

## ESTUDI GENÈTIC DE L'EXPANSIÓ DE L'HEXANUCLEÒTID G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> EN EL GEN C9orf72, ASSOCIAT A LA DEMÈNCIA FRONTOTEMPORAL I A L'ESCLEROSI LATERAL AMIOTRÒFICA.

La DFT es considera una de les formes de demència més comuns en la població menor de 65 anys, amb una prevalença de 10 casos per 100.000. Només la malaltia d'Alzheimer és més prevalent. Els pacients amb DFT pateixen una degeneració de les neurones en els lòbuls frontals i temporals que condueix a canvis de comportament i personalitat, dèficits en les funcions executives i deficiències del llenguatge.

L'ELA, també coneguda com la malaltia de Lou Gehrig, és un desordre de les motoneurons superiors e inferiors que es manifesta com hiperreflèxia, espasticitat progressiva, fasciculacions, atròfia muscular i debilitat. L'aparició de la malaltia és majoritàriament a partir dels 60 anys, amb una prevalença de 5 casos per cada 100.000 persones.

Encara que l'ELA s'ha definit tradicionalment com un trastorn del sistema motor, actualment és reconeguda com una malaltia neurodegenerativa multisistèmica, ja que altres àrees cerebrals diferents de les motores pateixen degeneració, de forma que fins a un 50% dels pacients experimenten un deteriorament de les funcions frontotemporals, com la cognició i el comportament. De la mateixa manera, entre un 15 i un 50% dels pacients amb DFT presenten manifestacions de malaltia de motoneurona. Basant-se en la superposició clínica, neuropatològica (i també genètica) entre la DFT i l'ELA, aquestes dues malalties es consideren actualment dos extrems d'un espectre que comprèn tots els possibles graus entre les malalties (espectre DFT-ELA).

La DFT i la ELA, es consideren desordres multifactorials i la seva causa primària no ha estat encara dilucidada. No obstant, una proporció relativament important dels casos són atribuïbles a alteracions genètiques hereditàries compartides.

El gen *C9orf72* es troba al braç curt del cromosoma 9 (9p21) i presenta 11 exons. A l'exó 1 del gen es localitza una seqüència de sis parells de bases GGGGCC (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>), que es repeteix un número variable de vegades. A l'any 2011, en un estudi amb famílies amb fenotip combinat de DFT i ELA, es va descriure una associació molt forta entre una multiplicació del número de repeticions d'aquesta seqüència (expansió), i l'aparició de la malaltia. A dia d'avui, l'expansió de *C9orf72*, es considera la causa genètica hereditària més comú per a les dues malalties. Quan la malaltia és deguda a aquesta alteració genètica, es transmet de pares a fills seguint un patró d'herència autosòmica dominant, pel que en les famílies afectes, és comú trobar individus malalts en totes les generacions.



# Catlab Informa

de repeticions que tingui el pacient. Mitjançant una recta de calibratge, a partir d'un estàndard valorat, podem determinar la mida de la regió G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> a cada un dels al·lells

Encebador 1

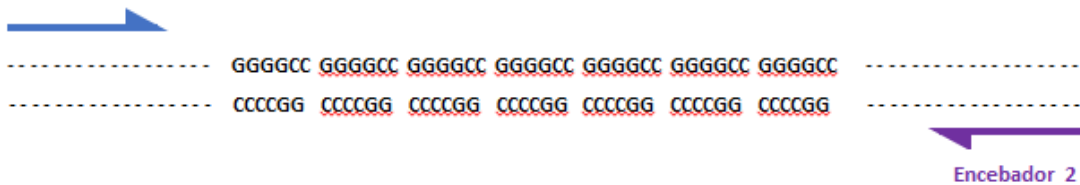


Figura 2. Representació esquemàtica del disseny d'encebadors flanquejants a la PCR convencional per a l'estudi de la seqüència repetitiva.

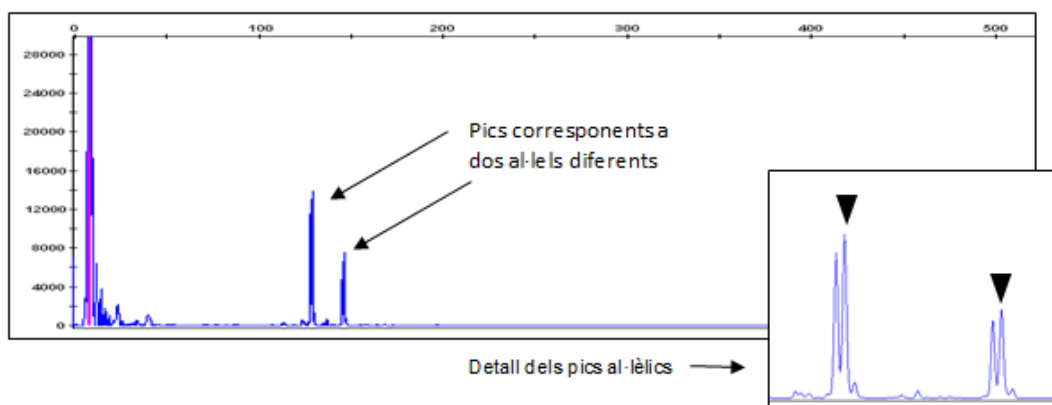


Figura 3. Resultats i detall de l'electroforesi capil·lar de la PCR convencional. S'observen dos pics pertanyents a dos al·lells de diferent mida.

No obstant, les regions repetitives del genoma, especialment aquelles enriquides en bases G i C, como l'expansió del *C9orf72*, suposen un repte per a la seva anàlisi mitjançant aquests mètodes basats en PCR convencional, de forma que, a partir d'un determinat número de repeticions, l'al·lel portador d'una expansió no es amplificable i per tant no es pot detectar. Aquesta situació, no ens permet diferenciar un pacient homozigot per a un al·lel normal, d'un que porti l'expansió, ja que tots dos presentaran un únic pic al·lèlic.

És per això que, addicionalment, fem servir un segon tipus de reacció denominada *repeat primed* PCR (RP-PCR). La RP-PCR és una modificació de la PCR, específica per a l'estudi de seqüències repetitives del genoma. A l'igual que en la PCR convencional, un dels dos encebadors hibrida al costat de la regió d'interès. El segon encebador però, té una seqüència complementària a la pròpia seqüència repetitiva, de forma que és capaç d'hibridar amb cada una de la repeticions, generant fragments de totes les mides possibles. Per últim, es fa servir un tercer encebador, complementari al segon, que en permet ampliar tots el fragments generats.

# Catlab Informa

Encebador 1

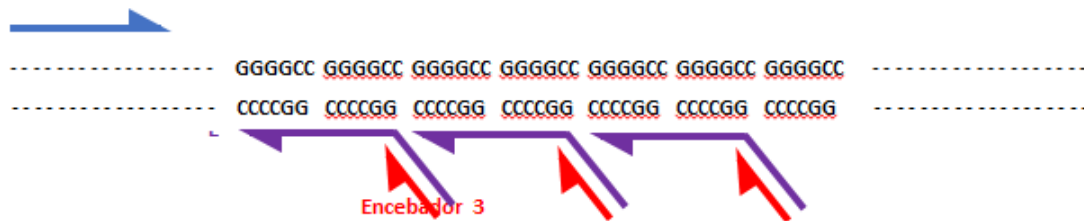


Figura 4. Representació esquemàtica del disseny d'encebadors a les RP-PCR.

A l'electroforesi capil·lar, veiem el resultat com una sèrie consecutiva de pics, un per cada repetició.

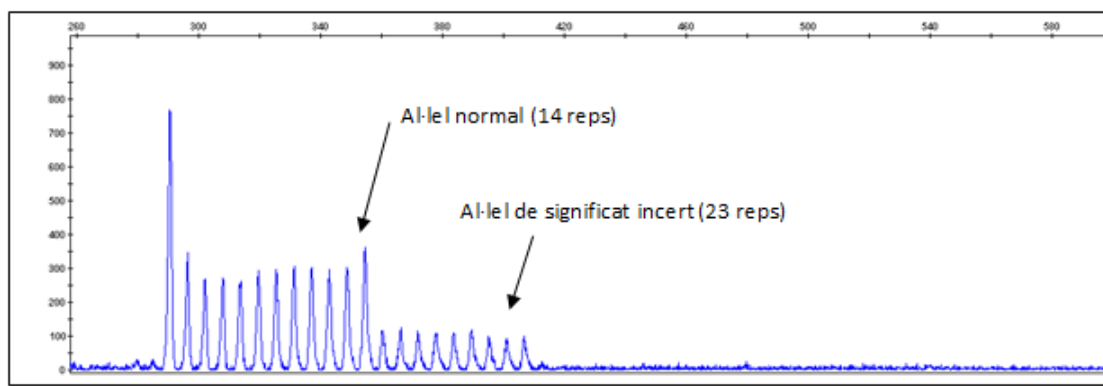


Figura 5. Resultats i detall de l'electroforesi capil·lar de la RP-PCR en un individu amb un al·lel normal i un al·lel de significat incert, amb una expansió moderada.

En els portadors d'una gran expansió, podem observar un patró molt característic, constituït per una sèrie de pics de mida decreixent que es perden en el fons.

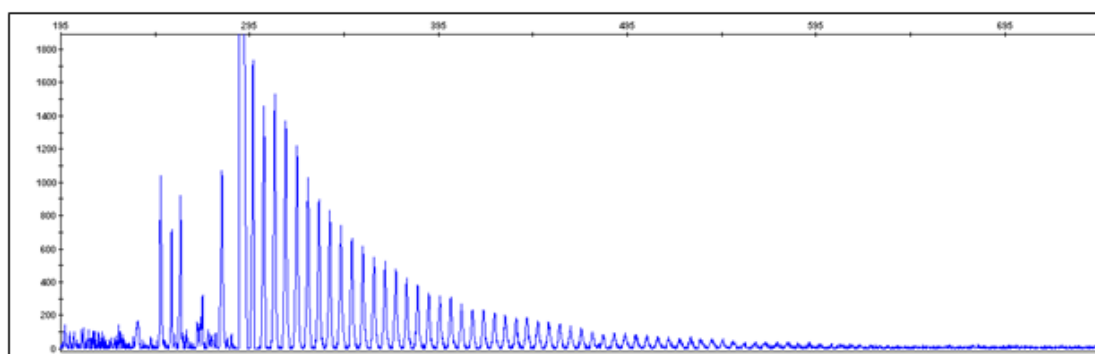


Figura 6. Resultats i detall de l'electroforesi capil·lar de la RP-PCR en un individu amb una al·lel normal i un al·lel patològic amb una gran expansió.

# Catlab Informa

La combinació de les tres reaccions ens permet, al mateix temps, determinar el número de repeticions en al·lels no expandits o amb expansions moderades i, per altra, detectar qualitativament les grans expansions, causants de patologia. L'ús de la TP-PCR en els dos sentits de la doble cadena d'ADN ens permet evitar falsos positius i negatius, que es poden produir per variants genètiques properes a la regió analitzada. La conclusió final, és el resultat de la integració del diferents patrons observats.

A dia d'avui, no hi ha encara un consens sobre quin és el mínim número de repeticions necessari per a causar patologia. A Catlab, hem definit una sèrie de rangs de referència, a partir d'una revisió exhaustiva de la bibliografia disponible actualment:

- Al·lels normals ( $\leq 14$  repeticions): No causant de patologia associada a *C9orf72*.
- Al·lels amb expansions de significat incert (15 a 23 repeticions): En un pacient amb DFT-ELA, l'expansió de  $G_4C_2$  al gen *C9orf72* pot estar actuant com un al·lel de risc en el desenvolupament de la malaltia, encara que no es poden excloure altres causes.
- Al·lels amb expansions intermèdies (24 a 60 repeticions): Es tracta d'expansions patogèniques, encara que amb penetrància incompleta. En un estudi diagnòstic en un pacient amb DFT-ELA, la malaltia és atribuïble a aquesta alteració. Els familiars que heretessin l'alteració tindrien un risc elevat de desenvolupar la malaltia.
- Al·lels amb grans expansions (més de 60 repeticions): Són expansions patogèniques amb penetrància gairebé completa. En un estudi diagnòstic en un pacient amb DFT-ELA, la malaltia és atribuïble a aquesta alteració. Pràcticament tots els portadors d'aquesta alteració desenvoluparan un desordre de l'espectre DFT-ELA.

Aquesta aproximació basada en PCR, permet un flux de treball senzill, ràpid, i adaptable a les instal·lacions del nostre laboratori, però, té certes limitacions. La principal és que no pot quantificar la mida de l'expansió en al·lels amb més de 35 -40 repeticions i, per tant, no ens permet diferenciar algunes expansions intermèdies de les grans expansions.

Per tant, és molt recomanable, especialment en estudis presimptomàtics de familiars d'un pacient ja diagnosticat, confirmar la presència i la mida de l'expansió amb un estudi de *southern blot* en un centre de referència.

## **Carlos Lombardía**

Genètica

CATLAB

Tel. 93.748.56.00 - ext. 35018, 35044, 35041

[clombardia@catlab.cat](mailto:clombardia@catlab.cat)

## **Jordi Roigé**

Genètica

CATLAB

Tel. 93.748.56.00 - ext. 35020 / 628.16.78.63

[jroige@catlab.cat](mailto:jroige@catlab.cat)

# Catlab Informa

## **Dra. Emma Triviño**

Responsable Genètica

**CATLAB**

Tel. +34.93.748.56.00 - ext. 35018 / 628203392/ Fax. +34.93.748.56.10/

[etrivino@catlab.cat](mailto:etrivino@catlab.cat)

## Bibliografia:

1. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron*. octubre de 2011;72(2):245-56.
2. Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, et al. A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD. *Neuron*. octubre de 2011;72(2):257-68.
3. Majounie E. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. 2012;11:8.
4. Rutherford NJ, Heckman MG, DeJesus-Hernandez M, Baker MC, Soto-Ortolaza AI, Rayaprolu S, et al. Length of normal alleles of C9ORF72 GGGGCC repeat do not influence disease phenotype. *Neurobiol Aging*. Diciembre de 2012;33(12):2950.e5-2950.e7.
5. van der Zee J, Gijselinck I, Dillen L, Van Langenhove T, Theuns J, Engelborghs S, et al. A Pan-European Study of the C9orf72 Repeat Associated with FTL: Geographic Prevalence, Genomic Instability, and Intermediate Repeats. *Hum Mutat*. febrer de 2013;34(2):363-73.
6. Byrne S, Heverin M, Elamin M, Walsh C, Hardiman O. Intermediate repeat expansion length in C9orf72 may be pathological in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*. marzo de 2014;15(1-2):148-50.
7. Akimoto C, Volk AE, van Blitterswijk M, Van den Broeck M, Leblond CS, Lumbroso S, et al. A blinded international study on the reliability of genetic testing for GGGGCC-repeat expansions in C9orf72 reveals marked differences in results among 14 laboratories. *J Med Genet*. juny de 2014;51(6):419-24.
8. Cleary EM, Pal S, Azam T, Moore DJ, Swingler R, Gorrie G, et al. Improved PCR based methods for detecting C9orf72 hexanucleotide repeat expansions. *Molecular and Cellular Probes*. Agost de 2016;30(4):218-24.
9. Ng ASL, Tan E-K. Intermediate C9orf72 alleles in neurological disorders: does size really matter? *J Med Genet*. Septiembre de 2017;54(9):591-7.
10. Murphy NA, Arthur KC, Tienari PJ, Houlden H, Chiò A, Traynor BJ. Age-related penetrance of the C9orf72 repeat expansion. *Sci Rep*. diciembre de 2017;7(1):2116.
11. Convery R, Mead S, Rohrer JD. Review: Clinical, genetic and neuroimaging features of frontotemporal dementia. 2018;13.
12. Crook A, McEwen A, Fifita JA, Zhang K, Kwok JB, Halliday G, et al. The C9orf72 hexanucleotide repeat expansion presents a challenge for testing laboratories and genetic counseling.

# Catlab Informa

Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration. 3 de juliol de 2019;20(5-6):310-6.

13. Jiang J, Ravits J. Pathogenic Mechanisms and Therapy Development for C9orf72 Amyotrophic Lateral Sclerosis/Frontotemporal Dementia. *Neurotherapeutics*. octubre de 2019;16(4):1115-32.
14. Iacoangeli A, Al Khleifat A, Jones AR, Sproviero W, Shatunov A, Opie-Martin S et al. C9orf72 intermediate expansions of 24–30 repeats are associated with ALS. *acta*