

Diagnóstico del déficit de Acil-CoA deshidrogenasa de cadena media mediante la reacción en cadena por la polimerasa en tiempo real*

L.M. Real¹, A.J. Gayoso², M. Olivera², A. Caruz², A.L. Delgado², L.M. Jiménez², A. Ruiz¹, F. Gayoso³

Resumen

El déficit de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD) es la alteración congénita de la oxidación de los ácidos grasos más frecuente en humanos. La presencia en homocigosis de la mutación nt c.985A→G en el gen MCAD, que tiene como resultado la sustitución de una lisina por un ácido glutámico en el residuo 329 de la enzima (K329E), es la responsable de este déficit en más del 81% de los casos.

Las tecnologías basadas en la reacción en cadena por la polimerasa (PCR) para la detección de esta mutación implican múltiples pasos y un gasto de tiempo considerable.

En este trabajo presentamos un método nuevo de detección basado en la tecnología de la PCR en tiempo real acoplada a transferencia de energía resonante (FRET), para detectar la mutación nt c.985A→G en el gen MCAD.

Con este método se analizaron 18 individuos con sospecha de déficit de MCAD por magnitudes bioquímicas y clínicas, y 25 controles sanos. Los resultados obtenidos fueron confirmados por secuenciación capilar de los productos de PCR.

Concluimos que esta técnica combina la rapidez en el análisis con la reducción a un solo paso en el manejo de las muestras. Por este motivo esta técnica podría ser utilizada para el genotipaje sistemático de recién nacidos en poblaciones de riesgo.

Palabras clave: Déficit de MCAD, PCR en tiempo real, Mutación, Genotipaje, FRET

Summary: Diagnosis of medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency by means of real-time polymerase chain reaction (PCR)

Medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency is the most common hereditary defect of fatty acid oxidation in humans. A single A to G nucleotide transition at position 985 (nt c985 A→G) of the MCAD gene, which results in the substitution of lysine by glutamic acid at residue 329 of the enzyme (K329E), represents more than 81% of alleles causing MCAD deficiency.

PCR-based technologies are now being used widely for the identification of this mutation, however they involve multiple steps and are time-consuming.

In this work we present a new detection method based on real-time PCR amplification coupled to fluorescence resonance energy transfer (FRET) to detect nt c985 A→G mutation of the MCAD gene.

With this method we analyzed 18 individuals, previously diagnosed of MCAD deficiency by biochemical techniques, and 25 healthy controls. The results were consistent with those obtained by direct sequencing of PCR products.

In conclusion, this new method combines simple sample processing and rapid analysis; it therefore affords both high-throughput genotyping and rapid results. These advantages could be applied for neonatal screening of nt c985 A→G mutation in MCAD gene in risk population.

Key words: MCAD deficiency, Real-time PCR, Mutation, Genotyping, FRET

INTRODUCCIÓN

El déficit de Acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD) es la alteración hereditaria del metabolismo de los ácidos grasos más frecuente en humanos (1). Esta deficiencia causa una enfermedad con herencia autosómica recesiva caracterizada clínicamente por episodios de hipoglucemia, encefalopatía, apnea, y muerte súbita en niños. Los pacientes no diagnosticados tienen un riesgo alto de mortalidad que puede prevenirse con un tratamiento simple y efectivo (2).

La transición en un nucleótido (A por G) en la posición 985 (nt c.985A→G) del gen MCAD (Gen Bank M16827), que

tiene como resultado la sustitución de una lisina por un ácido glutámico en el residuo 329 de la enzima (K329E), es la responsable de este déficit en más del 81% de los casos (3). La frecuencia de esta mutación presenta variaciones considerables dependiendo de la localización geográfica. En España, esta frecuencia es similar a la encontrada en otros países del sur de Europa (4), siendo la mayoría de los pacientes diagnosticados de origen gitano (5).

Actualmente se aplican distintas metodologías basadas en la técnica de la reacción en cadena por la polimerasa (PCR) para la identificación de la mutación nt c.985A→G del gen MCAD (6-8). Sin embargo, la mayoría de ellas, aunque ofrecen resultados fiables, requieren tiempos largos de trabajo y varios pasos de manipulación de muestras para su realización.

En este trabajo describimos la aplicación de un nuevo método para la identificación de la mutación nt c.985A→G del gen MCAD, también basado en la reacción en cadena por la polimerasa: la PCR en tiempo real acoplada a transferencia de energía resonante (FRET) y análisis de curvas de desnaturali-

¹ Neocodex. Departamento de Genética Funcional. Sevilla

² Servicio de Bioquímica. Hospital Universitario «Virgen del Rocío». Sevilla

³ Servicio de Bioquímica. Sección de Metabolopatías. Hospital Universitario «Virgen del Rocío». Sevilla

* Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el XX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrado en Cáceres el 3,4 y 5 de octubre de 2001.

zación. Con esta técnica se consigue, por un lado, reducir la manipulación de la muestra a un solo paso, y por otra, reducir el tiempo de análisis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Instrumentación

Los instrumentos utilizados son:

- Termociclador-fluorímetro LighCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).
- Espectrofotómetro Helyos (Spectronic Unicam, Cambridge, Reino Unido).
- Termociclador Biometra T-personal (Whatman Biometra, Goettingen, Alemania).
- Secuenciador automático CEQ 2000XL (Beckman-Coulter, Fullerton, USA).

Reactivos

Los reactivos utilizados son:

- Cebadores y sondas marcadas específicos (detallados en procedimientos).
- Mezcla de *Taq* polimerasa, tampón de reacción, dNTP y $MgCl_2$ comercializado como «DNA-Master hybridization Probes» (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).
- Equipo de reactivos de extracción de DNA; comercializado como «High Pure PCR Template Preparation» (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).
- Solución de parada (1,5 M NaOAc, 50nM EDTA, 4 mg/mL glicógeno).
- Mezcla de enzima para secuenciación, tampón de reacción, dNTP y ddNTP marcados con fluorocromos; comercializada como «DTCS Quick Start Master Mix» (Beckman-Coulter, Fullerton, USA).
- Equipo de reactivos de extracción de DNA desde gel de agarosa; comercializado como «NucleoSpin Extract» (Macherey-Nagel, Düren, Alemania).

Pacientes

En este estudio fueron incluidos 18 pacientes, con sospecha de déficit de MCAD según magnitudes bioquímicas y clínicas, pertenecientes a cuatro familias distintas. Como controles fueron incluidos 25 individuos sanos (50 cromosomas).

Procedimientos

Extracción de DNA

El DNA genómico fue aislado, en cada paciente, a partir de 200 μ L de sangre periférica heparinizada, utilizando el equipo de reactivos de extracción «High Pure PCR Template Preparation» (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El DNA así extraído fue cuantificado mediante espectrofotometría a 260 nm en un espectrofotómetro Helyos (Spectronic Unicam, Cambridge, Reino Unido), distribuido en alícuotas y congelado a -20 °C hasta su utilización.

Reacción de PCR y curvas de desnaturalización

Todas las PCRs fueron realizadas en un LightCycler (Roche Diagnostics). La reacción de PCR, en cada caso, se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ L consistentes en: 1 μ L (30 ng) de DNA genómico; 5 μ L de agua; 3,5 mM de $MgCl_2$; 1 μ L de «DNA-Master hybridization Probes» (Roche Diagnostics),

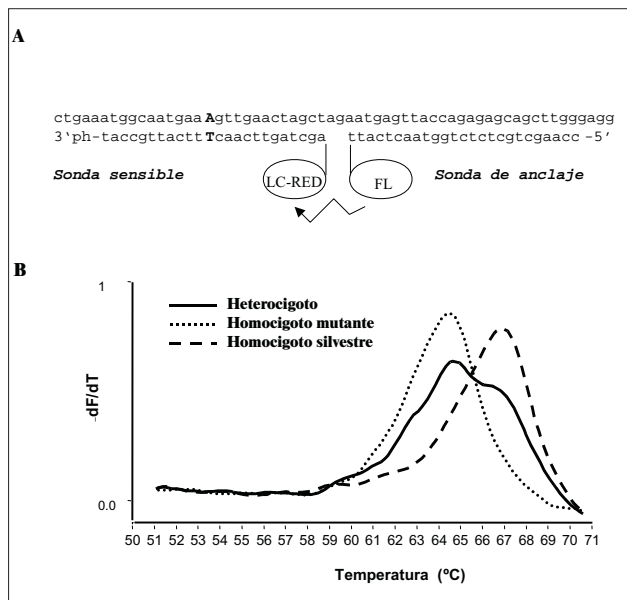


Figura 1 A. Posición relativa de las sondas y transferencia de energía entre los fluoróforos. En negrita se representa el nucleótido c.985. B. Ejemplo de picos de desnaturalización obtenidos e interpretación tras genotipaje por FRET.

0,5 μ M de los cebadores 5'-AGCACCAAGCAATATCATT-TATG-3', y 5'-GCCTCCAAGTATCTGCACAG-3'; y 0.5 μ M de cada una de las sondas FRET (sonda de anclaje 5'-CCAAGCTGCTCTCTGGTAACTCATT-3', marcada en su extremo 3' con fluoresceína, y sonda sensible 5'-AGCTAGTTCAACTTTTCATTGCCAT-3', marcada en su extremo 5' con el fluorocromo LC-Red 640 –Roche Diagnostics- y bloqueada en su extremo 3' con un grupo fosfato). Las posiciones relativas de las sondas en la secuencia a amplificar se representan en la figura 1A. La sonda sensible es complementaria a la secuencia del alelo normal y abarca el nucleótido c.985. Ambas sondas tienen orientación antisentido.

Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial a 95°C durante 1 minuto seguida de 40 ciclos consistentes en desnaturalización a 95°C de forma instantánea (0 s), anillamiento a 59°C durante 20 s, y elongación a 72°C durante 20 s; con una velocidad de cambio de temperatura de 20°C/s. La fluorescencia fue monitorizada al final de cada fase de elongación.

Después de la amplificación, las curvas de desnaturalización fueron generadas inmediatamente, y sin manipulación previa, mediante la desnaturalización instantánea (0 s) del producto de la reacción a 95°C, bajada de temperatura a 50°C (velocidad de cambio 20°C/s), mantenimiento de la muestra a 50°C durante 20 s, y por último calentamiento de la muestra hasta 75°C, con una rampa de temperatura de 0,2°C/s. En esta última fase de calentamiento suave se monitorizó de forma continua la caída de fluorescencia.

En cada tanda de PCR se incluyó una muestra de un individuo heterocigoto para la mutación c.985A→G del gen *MCAD* como control positivo, y una muestra sin DNA como control de contaminación negativo.

Reacciones de Secuenciación

Las reacciones de secuenciación fueron llevadas a cabo sobre los productos de PCR obtenidos en las condiciones anteriormente descritas.

Para la purificación previa a la secuenciación, estos productos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio. La banda de 190 pares de bases (pb) del producto amplificado fue escindida y purificada utilizando el equipo de reactivos «NucleoSpin Extract» (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

La reacción de secuenciación fue llevada a cabo sobre 6,5 ng del producto amplificado purificado utilizando 4 pmol del cebador 5'-GCCTCCAAGTATCTGCACAG-3' en un volumen final de 10 µL, conteniendo, como tampón de reacción, 2 µL de «DTCS Quick Start Master Mix» (Beckman-Coulter, Fullerton, USA). Todas las reacciones fueron realizadas en un termociclador Biometra T-personal (Whatman Biometra, Goettingen, Alemania) en las siguientes condiciones: 2 minutos de desnaturalización a 96°C seguido de 30 ciclos de 96°C durante 20 segundos y 60°C durante 4 minutos.

Una vez finalizados los ciclos de temperatura, al producto de reacción se le añadió 5 µL de solución de parada (1,5 M NaOAc, 50 nM EDTA, 4mg/mL glicógeno) y fue sometido a precipitación con 60 µL de etanol al 95% y centrifugación a 11000 × g a 4°C. El precipitado fue lavado dos veces con 200 µL de etanol al 70% y centrifugación a 11000 × g durante dos minutos en frío, y después dejado secar al aire completamente. Seguidamente, el precipitado fue resuspendido en 20 µL de tampón de carga (Beckman-Coulter) y sometido a electroforesis capilar en un secuenciador automático CEQ 2000XL (Beckman-Coulter)

RESULTADOS

El análisis de las curvas de desnaturalización reveló una temperatura media de fusión de 66,9°C para todos los individuos controles, mientras que los individuos con déficit de MCAD tuvieron una temperatura de fusión de 64,5°C. El control heterocigoto incluido mostró ambas temperaturas de fusión (figura 1B), mientras que en el control de contaminación no se detectó ninguna señal (dato no mostrado). El experimento fue repetido con los mismos pacientes incluyendo una tanda de 13 nuevos controles sanos reproduciéndose los mismos patrones de desnaturalización.

Para validar estos resultados, los productos de PCR de los 18 pacientes con sospecha de déficit de MCAD, y del control heterocigoto utilizado, así como el de los 25 controles sanos, fueron sometidos a secuenciación capilar de DNA. Como resultado los 18 pacientes fueron identificados como homocigotos para el alelo mutante, mientras que los controles sanos fueron identificados como homocigotos para el alelo silvestre. El control heterocigoto mostró ambos alelos mediante esta técnica (Figura 2).

DISCUSIÓN

En este trabajo presentamos una aplicación de la PCR en tiempo real acoplada a FRET para la detección de la mutación c.985A→G del gen *MCAD*. Los resultados obtenidos mediante esta técnica, tanto en pacientes como en controles, coinciden con los observados mediante secuenciación capilar de los productos de PCR analizados. Este trabajo, por tanto, también determina la especificidad del método en esta aplicación.

Uno de los inconvenientes a objetar en esta técnica sería la no identificación específica de cualquier otra mutación dife-

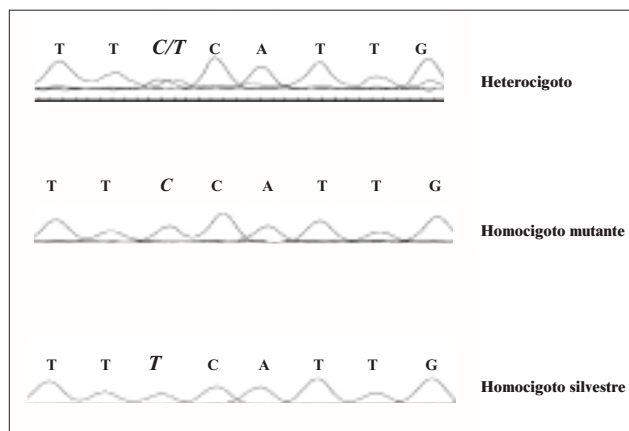


Figura 2 Ejemplo de los genotipos obtenidos tras secuenciación capilar automática. Las secuenciaciones se llevaron a cabo sobre los mismos productos de PCR utilizados en el genotipaje por FRET.

rente a c.985A→G del gen *MCAD* que fuera cubierta por la sonda sensible. En este caso, podría aparecer un pico de temperatura media de fusión que pudiera ser confundido con el pico de la mutación buscada. Sin embargo, la probabilidad de aparición de otras mutaciones cercanas a la buscada es muy remota. A pesar de ello, es posible que el sistema FRET sea capaz de discernir entre una u otra mutación existente en la zona de acoplamiento de la sonda sensible, ya que, con bastante probabilidad, se alterarían los picos de temperatura media de desnaturalización (9).

Una ventaja de esta tecnología, en comparación con las técnicas clásicas de detección de mutaciones genéticas o polimorfismos, es la rapidez. De esta forma, la PCR en tiempo real y la generación de resultados ocurre en 35 minutos para 32 muestras. Si se utilizan equipos de reactivos comerciales para la extracción rápida de DNA (aproximadamente 20 minutos para la extracción en 10 muestras de sangre periférica) y contando con el tiempo de preparación de la PCR (10 minutos para un técnico experimentado), es posible completar todo el proceso para 10 pacientes en un tiempo aproximado de una hora. Adicionalmente, la reducción a un solo paso de la manipulación de muestras disminuye el riesgo de falsos resultados y de contaminación cruzada de las muestras. Estas características de fiabilidad, junto a su sensibilidad y sencillez, la hacen una técnica de alto rendimiento en laboratorios de biología molecular aplicada al diagnóstico, y por ello, podría ser utilizada para el genotipaje sistemático de recién nacidos en poblaciones de riesgo.

Correspondencia:
Luis Miguel Real Navarrete
Neocodex.
Dpto. de Genética Funcional
Ctra. Nacional IV Km 536
41020 Sevilla
Fax: 954047325
e-mail: lmreal@neocodex.es

BIBLIOGRAFÍA

- Roe CR, Coates PM. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. New York: MacGraw-Hill, 1995:1501-1534.
- Iafolla AK, Thompson RJ, Roe CR. Medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical course in 120 affected children. *J Pediatr*. 1994; 124: 409-15.

3. Wang SS, Fernhoff PM, Hannon WH, Khoury MJ. Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: human genome epidemiology review. *Genet. Med.* 1999; 1: 332-9.
4. Tanaka K, Gregersen N, Ribes A, Kim J, Kolvraa S, Winter V, *et al.* A survey of the newborn populations in Belgium, Germany, Poland, Czech Republic, Hungary, Bulgaria, Spain, Turkey, and Japan for the G985 variant allele with haplotype analysis at the medium chain Acyl-CoA dehydrogenase gene locus: clinical and evolutionary consideration. *Pediatr Res.* 1997; 41: 201-9.
5. Martinez G, Garcia-Lozano JR, Ribes A, Maldonado MD, Balde-llou A, de Pablo R, *et al.* High risk of medium chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency among gypsies. *Pediatr Res.* 1998; 44: 83-4.
6. Seddon HR, Gray G, Pollitt RJ, Iitia A, Green A. Population screening for the common G985 mutation causing medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency with Eu-labeled oligonucleotides and the DELFIA system. *Clin Chem*; 1997; 43: 436-42.
7. Arakawa H, Uetanaka K, Maeda M, Tsuji A, Matsubara Y, Narisawa K. Analysis of polymerase chain reaction-product by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection and its application to the diagnosis of medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *J Chromatogr A.* 1994; 680: 517-23.
8. Iolascon A, Parrella T, Perrotta S, Guardamagna O, Coates PM, Sartore M, *et al.* Rapid detection of medium chain acyl-CoA dehydrogenase gene mutations by non-radioactive, single strand conformation polymorphism minigels. *J Med Genet.* 1994; 31: 551-4.
9. Ruiz A, Antinolo G, Marcos I, Borrego S. Novel technique for scanning of codon 634 of the RET protooncogene with fluorescence resonance energy transfer and real-time PCR in patients with medullary thyroid carcinoma. *Clin Chem* 2001; 47:1939-44.