

Síndrome de NARP producido por una mutación T→G *de novo* en la posición 8993 del DNA mitocondrial humano *

M^a J. Alcaine¹, A. Solano¹, A. Playán¹, M. A. Vilaseca², M. Martí³, M. J. López-Pérez¹, M. Pineda², J. Montoya¹

Resumen

Se ha realizado el análisis genético molecular del DNA mitocondrial de un niño de 12 años de edad que padece retraso psicomotor, síndrome cerebeloso, con episodios recurrentes de ataxia, neuropatía y retinitis pigmentaria (síndrome de NARP). Se ha encontrado la mutación T8993G, localizada en la subunidad 6 de la ATP sintetasa, en forma heteroplásmica con una proporción de 91% en sangre y del 96% en músculo. No se ha encontrado la mutación en muestras de sangre de la madre, hermanas y abuela materna. Este estudio muestra que la mutación puntual T8993G puede aparecer *de novo*, en proporciones muy elevadas, originando enfermedades evolutivas.

Introducción

El DNA mitocondrial humano (mtDNA) es una molécula circular de 16 569 pares de bases que codifica dos rRNAs, 22 tRNAs y 13 polipéptidos componentes del sistema de fosforilación oxidativa (sistema OXPHOS): siete subunidades de la NADH deshidrogenasa-ubiquinona oxidoreductasa (complejo I); una subunidad (apocitocromo b) de la ubiquinona citocromo c oxidoreductasa (complejo III); tres subunidades (I, II y III) de la citocromo c oxidasa (complejo IV) y dos subunidades (6 y 8) de la ATP sintetasa (complejo V) (1). Este genoma se hereda exclusivamente de la madre por lo que el mtDNA deriva exclusivamente de los oocitos (2). En los últimos años, se han descrito mutaciones puntuales en este DNA que se han asociado a enfermedades humanas tales como MELAS (3), MERRF (4), neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) (5), síndrome de NARP (6), síndrome de Leigh (7, 8), etc. La mayor parte de estas mutaciones aparecen en forma heteroplásmica (presencia de DNA normal y mutado en el mismo individuo), aunque en la LHON suele aparecer en forma homoplásmica. La proporción de mtDNA mutado puede variar en los descendientes de una misma madre y también en los diferentes tejidos de un mismo individuo. Esto es posiblemente debido a que el porcentaje de DNA mutado en los óvulos puede variar grandemente y a la distribución al azar de las mitocondrias entre las células hijas durante la embriogénesis.

El síndrome de NARP (debilidad muscular neurogénica, ata-

Summary

Molecular genetics analysis of the mitochondrial DNA of a male infant 12 years old suffering of the syndrome of neurogenic muscle weakness, ataxia and retinitis pigmentosa (NARP syndrome) has been carried out. The mutation T8993G, localized in the subunit 6 of the mitochondrial ATP synthase, was identified in heteroplasmic form with a proportion of 91 and 96% in blood and muscle, respectively. No mutated mitochondrial DNA was detected in blood of the proband's mother, sisters and maternal grandmother. This study shows that the point mutation T8993G may occur *de novo*, at high levels, causing neurodegenerative diseases.

xia y retinitis pigmentaria) se ha asociado a una mutación T8993G en gen del mtDNA que codifica la subunidad 6 de la ATP sintetasa (6) que cambia una leucina por una arginina en el codon 156. Este cambio de aminoácido puede dañar la producción de ATP mediante la alteración de la carga eléctrica del canal del complejo de la ATP sintetasa (9). Esta mutación se ha asociado también al síndrome de Leigh de herencia materna. En general, la enfermedad se manifiesta como síndrome de NARP cuando el porcentaje de moléculas de mtDNA mutadas presente en el paciente varía entre 60 y 90%. En el caso del síndrome de Leigh este porcentaje suele superar el 95% (10). Estudios familiares muestran que esta mutación segrega muy rápidamente hacia la homoplasmia dentro del mismo pedigrée (11).

El objetivo de este estudio es el análisis genético molecular del mtDNA de un paciente con el síndrome de NARP. Asimismo, se ha realizado la búsqueda de mutaciones en los familiares relacionados por vía materna.

Material y métodos

Pacientes

El paciente es un niño español de 12 años de edad nacido a término de un embarazo normal, de padres sanos no consanguíneos. Tiene dos hermanas sanas de 18 y 6 años. Presentó retraso psicomotor desde los primeros años de vida. A los 7 años fue hospitalizado por brote de ataxia aguda, somnolencia y cefaleas. Desde entonces estos brotes fueron recurrentes cada 4/6 meses. A los 12 años se evidenció una polineuropatía, atrofia cerebelosa en la resonancia magnética nuclear y retinitis pigmentosa con ERNG abolido. Las concentraciones de lactato y alanina estaban elevadas. La biopsia muscular mostró agregados subsarcoplásmicos y la microscopía electrónica anomalías de las crestas mitocondriales. La actividad de las enzimas del metabolismo energético en biopsia de músculo congelado y fibro-

* Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el XIX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrado en Zaragoza el 24, 25 y 26 de Mayo de 2000.

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Zaragoza.

²Hospital San Juan de Dios, Esplugues, Barcelona.

³Hospital Materno Infantil, Las Palmas de Gran Canaria.

blastos se hallaban dentro de los límites de referencia. No se pudo estudiar el complejo V.

Instrumentos y reactivos

La amplificación del mtDNA se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa en un termociclador Biometra T3 (Biometra, Göttingen, Alemania). Las centrifugaciones se llevaron a cabo en centrífugas Kontron Centrikon H-401 (Kontrol, Zurich, Suiza), microcentrifugas Eppendorf (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Para los análisis electroforéticos se utilizaron cubetas G100 de Pharmacia (Pharmacia, Upsala, Suecia) y para las densitometrías un densitometro LKB Ultrascan XL (Pharmacia).

Los reactivos fueron: RedTaq polimerasa de Sigma (Sigma Chemicals, St. Louis, EEUU); las enzimas de restricción Hpa II y Ava I y agarosa de Gibco BRL (Life Technologies, Paisley, Reino Unido), proteinasa K y SDS, de Merck (Merck, Darmstadt, Alemania); (α - 32 P)-dCTP de Amersham (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido)

Análisis genético-molecular

Las muestras que iban a ser analizadas se obtuvieron como parte de las investigaciones para el diagnóstico de los pacientes y con el consentimiento de estos y de los miembros de su familia. La extracción del DNA de la sangre y músculo se realizó mediante procedimientos estándar con alguna modificación. 5 mL de sangre se diluyeron con 4 volúmenes de Tris-HCl 20 mmol/L (pH = 8), EDTA 5 mmol/L (TE), se incubaron por 15 min en hielo y se centrifugaron a 5 000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 4 volúmenes de TE, repitiendo el proceso hasta que el sedimento tenía un aspecto blanquecino. Finalmente, éste se resuspendió en 2 mL de TE y las células se lisaron mediante adición de SDS hasta 0,4% y proteinasa K (200 mg/L) incubando a 37 °C durante toda la noche o a 55 °C por 3 h. A continuación se añadieron 1/10 del volumen de acetato amónico y se realizó una extracción fenólica con un volumen de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:25:1) (fenol-IAC). La fase acuosa obtenida mediante centrifugación se sometió a una nueva extracción fenólica y a otra con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Por último, el DNA se precipitó mediante la adición de etanol. El ovillo de DNA se recogió con una pipeta pasteur y se transfirió a un tubo eppendorf. Se dejó eliminar el exceso de etanol al aire y finalmente se resuspendió el DNA en 500 μ L de agua.

El DNA total de músculo se aisló de aproximadamente 0,1 g de tejido, conservado a -70 °C. Para ello, el músculo se colocó en un mortero que contenía nitrógeno líquido y se pulverizó. El polvo obtenido se transfirió a un tubo eppendorf, se resuspendió en 0,5 mL de Tris-HCl 10 mmol/L (pH = 7,4), NaCl 10 mmol/L, EDTA 25 mmol/L y se lisó mediante la adición de SDS al 1% y 40 mg/L de proteinasa K. Posteriormente se procedió a la extracción del DNA como se ha indicado más arriba.

Para detectar la mutación puntual T8993G en el mtDNA, se amplificó un fragmento de DNA de 365 pares de bases (pb), que contenía el punto de la mutación, utilizando los oligonucleótidos iniciadores que corresponden a las posiciones del mtDNA (5'-3') 8822-8841 y 9187-9168, de acuerdo con la secuencia de Cambridge (12) con un total de 30 ciclos de desnaturación (95 °C x 1min), de hibridación (56 °C x 1,5 min) y de elongación (72 °C x 2,5 min). El marcaje del producto de amplificación se realizó añadiendo en el último ciclo de amplificación (α - 32 P)-dCTP para evitar la presencia de heteroduplex. 10 μ L del producto de amplificación de 356 pb se digirieron con la enzima de restricción Hpa II y los productos obtenidos se analizaron por electroforesis en geles horizontales de agarosa al 2% conteniendo bromuro de etidio. Como la mu-

tación en la posición 8993 crea un sitio de reconocimiento para la enzima Hpa II, la banda de 365 pb se corta en dos fragmentos de 194 y 171 pb que son fácilmente distinguibles en la electroforesis. Para confirmar la mutación T \rightarrow G y distinguirla de la T \rightarrow C que también se ha encontrado en la posición 8993, se realizó una digestión del fragmento amplificado con la enzima de restricción Ava I que corta en el primer caso pero no en el segundo. El porcentaje de la mutación se determinó utilizando un densitómetro láser.

Resultados

La figura 1 muestra el resultado obtenido al digerir el fragmento de amplificación por PCR con la enzima de restricción Hpa II. Como se puede apreciar, el paciente (III-2 en el pedigrí) es heteroplásmico para la mutación T8993G, lo que se deduce de la presencia de 3 bandas de electroforesis, dos correspondientes a los productos de digestión de 194 y 171 pb originados al estar presente la mutación y una tercera de 365 pb que representa el producto de amplificación sin cortar. El cambio T \rightarrow G de esta mutación se comprobó por digestión del mismo fragmento de amplificación con la enzima de restricción Ava I (no mostrado). La mutación está presente en un alto porcentaje tanto en sangre (91%) como en músculo (96%). Sin embargo, ninguno de los familiares estudiados (hermanas, madre y abuela), relacionados por vía materna, presentan la mutación en la muestra de sangre utilizada para el análisis.

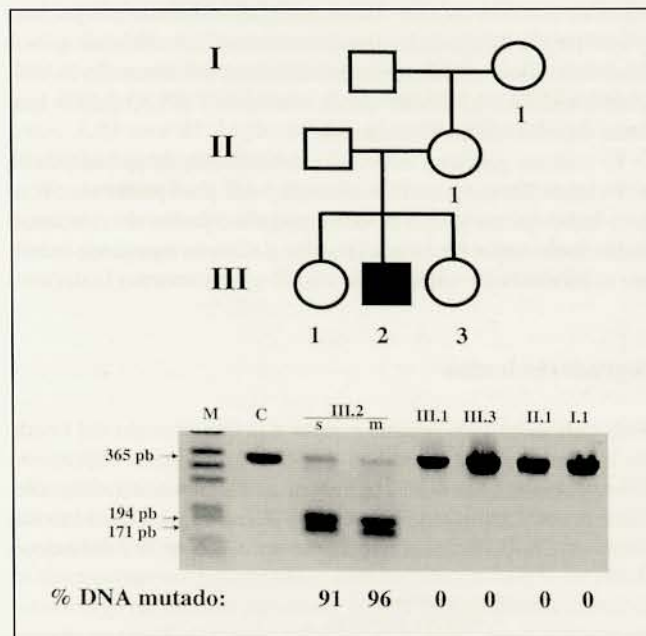


Figura 1. Pedigrí de la familia del paciente con la mutación T8993G y autorradiografía de los fragmentos obtenidos al digerir con Hpa II los productos de amplificación del mtDNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El símbolo en negro en el pedigrí indica el individuo afectado. Las muestras de DNA de cada miembro de la familia estudiada están señaladas de acuerdo con la nomenclatura del pedigrí. La banda superior de 365 pb corresponde al fragmento obtenido a partir del mtDNA normal y las bandas de 194 y 171 pb son los fragmentos que se generan al cortar el mtDNA mutado con Hpa II. La cuantificación se realizó por densitometría de la fotografía. El porcentaje de mtDNA mutado, media de tres reacciones diferentes, se muestra debajo de cada calle de la electroforesis. Las muestras de DNA se extrajeron de sangre (s) y cuando no se indica nada y de músculo (m). C= control.

Discusión

Hemos encontrado la mutación T8993G descrita por Holt et al (6) en un paciente de 12 años de edad, con los síntomas característicos de síndrome de NARP, perteneciente a una familia

que carece de la mutación en todos los miembros de tres generaciones relacionados por vía materna. La explicación más plausible de este hecho, es la aparición *de novo* de la mutación en el individuo afectado. Una evidencia adicional de que la madre no tiene la mutación proviene del hecho de que también está ausente en dos hijas (III-1 y III-3). La aparición en forma espontánea de la mutación en el caso índice es parecida a varios casos de síndrome de Leigh, en los que solamente un miembro de la familia posee el mtDNA mutado (11, 13, 14). Sin embargo, es la primera vez que se describe en relación con el síndrome de NARP. El hecho de que la mutación esté presente en el paciente pero no en su madre, hermanas y abuela materna puede ser debido a que ésta se ha producido de forma espontánea en el mtDNA de los óvulos de la madre del probando, aunque no en todos puesto que tiene dos hijas normales. Por tanto, es muy posible que en el ovario de la madre haya un mosaicismo para la mutación T8993G como ha sido demostrado anteriormente en una madre asintomática con hijos que presentaban una heteroplasmia de esta mutación (15). No sabemos en qué momento ha aparecido la mutación pero es posible que haya sido durante la oogénesis, antes de la expansión mitocondrial en el oocito cuando se ha llegado a una dilución del mtDNA hasta una copia por mitocondria y que uno de estos orgánulos con una copia mutada haya sobrevivido.

El alto porcentaje de la mutación presente en el paciente (91 y 96% en sangre y músculo, respectivamente) recuerda más a los observados en el síndrome de Leigh ya que, normalmente, la mutación T8993G asociada al síndrome de NARP suele estar por debajo del 90%. El síndrome de Leigh se manifiesta en el primer año de vida, por lo que puede ser probable que los niveles de mtDNA mutado fuesen más bajos durante ese periodo y que hayan aumentado drásticamente en los años sucesivos manifestándose consiguientemente como síndrome de NARP. Este estudio ha mostrado que la mutación T8993G puede aparecer *de novo* en niveles muy altos.

El análisis genético molecular del mtDNA de pacientes con enfermedades mitocondriales es muy útil para poder clasificar este heterogéneo grupo de enfermedades, pudiendo relacionar mutaciones específicas con fenotipos clínicos concretos y definir el modo de herencia.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del Fondo de Investigaciones Sanitarias (98-0049-01) y de la Diputación General de Aragón (P032/2000). Expresamos nuestro agradecimiento a Santiago Morales por su ayuda técnica en el laboratorio. Abelardo Solano es becario del CONACYT (México).

Correspondencia
J. Montoya Villarroja
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular
Universidad de Zaragoza
Miguel Servet, 177
50013 Zaragoza
E-mail: jmontoya@posta.unizar.es

Bibliografía

1. Chomyn A, Mariottini P, Cleeter MWJ, Ragan CI, Doolittle RF, Matsuno-Yagi A, et al. Functional assignment of the products of the unidentified reading frames of human mitochondrial DNA. En: Quagliariello E, Slater E C, Plamieri F, Saccone C and Kroon A M, eds. *Achievements and Perspectives of Mitochondrial Research*. Amsterdam: Elsevier Sciences; 1985. p. 259-75.
2. Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci* 1980; 77: 6715-9.
3. Goto Y-i, Nonaka I and Horai S. A mutation in the tRNA^{Leu} (UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 1990; 348: 651-3.
4. Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA^{Leu} mutation. *Cell* 1990; 61: 931-7.
5. Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AMS, et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988; 242: 1427-30.
6. Holt IJ, Harding AE, Petty RKH, Morgan-Hughes JA. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 428-33.
7. Santorelli FM, Shanske S, Macaya A, Devivo DC, Dimauro S. The Mutation at Nt 8993 of Mitochondrial DNA Is a Common Cause of Leighs Syndrome. *Ann Neurol* 1993; 34: 827-34.
8. Tatuch Y, Robinson BH. The Mitochondrial DNA Mutation at 8993 Associated with NARP Slows the Rate of ATP Synthesis in Isolated Lymphoblast Mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192: 124-8.
9. VazquezMemije ME, Shanske S, Santorelli FM, KranzEble P, DeVivo DC, DiMauro S. Comparative biochemical studies of ATPases in cells from patients with the T8993G or T8993C mitochondrial DNA mutations. *J Inher Metab Dis* 1998; 21: 829-36.
10. Tatuch Y, Pagon RA, Vlcek B, Roberts R, Korson M, Robinson BH. The 8993 mtDNA mutation: heteroplasmy and clinical presentation in three families. *Eur J Hum Genet* 1994; 2: 35-43.
11. Tulinius MH, Houshmand M, Larsson NG, Holme E, Oldfors A, Holmberg E, et al. De novo mutation in the mitochondrial ATP synthase subunit 6 gene (T8993G) with rapid segregation resulting in Leigh syndrome in the offspring. *Hum Genet* 1995; 96: 290-4.
12. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de-Brujin MHL, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290: 427-65.
13. Seller A, Kennedy CR, Temple IK, Brown GK. Leigh syndrome resulting from de novo mutation at position 8993 of mitochondrial DNA. *J Inher Metab Dis* 1997; 20: 102-3.
14. Takahashi S, Makita Y, Oki J, Miyamoto A, Yanagawa J, Naito E, et al. De novo mtDNA nt 8993 (T->G) mutation resulting in Leigh syndrome. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 717-9.
15. Blok RB, Gook DA, Thorburn DR, Dahl HHM. Skewed segregation of the mtDNA nt 8993 (T->G) mutation in human oocytes. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1495-501.