



MOSAICISMO PREMUTACIÓN-MUTACIÓN COMPLETA EN EL GEN FMR1: TRIPLET PRIMED REPEAT-PCR

PREMUTATION-COMPLETE MUTATION MOSAICISM IN FMR1 GENE: TRIPLET PRIMED REPEAT-PCR

Autores

Paula Sienes Bailo
Raquel Lahoz Alonso
Silvia Izquierdo Álvarez

Filiación

Servicio de Bioquímica Clínica.
Hospital Universitario Miguel
Servet. Zaragoza

Fecha de publicación

30 diciembre 2020

Páginas

Páginas 7-12

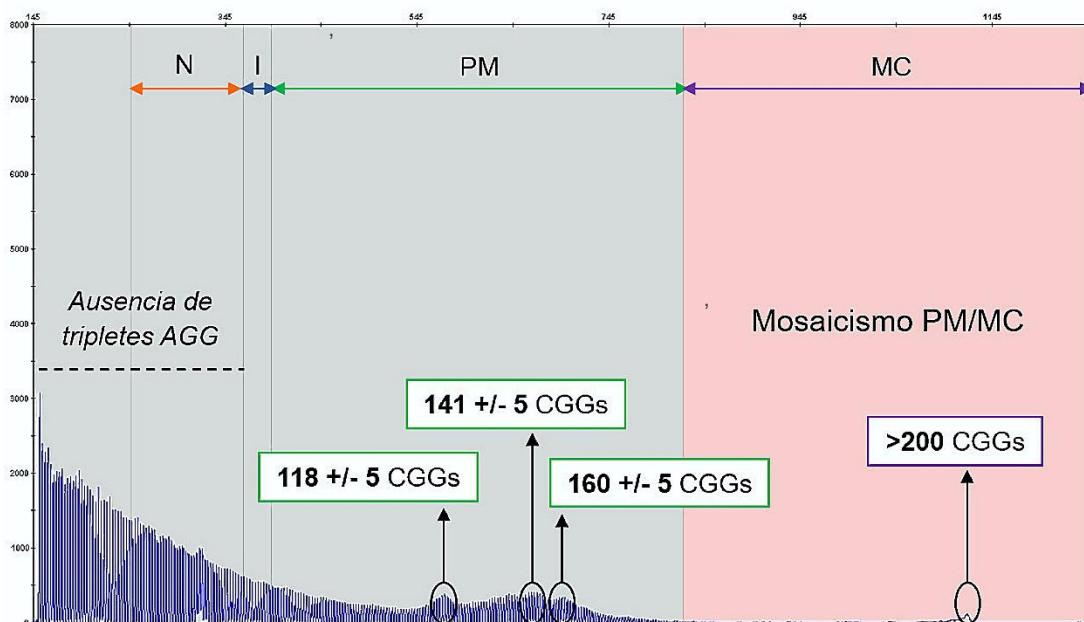


Figura 1. Electroferograma de varón sano estudiado para descartar la condición de portador de la expansión del triplete CGG en el gen *FMR1* por antecedentes familiares.

Figure 1. Electropherogram of a healthy male studied to rule out the carrier status of the CGG triplet expansion in the *FMR1* gene after the identification of family history.

En la figura 1 observamos el electroferograma de un varón sano con 53 años estudiado para descartar la condición de portador de la expansión del triplete CGG en el gen *FMR1* a raíz de la identificación en sus 3 hermanos de la premutación en dicho gen, mediante AmplideXTM *FMR1* PCR Reagents (Asuragen) con CGG Repeat Primed PCR y análisis de los fragmentos mediante el secuenciador ABI 3130xl y software GeneMapper 4.0. La Triplet Repeat Primed PCR (TP-PCR) es una modificación de la PCR, específica para el estudio de zonas repetidas. En este caso, el ensayo utiliza 3 cebadores: uno de

Figure 1, electropherogram of a healthy 53-year-old male studied to rule out the carrier status of the CGG triplet expansion in the *FMR1* gene after the identification of the premutation in this gene in his three siblings. AmplideXTM *FMR1* PCR Reagents (Asuragen) with CGG Repeat Primed PCR and analysis of the fragments using the ABI 3130xl sequencer and GeneMapper 4.0 software were used in this study. The Triplet Repeat Primed-PCR (TP-PCR) is a modification of the PCR, specific for the study of repeated areas. In this case, the assay uses three primers: one of them labeled with the

ellos marcado con el fluorocromo FAM™ flanquea la secuencia de trinucleótidos de longitud variable, otro hibrida con la zona de repeticiones CGG e incluye una secuencia en 5' común al tercer primer, que es el que amplifica la mezcla de productos obtenida con los anteriores cebadores. De esta forma ocurre una amplificación desde múltiples sitios, tantos como repeticiones en el alelo. La especificidad viene dada por el cebador locus-específico, marcado fluorescentemente. El resultado en el electroferograma es una escalera de picos fluorescentes característica, en el que el número y morfología del conjunto de picos es indicativo del número de tripletes detectado. La muestra analizada presenta varios alelos en mosaicismo en el rango de premutación (PM; 118 +/-5, 141 +/-5, 160 +/-5) y un alelo de >200 CGGs en el rango de mutación completa (MC) en el gen *FMR1*. En este caso destaca la ausencia de clínica en el paciente a pesar de ser portador de un alelo con MC y un mosaico de varios alelos PM. A raíz de este hallazgo se completó el estudio genético con la estimación del porcentaje de metilación de los alelos estudiados. En el asesoramiento genético se indicó que, a pesar de no presentar actualmente síntomas, debería ser controlado desde Neurología debido a la probabilidad de desarrollar el síndrome de temblor/ataxia asociado al X frágil (FXTAS). Así, la importancia de un diagnóstico temprano radica en la posibilidad de un manejo terapéutico precoz y adecuado junto con un asesoramiento familiar correcto que incluye la elección de las decisiones reproductivas oportunas. En este caso, todas las hijas del paciente heredarán la PM con un número de CGGs similar al de su padre, pero ninguno de sus hijos heredará la PM ni el alelo con MC.

fluorochrome FAM™ flanks the sequence of variable length trinucleotides; another hybridizes with the CGG repeats region and includes a 5' sequence common to the third primer, which is the one that amplifies the mixture of products obtained with the previous primers. In this way, an amplification occurs from multiple sites, as many as repeats in the allele. The fluorescently labeled locus-specific primer gives specificity. The result in the electropherogram is a characteristic fluorescent peak ladder, in which the number and morphology of the set of peaks is indicative of the number of triplets detected. The analyzed sample presents several alleles in mosaicism in the premutation range (PM; 118 +/- 5, 141 +/- 5, 160 +/- 5) and an allele of >200 CGGs in the complete mutation range (CM) in the *FMR1* gene. In this case, the absence of symptoms in the patient stands out despite being a carrier of a CM allele and a mosaic of several PM alleles. Because of this finding, the genetic study was completed with the estimation of the percentage of methylation of the alleles studied. In the genetic counseling, it was indicated that, despite currently having no symptoms, he should be monitored by Neurology due to the probability of developing the fragile X-associated tremor / ataxia syndrome (FXTAS). Thus, the importance of an early diagnosis lies in the possibility of an early and adequate therapeutic management together with a correct family counseling that includes the choice of the appropriate reproductive decisions. In this case, all the patient's daughters will inherit the PM with a number of CGGs similar to their father, but none of his sons will inherit the PM or the CM allele.

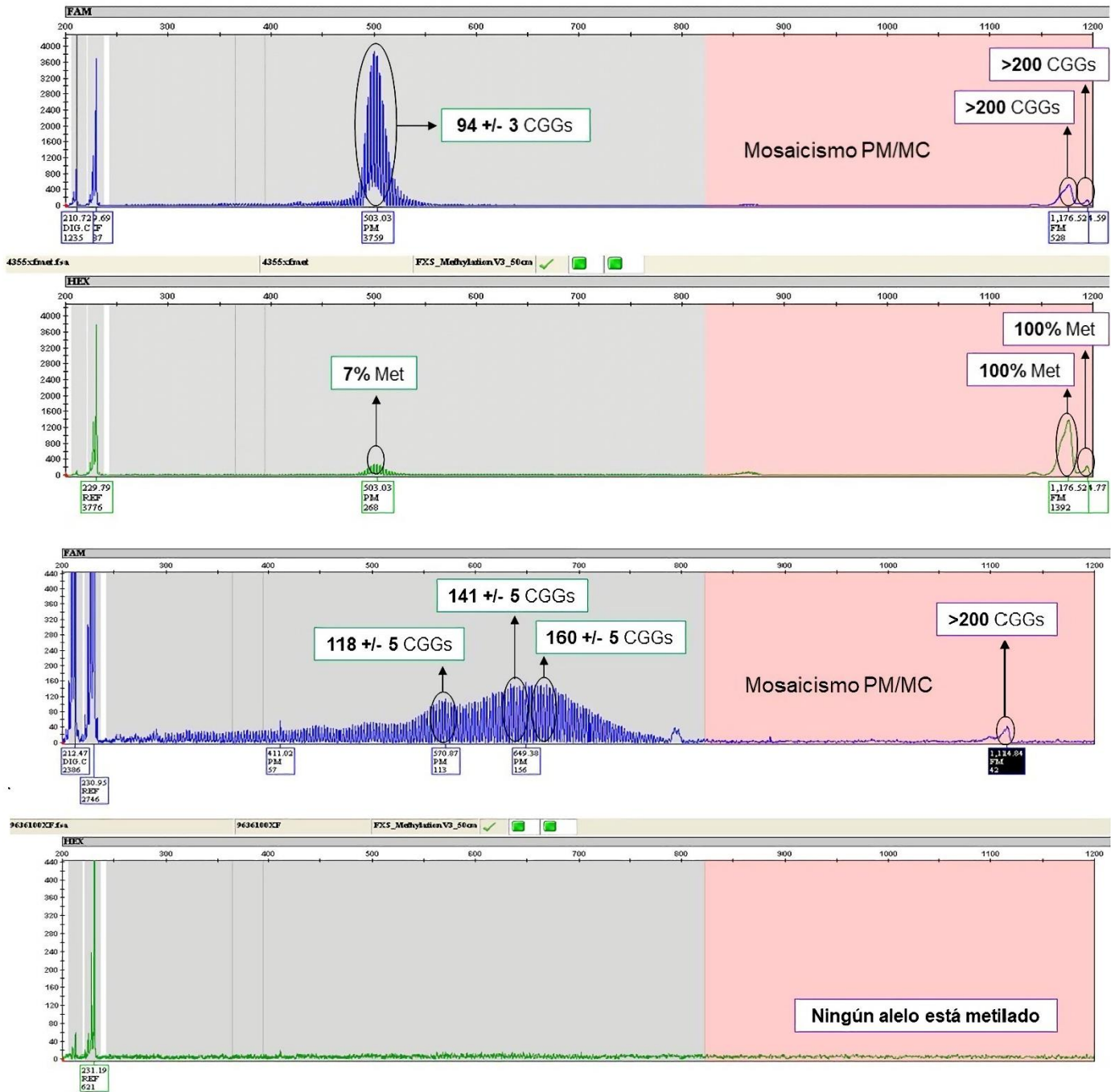


Figura 2. Electroferogramas obtenidos mediante análisis con el Kit AmplideX FMR1 mPCR (Asuragen). Estimación del porcentaje de metilación de los alelos en el rango de PM y MC del paciente (superior) frente a los de otro individuo también varón con mosaicismo PM/MC con el que se pretende comparar (inferior). Se observa que los alelos PM y especialmente el de MC del paciente no están metilados, a diferencia de lo que ocurre en los del individuo con el que se compara, donde los alelos con MC están 100% metilados. Se cree que este hecho podría justificar la ausencia de clínica de afectación cognitiva asociada al contexto del X frágil en este paciente.

Figure 2. Electropherograms obtained by analysis with the AmplideX FMR1 mPCR Kit (Asuragen). Estimation of the percentage of methylation of the alleles in the range of PM and CM of the patient (upper) compared to those of another individual male with PM/CM mosaicism (lower). It is observed that the PM alleles and especially the CM alleles of the patient are not methylated, unlike what happens in those of the individual with whom it is compared, where the CM alleles are 100% methylated. It is believed that this fact could justify the absence of symptoms of cognitive impairment associated with the fragile X context in this patient.

El síndrome de X frágil (FRAXA, MIM#300624) es la causa hereditaria más común de discapacidad intelectual y trastorno del espectro autista (1). Los pacientes afectados presentan por lo general, a partir del segundo año de vida, alteraciones severas del comportamiento como hiperactividad, impulsividad y ansiedad junto con dificultades del lenguaje. Las manifestaciones físicas incluyen orejas prominentes y desplegadas, cara alargada, pies planos, hiperextensibilidad articular, piel fina y macroorquidismo durante la pubertad.

El FRAXA es un trastorno dominante ligado al X con penetrancia incompleta causado más del 98% de las veces por la expansión de trinucleótidos citosina-guanina-guanina (CGG) en la región promotora del gen *FMR1* (Xq27.3) (NM_002024.5) que conduce a la metilación, silenciamiento transcripcional y reducción de los niveles de expresión de la proteína FMRP, implicada en la maduración y plasticidad sináptica. Otras dos enfermedades genéticas son causadas por premutación en gen *FMR1*: el síndrome de fallo ovárico precoz asociado al X frágil (FXPOI, MIM#311360) y el FXTAS (Fragile X Tremor/Ataxia Syndrome, MIM # 300623). El rango normal de repeticiones presente en alelos de individuos sanos es de 6-44 CGGs, alelos con 45-54 CGGs se denominan intermedios o de la "zona gris", los de 55-200 se consideran PM y aquellos con >200 CGGs presentan la MC. Se estima que la prevalencia de MC asociadas con FRAXA en la población general es de 1:5000 en varones y 1:4000-8000 en mujeres mientras que la de alelos PM varía entre 1:250-813 en varones y 1:110-270 en mujeres.

Fragile X syndrome (FRAXA, MIM # 300624) is the most common inherited cause of intellectual disability and autism spectrum disorder. Affected patients generally present, from the second year of life, severe behavioral disturbances such as hyperactivity, impulsivity and anxiety, along with language difficulties. Physical manifestations include prominent and spread ears, elongated face, flat feet, joint hyperextensibility, thin skin, and macroorchidism during puberty.

FRAXA is a dominant X-linked disorder with incomplete penetrance caused more than 98% of the time by the expansion of cytosine-guanine-guanine trinucleotides (CGG) in the promoter region of the *FMR1* gene (Xq27.3) (NM_002024.5) which leads to methylation, transcriptional silencing and reduction of the expression levels of the FMRP protein, involved in synaptic maturation and plasticity. Two other genetic diseases are caused by premutation in the *FMR1* gene: the early ovarian failure syndrome associated with fragile X (FXPOI, MIM # 311360) and FXTAS (Fragile X Tremor/Ataxia Syndrome, MIM # 300623). The normal range of repeats present in alleles of healthy individuals is 6-44 CGGs, alleles with 45-54 CGGs are called intermediate or "gray zone", those of 55-200 are considered PM and those with >200 CGGs present the CM. The prevalence of CM associated with FRAXA in the general population is estimated to be 1: 5000 in men and 1: 4000-8000 in women, while that of PM alleles varies between 1: 250-813 in men and 1: 110-270 in women.

Unlike CMs, which lead to epigenetic silencing

A diferencia de las MC, que llevan al silenciamiento epigenético de *FMR1* por metilación y modificación de histonas, las PM se asocian con una transcripción excesiva del gen, que resulta en los síndromes de FXPOI en mujeres y FXTAS en ambos sexos. Aproximadamente el 40% de los portadores de alelos PM masculinos y el 16% de los femeninos ≥ 50 años desarrollarán FXTAS, desorden neurodegenerativo asociado con temblor intencional, ataxia cerebelar, neuropatía y deterioro cognitivo. Además, el 20% de las mujeres premutadas desarrollarán FXPOI. Otros síntomas como depresión, apnea del sueño, hipertensión, ansiedad, piernas inquietas, migraña, fibromialgia e hipotiroidismo son más comunes en individuos premutados.

También se ha descrito la existencia de correlación entre el perfil de metilación de *FMR1* y el fenotipo clínico expresado por los pacientes afectados por estos síndromes, según los niveles de FMRP. Así, formas clínicas más leves se relacionan con la falta completa de metilación de *FMR1* en hombres y con un porcentaje de células con el alelo *FMR1* normal en el cromosoma X activo $>0,75$ en mujeres, aunque es raro que individuos portadores de MC permanezcan asintomáticos.

Por último, se ha encontrado que la expansión de las repeticiones CGG aumenta la inestabilidad de esa región, pudiendo favorecer la existencia de "mosaicisms de tamaño" definidos como la presencia de alelos con distinto número de CGGs en los distintos tipos celulares y "mosaicisms de metilación" en los que algunas células contienen alelos *FMR1* hipermetilados y otros alelos no metilados. En el caso de las mujeres, se ha demostrado que la presencia de repeticiones adenina-guanina-guanina (AGG) entre tripletes CGG incrementa la estabilidad de la región y disminuye el riesgo de expansión de CGGs en la descendencia.

of *FMR1* by histone methylation and modification, PMs are associated with excessive gene transcription, resulting in FXPOI syndromes in women and FXTAS in both sexes. Approximately 40% of males PM allele carriers and 16% of females ≥ 50 years old will develop FXTAS, a neurodegenerative disorder associated with intentional tremor, cerebellar ataxia, neuropathy, and cognitive impairment. Additionally, 20% of premutated women will develop FXPOI. Other symptoms such as depression, sleep apnea, hypertension, anxiety, restless legs, migraine, fibromyalgia, and hypothyroidism are more common in premutated individuals.

The existence of a correlation between the *FMR1* methylation profile and the clinical phenotype expressed by patients affected by these syndromes has also been described, according to FMRP levels. Thus, milder clinical forms are related to the complete lack of *FMR1* methylation in men and to a percentage of cells with the normal *FMR1* allele on the active X chromosome >0.75 in women, although it is rare for individuals with CM to remain asymptomatic.

Finally, it has been found that the expansion of CGG repeats increases the instability of that region, being able to favor the existence of "size mosaicisms" defined as the presence of alleles with different numbers of CGGs in the different cell types and "methylation mosaicisms" in which some cells contain hypermethylated *FMR1* alleles and other unmethylated. In the case of women, the presence of adenine-guanine-guanine (AGG) repeats between CGG triplets has been shown to increase the stability of the region and decrease the risk of CGG expansion in the offspring.

Bibliografía/References:

1. Hagerman RJ, Berry-Kravis E, Hazlett HC, et al. Fragile X syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17065.
2. Pugin A, Faundes V, Santa María L, et al. Aspectos clínicos, moleculares y farmacológicos en los trastornos asociados a gen 1 del retraso mental del X frágil. *Neurología*. 2017;32(4):241-252.
3. Jiraanont P, Kumar M, Tang HT, et al. Size and methylation mosaicism in males with Fragile X syndrome. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017;17(11):1023-1032.
4. Biancalana V, Glaeser D, McQuaid S, et al. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders. *Eur J Hum Genet*. 2015;23(4):417-425.
5. Milá M, Ramos F, Tejada MI; Grupo AEGH/CIBERER. Guía clínica de las enfermedades asociadas al gen FMR1: síndrome X frágil, insuficiencia ovárica primaria y síndrome de temblor-ataxia. *Med Clin (Barc)*. 2014;142(5):219-225.
6. Mila M, Alvarez-Mora MI, Madrigal I, et al. Fragile X syndrome: An overview and update of the FMR1 gene. *Clin Genet*. 2018;93(2):197-205.
7. Alvarez-Mora MI, Guitart M, Rodríguez-Revenga L, et al. Paternal transmission of a FMR1 full mutation allele. *Am J Med Genet A*. 2017;173(10):2795-2797.