

IDENTIFICACION DE UNA NUEVA MUTACION COMO CAUSA DEL SINDROME DE LESCH-NYHAN EN UNA FAMILIA PERUANA: UTILIDAD DEL EXAMEN MOLECULAR PARA EL CONSEJO GENETICO

J. PATRICK O'NEILL¹, LUCY TROMBLEY¹, MARY GUNDEL¹, TIMOTHY HUNTER²,
JANICE A. NICKLAS³ y MARIA ISABEL DE MICHELENA⁴

RESUMEN

En un niño con síndrome de Lesch-Nyhan (LN) se ha identificado una nueva mutación en el gen HPRT, ligado a X. Esta mutación puntual, un cambio de guanina por timidina (G ->T) en la base 40114 del gen da como resultado la alteración del ARN mensajero (ARNm) y, consecuentemente, la falta de producción de la enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa, lo cual origina el síndrome de LN. La madre y algunas de las mujeres de la familia en riesgo de ser portadoras sanas (heterocigotas), también fueron estudiadas, encontrándose que la madre es heterocigota, pero las dos hermanas y una tía materna no lo son. Esta información ha permitido el asesoramiento genético a estas mujeres, y podría, eventualmente, ser usada para diagnóstico prenatal.

Esta mutación no ha sido reportada antes en casos de Lesch-Nyhan, ni está descrita en la base de datos de mutaciones del gen HPRT humano, por lo que se ha denominado HPRT_{Peru}.

SUMMARY

A new mutation in the X-linked hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) gene has been determined in a male afflicted with Lesch-Nyhan (LN) syndrome. This point mutation, a G->T transversion at genomic base 40114 results in the alteration of mRNA, and, consequently, in the lack of production of normal enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, which is the cause of LN syndrome. The mother and some of the female members of the family who were at risk for being healthy carriers (heterozygous) of the HPRT mutation were also studied. DNA sequencing revealed that the boy's mother is a carrier of this mutation, but that his two sisters and one maternal aunt are not. Such carrier information has allowed genetic counselling for these women, and could eventually be used for prenatal diagnosis. This mutation has not been reported previously in a Lesch-Nyhan syndrome male nor in the entire human HPRT mutation database, and has been termed HPRT_{Peru}.

PALABRAS-CLAVE : Síndrome de Lesch-Nyhan. Nueva mutación, gen HPRT.

KEY WORDS : Lesch-Nyhan Syndrome, New Mutation, HPRT gene.

1. Genetics Laboratory,

2. DNA Analysis Facility, and

3. Molecular Diagnostics Laboratory, University of Vermont, Burlington, VT 05401, USA, e

4. Instituto de Genética, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

INTRODUCCION

El síndrome de Lesch-Nyhan es un error innato del metabolismo de las purinas, causado por la ausencia de la enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HPRT) debido a mutaciones en el gen HPRT, situado en el cromosoma X (Xq26)^{1,2}. Las características de este síndrome son: parálisis cerebral espástica, coreoatetosis, cálculos urinarios de ácido úrico, disfunción neurológica y autoagresión compulsiva, incluyendo destrucción por mordedura de dedos y labios. Debido a que es una enfermedad ligada a X, sólo los varones están afectados, pero las mujeres pueden ser portadoras heterocigotas (sanas) y tener, por lo tanto, hijos varones afectados. Se ha estimado que un tercio de los varones con síndrome de Lesch-Nyhan representan mutaciones nuevas, mientras que los otros dos tercios han heredado el gen mutante de una madre portadora sana³.

Recientemente hemos descrito un método que puede ser utilizado tanto para diagnóstico como para análisis de la mutación del síndrome de Lesch-Nyhan⁴. Este método se basa en la capacidad de los linfocitos T deficientes en HPRT para crecer en presencia de 6-tioguanina (TG), un análogo de la purina, que normalmente es citotóxico⁵. El cultivo de linfocitos T en diferentes medios, unos con TG y otros sin dicho componente, permite la diferenciación entre personas con deficiencia de HPRT y las que no la tienen. Este método permite también la determinación del estado de portador de las mujeres en riesgo, y proporciona células para realizar el análisis del ADN.

MATERIAL Y METODOS

Sujetos:

La genealogía se muestra en la figura 1. El caso índice (V-3) es un niño que fue remitido para evaluación genética a los cuatro años y medio. Según anamnesis, este niño presentó retardo del desarrollo psicomotor desde el inicio; había sido diagnosticado de "parálisis cerebral" desde los 6 meses y nunca había podido sentarse solo ni caminar. Además, durante los últimos 2 años había presentado, con severidad progresivamente mayor, conductas agresivas y autoagresivas (se mordía los dedos hasta hacerlos sangrar, por lo que se hacía necesario el uso casi permanente de guantes de box para protegerlo), así como movimientos involuntarios. Su vocabulario constaba de unas 15 palabras, pero su comprensión del lenguaje parecía mucho más amplia. Aun no controlaba esfínteres.

En el examen, se observó a un niño de aspecto atractivo, sonriente, que se mantenía sentado con apoyo. Su peso y talla eran adecuados para su edad y no mostraba rasgos dismórficos. Además de lo descrito por la madre, presentaba hipotonía axial y movimientos involuntarios de tipo coreo atetoide. Su conducta llamaba la atención, debido a que, estando aparentemente tranquilo, presentaba repentinos e inmotivados episodios de agresión hacia su madre y los médicos, escupiendo, pateando y tratando de morder.

Entre los exámenes auxiliares, la resonancia magnética cerebral no mostró alteraciones significativas, pero se describían algunas zonas de desmielinización. Los análisis bioquímicos eran en general normales, excepto que el ácido úrico

estaba ligeramente elevado en sangre (7.7mg/dl, normal: de 2.5 a 7) y muy elevado en orina (127.5, normal: de 15 a 20). La relación ácido úrico/ creatinina en orina de 24 horas era de 3.45 (normal de 0.6 a 1.5). Estos resultados y el cuadro clínico sugerían el diagnóstico de síndrome de Lesch-Nyhan. Para confirmarlo se hicieron los exámenes adicionales que se describen más adelante.

La historia familiar mostró que este niño (V-3 en la genealogía) es el tercer hijo; sus hermanas (V-1 y V-2) de 11 y 9 años, son sanas. Sus padres (IV-2 y IV-10) son consanguíneos en tercer grado, ya que las abuelas maternas de ambos (II-1 y II-2) eran hermanas, de ascendencia croata. El padre (IV-10) tiene 4 hermanas, todas sanas y aún sin descendencia; no hay historia de anomalías congénitas en esa rama de la familia. Su madre (IV-2) tuvo 8 hermanos: 6 mujeres y 2 varones. El mayor de los hombres (IV-1) falleció a los 11 meses de edad, con un trastorno neurológico diagnosticado como "parálisis cerebral" y que, según su madre recientemente fallecida, era idéntico al del caso índice. Las 6 mujeres y el otro varón son sanos y aún sin descendencia. La abuela materna (III-1) fue hija única, y no hay historia de otras personas con trastornos neurológicos en la familia.

Análisis enzimáticos y moleculares

Se tomó muestras de sangre del caso índice (V-3), su madre (IV-2), sus dos hermanas (V-1 y V-2) y una de las tías maternas (IV-8). Las otras mujeres en riesgo de ser portadoras (IV-3 a IV-7) rehusaron hacerse el examen. Las muestras fueron tomadas en el Perú y remitidas a la Universidad de Vermont donde se realizaron las pruebas enzimáticas y moleculares descritas a continuación.

Análisis del clonamiento de linfocitos T

Este examen se basa en la capacidad de los linfocitos T deficientes en HPRT para proliferar y formar colonias en presencia de 6-tioguanina (TG), un análogo de la purina que mata a las células normales. Para este análisis, se aislaron los linfocitos T de las muestras de sangre, y se sembraron en diferentes medios de cultivo, de los cuales unos contenían TG y otros no la contenían, según métodos descritos previamente⁵. Posteriormente se analizó y cuantificó el crecimiento de colonias en cada uno de los cultivos. La prueba mide la producción de HPRT por las células cultivadas, ya que en este análisis, las células mutantes (HPRT-) deben multiplicarse y formar colonias, tanto en los medios de cultivo que contienen TG, como en los que no la contienen; en tanto el crecimiento de las células normales (HPRT+) es inhibido por la presencia de TG en el medio de cultivo. La frecuencia de mutaciones se calcula como la resultante de dividir la cantidad de colonias obtenidas en un cultivo que contenga 10 μ M de TG, entre la cantidad de colonias en ausencia de TG.

Por lo tanto, las células de un varón con síndrome de Lesch-Nyhan, que deben crecer igualmente bien en presencia o ausencia de TG, darán una frecuencia de células mutantes de 1.0 (100%). En las células de una mujer no portadora se encontrará una frecuencia de mutaciones de 1 a 20x10⁻⁶ (0.0001-0.002%)⁶. Y en las de una mujer heterocigota, la frecuencia de mutaciones será de 0.1 a 5%⁷. La frecuencia en las mujeres portadoras es menos del 50% esperable, debido probablemente a la selección negativa contra las células mutantes durante la proliferación de las células hematopoyéticas primitivas⁸.

Análisis de la mutación *HPRT*

Para el análisis del ADN se utilizaron los linfocitos obtenidos en los cultivos de la prueba anterior. Se sintetizó ADN clonado mediante transcriptasa reversa con el método descrito por YANG y colaboradores⁹. Este ADNc fue amplificado por PCR, utilizando cebadores específicos para *HPRT*¹⁰, y luego secuenciado directamente utilizando un Taq Dye-deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer - ABI) y un secuenciador automático ABI modelo 373A con cebadores *HPRT* B and A (bases *HPRT* -36 to -17 y 701 to 682, respectivamente).

Para el secuenciamiento del exon 8 del ADN genómico (bases 40033 a 40109) se utilizaron los cebadores 38667 a 38691 (con sentido) y 40199 a 40176 (antisentido), los cuales fueron desarrollados para amplificar los exones 7 y 8 del gen *HPRT*¹⁰ (Estos cebadores se numeran de acuerdo a la secuencia del gen *HPRT* genómico¹¹).

RESULTADOS

En la prueba de clonamiento de linfocitos T, las células del caso índice mostraron idéntico crecimiento en los cultivos con TG o sin ella, con lo que se demostró una frecuencia de mutación de 1.0 (100%), consistente con el diagnóstico de síndrome de Lesch-Nyhan. Su madre mostró una frecuencia de células mutantes de 1.1%, lo cual está dentro del rango esperado para las heterocigotas. Las frecuencias de mutaciones en las otras tres mujeres estudiadas en la familia (IV-8, V-1 y V-2), estuvieron dentro del rango normal, esto es 2.9×10^{-6} , 2.3×10^{-6} y 3.4×10^{-6} , respectivamente, por lo que estas tres mujeres fueron consideradas no portadoras de la mutación (tabla 1).

El secuenciamiento del ADN clonado del gen *HPRT* en el varón afecto demostró

la exclusión exacta y exclusivamente del exón 8. Al secuenciar el ADN genómico de la zona que incluye el exón 8 se encontró un cambio de bases en la secuencia donadora de procesamiento: la secuencia normal: gtaagt quedó sustituida por gtaatt (IVS8+5G->T; base genómica 40114G->T). Esta mutación interfirió con la edición normal del ARN mensajero, causando la mencionada exclusión del exón 8.

El secuenciamiento del ADN clonado de las células de la madre que crecieron en el medio *sin* TG (que son las que expresan el alelo normal; el mutante ha sufrido el fenómeno de inactivación) mostró la presencia del exón 8, y las 657 bases normales de la zona estudiada. En cambio, el secuenciamiento del ADN clonado de las células de la madre que crecieron en el medio *con* TG (que son las que expresan el alelo mutante; el normal ha sufrido el fenómeno de inactivación) mostró la exclusión del exón 8. Para confirmar en forma absoluta la condición de heterocigota de la madre y evaluar la factibilidad de hacer el examen directo de ADN a las mujeres de la familia en riesgo, se secuenció la región del exón 8 del ADN genómico de la madre; se encontró un único cambio con respecto a lo esperable en la secuencia normal: se encontró tanto G como T en la base 40114. De esta manera quedó confirmado que ella es heterocigota para la mutación que presenta su hijo.

Un aspecto importante del análisis de la mutación en el síndrome de Lesch-Nyhan es la posibilidad de aplicar estos métodos para determinar el estado de portadoras en las otras mujeres en riesgo de la familia. Por ejemplo, en esta familia las otras tres mujeres estudiadas (IV-8, V-1 y V-2) habían sido consideradas como no portadoras por el examen de cultivo de linfocitos T. Además de eso, se realizó el secuenciamiento directo del ADN genómico, el cual mostró en estas tres mujeres

únicamente el tipo normal de ADN, con G en la base 40114, confirmando así que ninguna de ellas es portadora de la mutación (tabla 1).

DISCUSION

La mutación reportada en esta familia no ha sido descrita antes en relación al síndrome de Lesch-Nyhan^{12,13}. Sin embargo sí se ha reportado un cambio de G->A en la misma base dentro de la secuencia donadora de procesamiento, la cual tuvo idéntica consecuencia de exclusión del exón 8 en el ARNm; esta exclusión hace que la proteína producto del gen HPRT en estos casos sea más corta, de sólo 182 aminoácidos, ya que la pérdida de las 77 bases del exón 8 causa un desplazamiento del marco de lectura, que crea un codón de terminación TAG en el nuevo codón 183.

Existe una gran base de datos de las mutaciones del gen HPRT¹⁴. Aunque las que afectan el procesamiento del exón 8 son frecuentes, esta mutación en particular, que, por el lugar de origen, hemos denominado HPRT_{Peni}, no había sido descrita antes en dicha base de datos, y es sólo la segunda reportada en la secuencia donadora de procesamiento del exón 8.

Respecto al origen y segregación de la mutación en esta familia, si aceptamos la hipótesis que IV-1 haya tenido también el síndrome de Lesch-Nyhan, debemos suponer que la abuela materna (III-1) fue una heterocigota para la mutación descrita, pero no hay suficiente información de generaciones anteriores que permita deducir si fue ella la primera persona con la mutación en la familia, o si su propia madre (II-1) fue portadora. En cualquier caso, cada una de las seis tías maternas del caso índice tiene una probabilidad de 50% de ser portadora sana; y aunque esto fue

explicado a la familia, cinco de estas seis mujeres en riesgo rechazaron el ofrecimiento de conocer su estado de portadora. Esta negativa a dilucidar la presencia de un propio gen "malo", puede estar condicionada por factores psicológicos y culturales, y no es infrecuente¹⁵.

En las hermanas del paciente, quienes también tenían una probabilidad de 50%, la condición de heterocigotas fue descartada por los exámenes realizados. Debido a la ausencia de otros enfermos, para cualquier otra mujer de la familia, fuera de las hermanas y tías maternas del caso índice, la probabilidad de ser portadora es muy pequeña.

Otro punto que merece comentarse es la importancia de llegar a un diagnóstico preciso en niños con trastornos neurológicos no bien determinados. Muchos pacientes diagnosticados de "parálisis cerebral" tienen en realidad enfermedades neurogenéticas específicas, que deben investigarse, tomando en cuenta los beneficios potenciales que la determinación de un diagnóstico específico aporta para ellos y sus familias. Para la obtención de este diagnóstico se requiere seguir un proceso, el cual se inicia con el establecimiento de la sospecha clínica, y culmina con el examen directo del gen (o de los cromosomas en otros casos), a fin de identificar el defecto genético específico causante del trastorno.

Este reporte muestra la importancia de la combinación de la determinación de frecuencia de células mutantes y el análisis molecular del gen HPRT tanto para el diagnóstico del síndrome de Lesch-Nyhan, como para el consejo genético de las mujeres en las familias en las que se diagnostica este síndrome. En esta familia, la consecución del diagnóstico etiológico permitió que tres mujeres se beneficiaran de la

certeza de que ellas no transmitirían a sus hijos la mutación causante de este grave trastorno. Y los padres del paciente tienen actualmente la posibilidad de optar por

una decisión informada en cuanto a su futuro reproductivo, y de realizar diagnóstico prenatal, en caso lo requiriesen, en una eventual gestación.

TABLA I
ANALISIS DE LA MUTACION EN LA FAMILIA CON HPRT_{PERU}

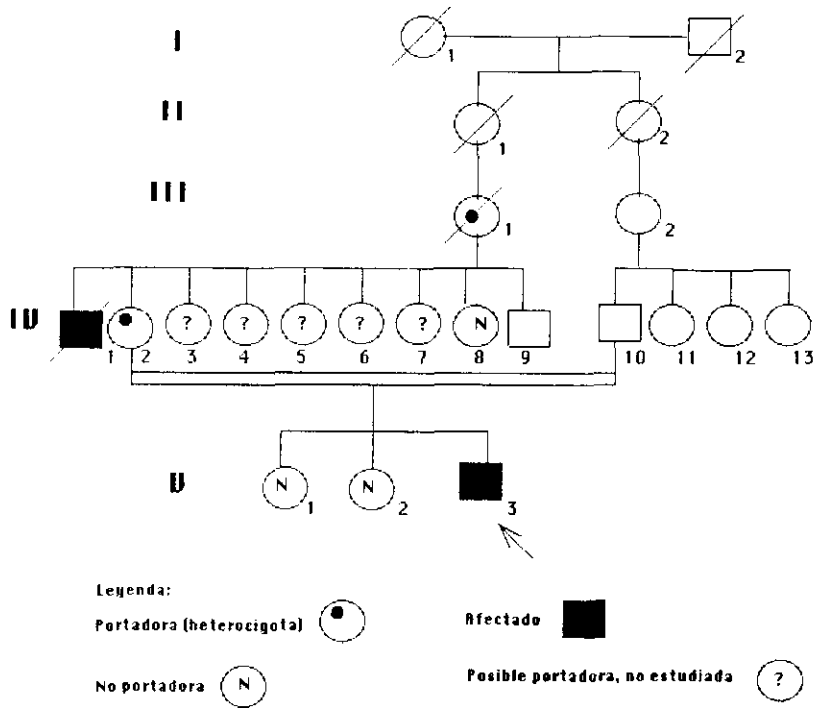
			Alteración del gen HPRT	
Individuo	Genealogía Nº.	Frecuencia de mutación	ADN clonado ¹	ADN genómico ²
Caso índice	V-3	1.0	Exclusión exón 8	IVS8+5G → T
Madre	IV-2	1.1×10^{-2}	Exclusión exón 8	IVS8+5G → T y G
Hermana 1	V-1	2.3×10^{-6}	-	IVS8+5G solamente
Hermana 2	V-2	3.4×10^{-6}	-	IVS8+5G solamente
Tía	IV-8	2.9×10^{-6}	-	IVS8+5G solamente

¹ Frecuencia de la mutación de HPRT según el análisis de clonamiento de linfocitos T.

² Mutación en el intron 8 del gen HPRT: ₆₀₄TTG AAT gtaagt → gtaatt

IVS8+5G → T, que corresponde a la base genómica ₄₀₁₁₄G → T

Figura 1. GENEALOGIA



ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfasser haben ein Kind mit Lersch-Nyhan Syndrom untersucht. Es handelt sich um ein mutiertes Gen (HPRT). Die Verfasser hatten auch die Familie des Patienten untersucht und behaupten, dass die Mutter und einige Frauen in der Familie Heterozygoten wären, nicht aber die zwei Schwestern und die Tante mütterlicher Seite. Solche Information wurde für die genetische Beratung und pränatale Diagnose benutzt. Die Befunde seien die ersten in der Literatur.

BIBLIOGRAFIA

1. LUSCH, M. & NYHAN, W. (1964). "A familiar disorder of uric acid metabolism and central nervous system function". *Am. J. Med.* 36:561-570.- 2. SEEGMILLER, J., ROSENBLUM, F., KELLEY, W. (1967). Enzyme defect associated with a sex linked human neurological disorder and excessive purine synthesis. *Science* 155:1682-1684.- 3. FRANCKE, U., BAKAN, B., NYHAN, W.L. (1973). Detection of heterozygous carriers of the Lersch-Nyhan syndrome by electrophoresis of hair root lysates. *J*

Pediatr. 82:472-478.- 4. HUNTER, T.C., MELASCON, S.B., DALLAIRE, L., TAFT, S., SKOPEK, T.R., ALBERTINI, R.J., O'NEILL, J.P. (1996). Germinal HPRT splice donor site mutation results in multiple RNA splicing products in T-lymphocyte cultures. *Som. Cell Molec. Genet.* 22:145-150.- 5. O'NEILL, J.P., MCGINNIS, M.J., BERMAN, J.K., SULLIVAN, L.M., NICKLAS, J.A., ALBERTINI, R.J. (1987). Refinement of a T-lymphocyte cloning assay to quantify the *in vivo* thioguanine-

- resistant mutant frequency in humans. *Mutagenesis* 2:87-94.- 6. O'NEILL, J.P., ROGAN, P.K., CARIELLO, N., NICKLAS, J.A. (1998). Mutations that alter RNA splicing of the human *HPRT* gene: a review of the spectrum. (in press).- 7. SKOPEK, T.R., RUCIO, L., SIMPSON, D., DALLAIRE, L., MELANCON, S.B., OGIER, H., O'NEILL, J.P., FAUTA, M.T., NICKLAS, J.A., ALBERTINI, R.J. (1990). Molecular analyses of a Lesch-Nyhan syndrome mutation (*hpprt*_{M₁₀₀₀}) by use of T-lymphocyte cultures. *Hum. Genet.* 85:111-116.- 8. HAKODA, M., HIRAI, Y., AKIYAMA, M., YAMANAKA, H., TERAI, C., KAMATANI, N., KASHIWAZAKI, S. (1995). Selection against blood cells deficient in hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) in Lesch-Nyhan heterozygotes occurs at the level of multipotent stem cells. *Hum. Genet.* 96(6):674-680.- 9. YANG, J. L., MAHER, V.M., Mc CORMICK, J.J. (1989). Amplification of cDNA from the lysate of a small clone of diploid human cells and direct DNA sequencing. *Gene* 83:347-354.- 10. GIBBS, R.A., NGUYEN, P.-N., EDWARDS, A., CIVITELLO, A.B., CASKEY, C.T. (1990). Multiplex DNA deletion detection and exon sequencing of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene in Lesch-Nyhan families. *Genomics* 7:235-244.- 11. EDWARDS, A., VOSS, H., RICE, P., CIVITELLO, A., STEGEMANN, J., SCHWAGER, C., ZIMMERMANN, J., ERFLE, H., CASKEY, C.T., ANSORAGE, W. (1990). Automated DNA sequencing of the human HPRT locus. *Genomics* 6:593-608.- 12. SCULLEY, D.G., DAWSON, P.A., EMMERSON, B.T., GORDON, R.B. (1992). A review of the molecular basis of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency. *Hum. Genet.* 90:195-207.- 13. ALFORD, R.L., REDMAN, J.B., O'BRIEN, W.E., CASKEY, C.T. (1995). Lesch-Nyhan Syndrome: Carrier and prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis* 15:329-338.- 14. CARIELLO, N.F., CRAFT, T.R., VRIELING, H., VAN ZEELAND, A.A., ADAMS, T., SKOPEK, T.R. (1992). Human HPRT mutant database: Software for data entry and retrieval. *Environ Molec. Mutagenesis* 20:81-83.- 15. MICHIE, S., MARTEAU, T., BOBROW, M. (1997). Genetic counseling: The psychological impact of meeting patient's expectations. *J. Med. Genet* 34:237-241

Correspondencia a:

A. Patrick O'Neill, Ph.D. University of Vermont Genetics Laboratory 32 N. Prospect St. Burlington, VT 05401
USA Tel: (802) 656-8332 Fax: (802) 656-8333 email: patrick.oneill@uvm.edu

María Isabel de Michelena, M.D. Instituto de Genética, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Diagonal 340-34,
Miraflores, Lima 18, Perú. Tel: (51-1) 444- 2879. Fax: (51-1) 446-9321 email: michelen@amauta.rcp.net.pe

AGRADECIMIENTOS. Deseamos agradecer a Inge Gobel por su asistencia secretarial. El secuenciamiento se realizó en el VT Cancer Center DNA Analysis Core Facility, el cual está subvencionado por el NCI P30 CA 22435. El apoyo económico del NCI no implica acuerdo del mismo con las opiniones vertidas en este documento.