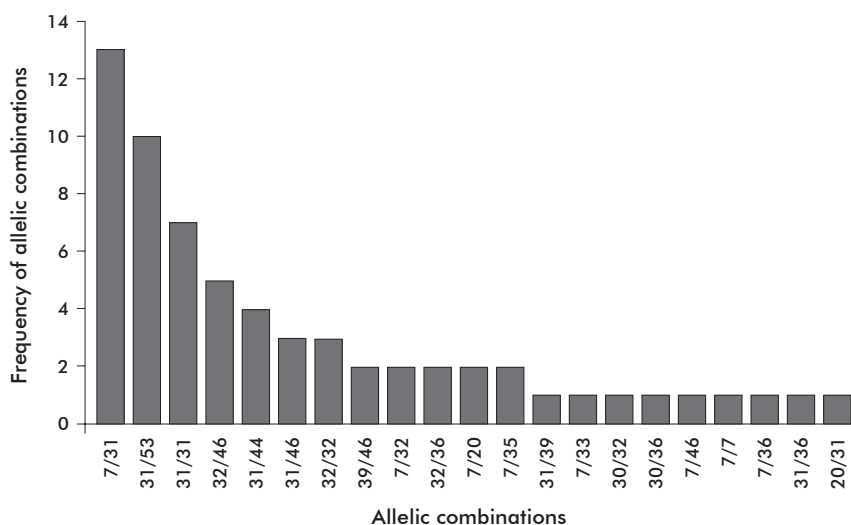


Figure 3. Representation of microsatellite IVS17bTA marker allelic combinations identified in 21 Cuban cystic fibrosis families.

31/53 and 32/46. Conversely, the less frequent combinations were 31/46, 32/36, 7/32, 39/46, 7/7, 7/35 and 31/44.

An association analysis of identified CFTR mutations and the IVS17bTA microsatellite allele marker showed that allele 31 was associated to mutation F508del, as found in 34 individuals. For the G542X mutation, there were six individuals carrying it together with IVS17bTA allele 32. These results are in agreement with those reported worldwide and open the search for these mutations in the Cuban population.

In addition, we studied the heterozygosity of the IVS17bTA microsatellite marker in the 64 individuals. There were 55 heterozygous and 9 homozygous individuals for the marker alleles, for 85.93 % heterozygosity. This pointed out this microsatellite as highly informative. The informativeness analysis performed in the 21 families found that 18 (85.7 %) were completely informative and only three semi-informative.

Discussion

The use of genetic markers is an alternative to detect the transmission of mutated alleles in population groups, despite the knowledge on point mutations responsible for the disease. The discovery of the polymorphic markers aim of the present study, closely linked to the CFTR gene within the affected gene, is a major breakthrough to provide indirectly prenatal and carriers CF diagnosis. Additionally, presymptomatic screenings can be run in newborns, providing the opportunity to implement prevention, to apply a more specific treatment and to improve the quality of life of these patients.

Considering the origin of the Cuban population, the most common mutations reported for the CFTR gene in Spain (F508del, G542X, R1162X, R334W and R553X) and Africa (3120+1G→A) were searched in Cuban patients. As in most populations around the world, the F508del mutation was found as the predominant cause for CF in patients showing severe clinical symptoms.

Sixty-nine percentage of the subjects and seventy-five percentage of CF chromosomes were genotyped, demonstrating a high molecular heterogeneity of the disease in the analyzed sample.

The knowledge on the association of the IVS17bTA microsatellite marker alleles to the most frequent CFTR mutations can extend the diagnostic possibilities. Studies carried out in the Spanish population showed that allele 31 of this microsatellite marker is associated with F508del mutation, and alleles 46 and 47 with R334W [12]. Also in other countries near the Mediterranean and the British Isles, the F508del mutation appears associated with allele 31 of the same microsatellite marker [10].

Noteworthy, this is the first study in Cuba standardizing PCR, and agarose or polyacrylamide gels electrophoresis conditions for the VS17bTA microsatellite marker. With the identification of VS17bTA alleles and its high heterozygosity in the 64 individuals tested, 85.7 % families were informative. This result highlights the informativeness of IVS17bTA, described as the most informative of the three micro-

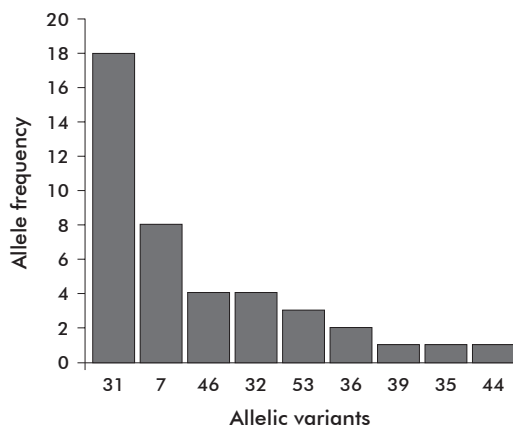


Figure 4. Distribution of IVS17bTA microsatellite marker alleles in the 22 cystic fibrosis patients from 21 Cuban families.

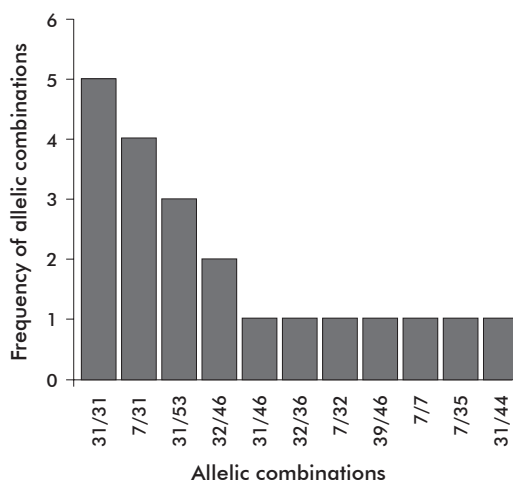


Figure 5. Representation of allelic combinations of IVS17bTA microsatellite marker identified in 22 cystic fibrosis patients from 21 Cuban families.

satellite markers located in the CFTR gene. Figure 6 shows a family regarded as informative for the marker and an example of prenatal diagnosis.

A family is fully informative when parents are heterozygous for those marker alleles, since in each

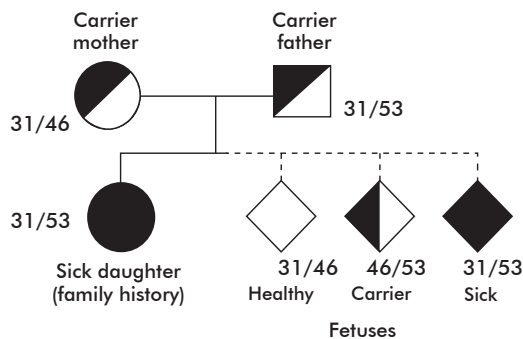


Figure 6. Family information for the IVS17bTA microsatellite marker alleles. Fractions are combinations of the possible allelic variants of parental microsatellite alleles, according to the predictive purpose of fetus analysis by prenatal screening.

parent it is possible to determine which allele segregates with the disease and so, this allows further study of the linkage. This analysis is only relevant if the family has at least one affected member. In the example, the marker alleles that segregate with the disease are 31 in the mother and 53 in the father. It was previously known from the family history that alleles 31/53 were associated with the disease. In this way, the prenatal

diagnosis can be established to identify the fixed possible outcomes (Figure 6).

In summary, the IVS17bTA microsatellite marker is an excellent indicator for genetic linkage studies in families with CF, both for carrier detection and prenatal diagnosis. The implementation of IVS17bTA studies widens the molecular diagnostic possibilities in fibrocystic Cuban families.

Received in October, 2012.

Accepted in May, 2013.