

L. Castaño, J.R. Bilbao

An Esp Pediatr 1997;46:305-310.

Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (4): Estudio de mutaciones en ADN amplificado por PCR

Introducción

En el capítulo anterior empezamos la descripción de algunos útiles necesarios para la realización de estudios moleculares (por ej. las enzimas de restricción, *aptdo. 1*). Asimismo, enumeramos algunas técnicas de estudio para la detección de mutaciones (*aptdo. 3*), centrándonos en su análisis a partir de muestras de ADN total, es decir, buscábamos la mutación entre el ADN de todo el genoma (*aptdo. 3.1*). Además describimos un método (la técnica de "PCR" o Reacción en Cadena de la Polimerasa) que nos permitía amplificar un gen (aquel que nos interesaba estudiar) de entre todos los que forman el genoma (*aptdo. 2*).

En este capítulo vamos a enumerar brevemente las diferentes técnicas de detección de mutaciones, pero que utilizan como material de estudio el gen que nosotros queremos estudiar, y no todo el genoma como en el capítulo anterior. Para ello, el primer paso del estudio será siempre la amplificación por PCR del gen a analizar, pasando posteriormente a buscar la alteración génica en ese gen amplificado.

El estudio de mutaciones a partir de un gen amplificado por PCR (a diferencia del que puede realizarse a partir de todo el genoma), tiene la ventaja de rapidez en la obtención de resultados, y de la necesidad de cantidades mínimas de muestra inicial. El ejemplo más característico sería la posibilidad de estudiar muestras de Medicina Forense, donde se parte de mínimas cantidades de material biológico (una mancha de sangre en un tejido, un pelo, etc.). No se profundizará en los aspectos técnicos de las metodologías, ya que nuestro objetivo es familiarizarnos con la terminología que se utiliza cada vez más frecuentemente en el análisis genético de diferentes patologías clínicas (Tabla I).

3.2. Métodos de análisis en genes previamente amplificados por PCR

3.2.1. Detección de mutaciones por PCR

En algunos casos, un simple método de PCR (*véase cap. 3, aptdo. 2*) puede ser útil para permitirnos descubrir una alteración

Tabla I Diferentes metodologías de análisis genético enumeradas en esta revisión, en función del material de partida

Formas de estudio de mutaciones	
En genoma completo	En fragmentos de PCR
- FISH (Hibridación <i>in situ</i> en cromosomas)	- PCR - RFLP
- Southern Blot - RFLP	- PCR - Alelo-específica
- Hibridación Dot Blot	- PCR - SSCP
	- PCR - DSCP
	- PCR - DGGE
	- Secuenciación directa

ción en un gen. Por ejemplo, cuando existe una delección génica. En ese caso cuando intentamos su amplificación por PCR a partir del ADN total del individuo que tiene la alteración, no se obtiene producto de amplificación alguno, ya que ésta no se puede realizar si el gen en cuestión no existe en el ADN del individuo (Fig. 1). Un ejemplo de esta estrategia sería la detección de genes del cromosoma Y en algunos individuos con síndromes de pseudohermafroditismo masculino.

También un simple método de amplificación por PCR nos permite visualizar cambios en el tamaño de un gen (aumento o disminución), que traduzcan pequeñas inserciones o deleciones de fragmentos del mismo (Fig. 2).

3.2.2. Amplificación por PCR alelo-específica

Una variante de la reacción de PCR como método de estudio molecular es la PCR alelo-específica. Como se ha visto en el capítulo anterior (*aptdo. 2*) la amplificación de un gen por PCR viene determinada por la inclusión en la reacción de amplificación de dos primers o cebadores que flanquean el fragmento a amplificar (recordamos que los primers son complementarios a los extremos del fragmento que queremos amplificar, al que se pegan, y que su función es la de iniciar la duplicación de la doble cadena de ADN). En el análisis de mutaciones que ya son conocidas (por ejemplo en el estudio de miembros de una familia en la que se ha encontrado una mutación en un individuo), es posible diseñar cebadores alelo-específicos (con un cambio de una base, correspondiente a la mutación), para que únicamente se unan, y consecuentemente sean amplificados aquellos alelos que presenten una determinada mutación

Unidad de Investigación, Departamento de Pediatría, Hospital de Cruces, Barakaldo, Vizcaya.

Correspondencia: Dr. Luis Castaño. Unidad de Investigación, 2ª planta Edif. Anatomía Patológica. Hospital de Cruces, Plaza de Cruces s/n, 48903 Barakaldo, Vizcaya.

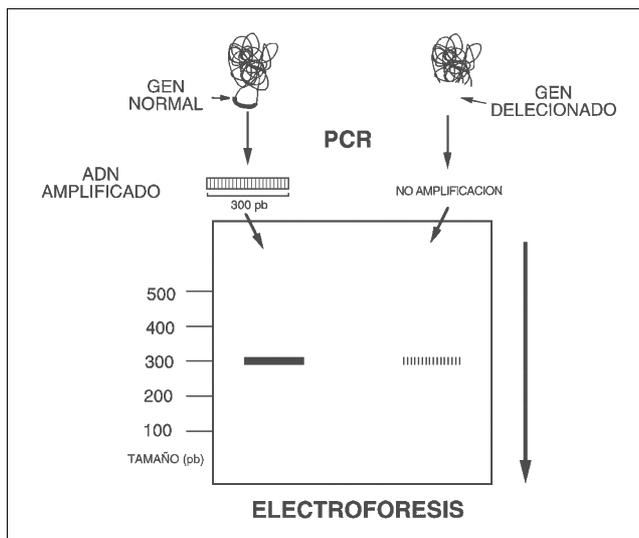


Figura 1. Esquema de detección de una mutación (delección de un gen) mediante una reacción de PCR. En el individuo que sufre la delección, la PCR es incapaz de amplificar el gen ausente. En la electroforesis posterior, donde los fragmentos amplificados migran en función de su tamaño, no se observa la banda correspondiente al gen a la altura de 300 pb (línea discontinua), que sí aparece en el individuo normal (línea gruesa). pb: pares de bases.

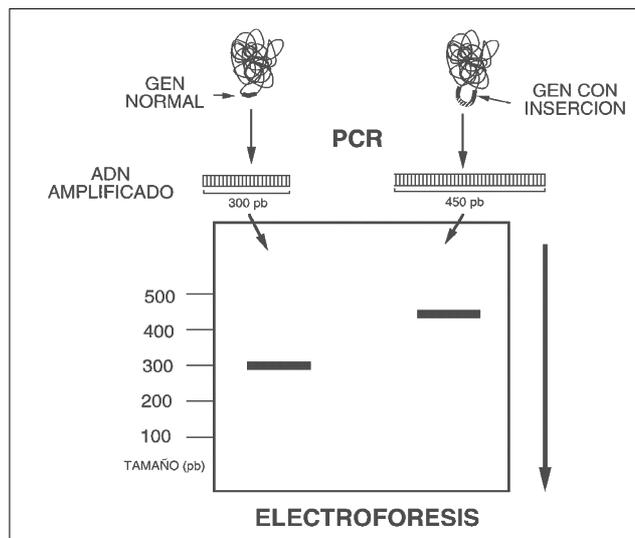


Figura 2. Esquema de la detección de una inserción por PCR. El fragmento amplificado en el individuo con la inserción es de mayor tamaño (450 pb) que el normal (300 pb), con lo que migra más lentamente en el gel de electroforesis, recorriendo una distancia menor. La flecha gruesa indica la dirección de migración de las moléculas de ADN.

en su secuencia. Así, en la propia reacción de PCR, se amplificarán los alelos mutados, pero no los normales.

3.2.3. Método PCR-RFLP

Es una técnica muy frecuentemente utilizada en los estudios moleculares, y consiste en la combinación de dos métodos básicos en el trabajo molecular. En primer lugar se realiza una amplificación por PCR del gen que queremos estudiar, y posteriormente se realiza la digestión (o corte en fragmentos) del producto amplificado con enzimas de restricción, para ver los fragmentos resultantes o fragmentos de restricción de ese gen. Este método es útil para detectar pequeñas inserciones o delecciones en determinados fragmentos de restricción de un gen, ya que el tamaño de los mismos se verá aumentado o disminuido, respectivamente (Fig. 3). En otros casos, ciertas mutaciones puntuales en un gen, que alteran la secuencia de nucleótidos del mismo, pueden crear nuevos sitios de restricción o hacer desaparecer aquellos presentes en el gen normal, lo que alterará el patrón de los fragmentos de restricción observables en electroforesis (Fig. 4).

3.2.4. PCR-SSCP (Single-Stranded Conformational Polymorphism)

Desde su descripción a finales de la década de los 80, la técnica de análisis de polimorfismos de cadenas sencillas de ADN se ha convertido en la técnica más utilizada en el despistaje de mutaciones puntuales. El fundamento teórico de la técnica consiste en que cadenas sencillas de ADN, una vez separadas de su complementaria, adoptan una conformación (repliegue sobre

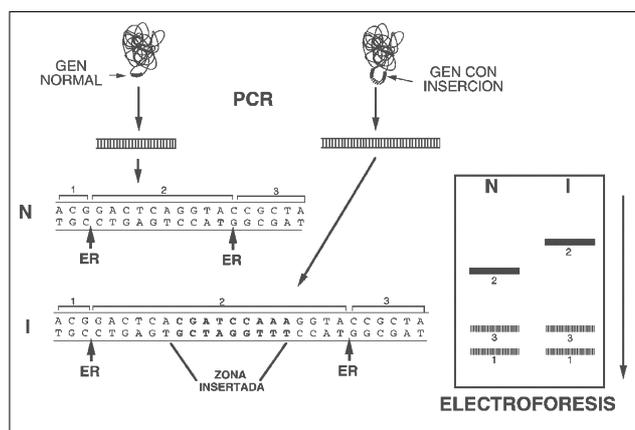


Figura 3. Esquema de detección de una inserción por PCR-RFLP. Tras la reacción de PCR, las muestras amplificadas se someten a digestión (corte) con enzimas de restricción. El fragmento central (2) del individuo con la inserción (I) es de tamaño superior al normal (N), con lo que migra menor distancia en el gel. Los otros dos fragmentos (1 y 3) no han sufrido alteración, con lo que sus posiciones son las mismas en ambos sujetos.

sí mismas) que depende de su secuencia nucleotídica. La migración de estas moléculas monocatenarias en electroforesis no ocurre en función de su tamaño (como es el caso de la electroforesis de ADN bicatenario), sino de su conformación espacial. Cambios de una sola base (mutaciones puntuales) son suficientes para alterar la conformación de una cadena sencilla de ADN, y por tanto su migración en electroforesis, apareciendo patrones de bandas diferentes entre formas normales y mutadas de un gen (Fig. 5).

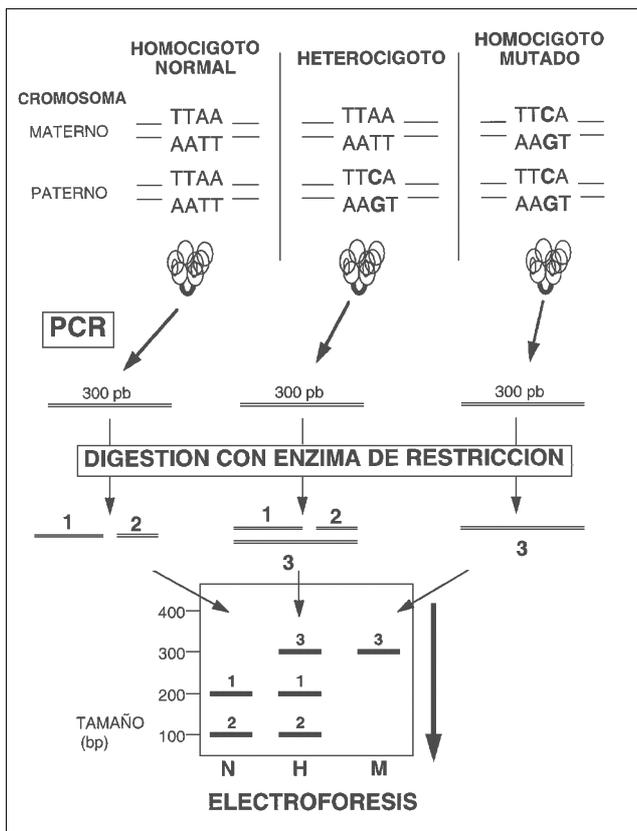


Figura 4. En ocasiones, las mutaciones puntuales pueden destruir un lugar de restricción del fragmento, de manera que no puede ser digerido con la enzima de restricción. En este ejemplo se presenta un individuo homocigoto normal (N), en el que la totalidad de su producto de PCR, correspondiente al alelo materno y paterno se digiere en dos fragmentos menores (1 y 2), un sujeto homocigoto para la mutación (M), en el que ninguno de los alelos puede ser digerido, y el tamaño de la banda es idéntico al del amplificado por PCR (3). Un individuo heterocigoto (H), que podría considerarse "portador", presentará el alelo normal, digerido en 1 y 2, correspondiente al alelo materno, y un alelo mutado (3) correspondiente a su alelo paterno.

La sencillez de la técnica y la posibilidad de valorar simultáneamente gran número de muestras son sus ventajas más destacables. No obstante, su limitación fundamental estriba en que la mutación no es localizada; es decir, se detecta la presencia de alteración en determinado fragmento de ADN, pero su posición exacta y el tipo de mutación sólo pueden determinarse por secuenciación.

3.2.5. PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

La detección de mutaciones mediante electroforesis en gradiente desnaturalizante se basa en dos características del ADN. Por una parte, y como se comentó en el capítulo 1, las moléculas de doble cadena de ADN se desnaturalizan (se separan sus dos hebras) cuando se someten a altas temperaturas (o a agentes químicos como urea, formamida,...). La temperatura (o la concentración de agentes químicos) a la que una molécula de ADN se separa en sus dos cadenas depende de su secuencia nu-

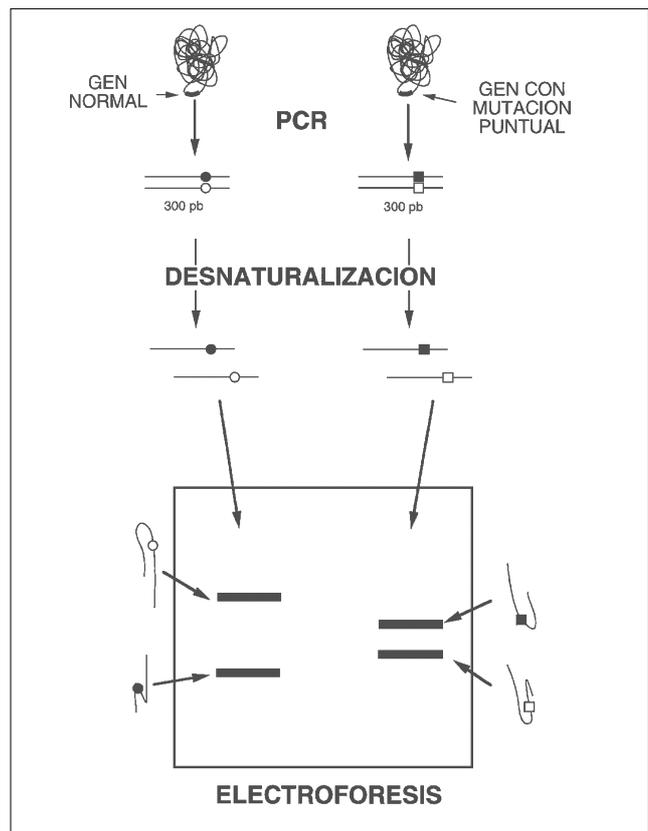


Figura 5. Esquema de un experimento de PCR-SSCP. El cambio de un solo nucleótido de una molécula de ADN amplificada por PCR, provoca que las cadenas sencillas obtenidas por desnaturalización adopten formas (conformaciones) diferentes, y migran de forma distinta en un gel de electroforesis. El patrón de bandas resultante no está relacionado con el tamaño de la cadena (que es el mismo), y la diferencia observable en el gel con respecto al patrón de individuos normales denota la presencia de una alteración en la secuencia. La posición y naturaleza de la mutación no se detectan con este método.

cleotídica. Una molécula de ADN con un cambio puntual, poseerá una temperatura de desnaturalización diferente a la de la molécula no mutada, con lo que su migración en electroforesis se verá afectada.

En la práctica, la técnica consiste en realizar una electroforesis en un gel con un gradiente de sustancias desnaturalizantes (DGGE), o de temperatura (TGGE - *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) y comparar el patrón de bandas obtenido con el patrón de bandas en individuos normales (Fig. 6). Como en los casos anteriores, el DGGE es una técnica de screening poblacional, y la localización y descripción de la mutación requiere de una secuenciación posterior del gen mutado.

3.3. Secuenciación directa de ADN

La determinación de la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN, y su comparación a una secuencia normal, es la demostración definitiva de la existencia de una alteración en el mismo. Además, al mismo tiempo que la mutación se detecta,

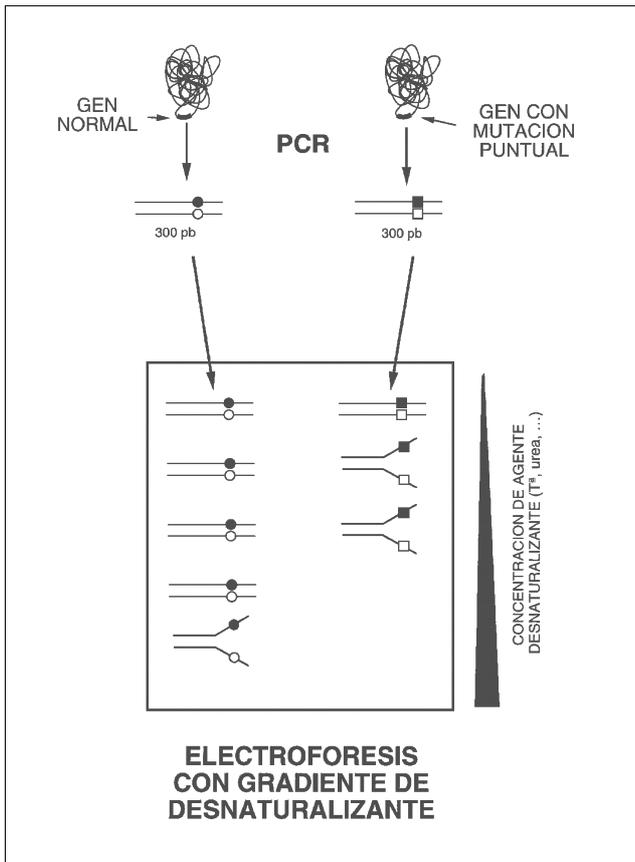


Figura 6. Experimento de DGGE. Las mutaciones puntuales influyen en la manera en que una molécula de ADN se desnatura. En el ejemplo, la alteración provoca una desnaturalización de la molécula mutada a una temperatura (o concentración de urea, formamida,...) inferior a la de la molécula normal. La molécula mutada, una vez desnaturalizada migra mucho más lentamente que la forma normal, con lo que aparecerá más arriba en el gel. Este método tampoco localiza la mutación.

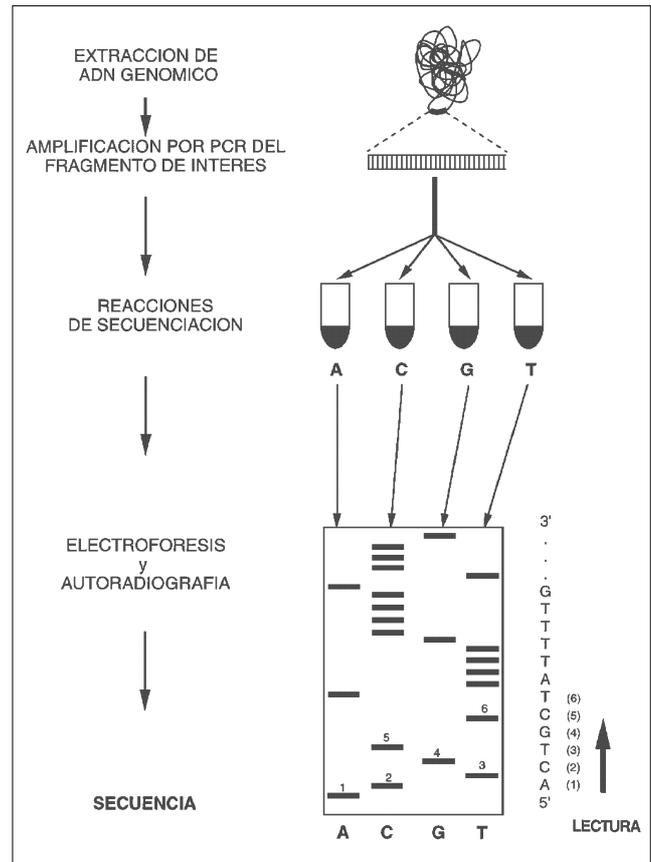


Figura 7. Esquema de la secuenciación de ADN. Este método es el más preciso para detectar mutaciones, ya que determina su posición y el tipo de alteración génica presente. Las reacciones de secuenciación se corren en calles independientes (una para cada nucleótido) de geles largos, y la posterior autorradiografía muestra una serie de bandas cuya posición corresponde a la de ese nucleótido en el fragmento secuenciado. Se "leen" de abajo hacia arriba, como se muestra en la figura y la secuencia de este fragmento, sería: 5' ACTGCTATTTTGTCCCATCCG 3'

se obtiene información referente a su localización en el gen y a las consecuencias de la sustitución, delección o inserción de nucleótido(s) en la proteína sintetizada (véase cap. 2).

La metodología de secuenciación utilizada en la actualidad, que escapa a las pretensiones de este resumen, se basa, con algunas modificaciones, en la técnica descrita por Sanger en 1977, y se fundamenta en cuatro reacciones (una para cada nucleótido A, C, G y T) de polimerización controladas y la posterior electroforesis de cada reacción. Un esquema de un experimento de secuenciación se muestra en la **figura 7**.

Hasta no hace mucho tiempo, el uso de la secuenciación de ADN como técnica de screening se hacía impensable, debido a la laboriosidad de los métodos de secuenciación, el elevado tiempo transcurrido hasta la determinación de la secuencia y la necesidad de uso de isótopos radiactivos. No obstante, en los últimos años, la aparición de máquinas automáticas de secuenciación basadas en técnicas no radiactivas (fluorescencia) y una simplificación de los métodos, hacen factible la secuenciación

generalizada para la búsqueda de mutaciones, siempre y cuando se disponga del equipo necesario.

4. Consideraciones finales

En resumen, la utilización de los diferentes métodos en la detección de mutaciones (Tabla I) dependerá de cada circunstancia, teniendo en cuenta el gen que se desea estudiar, el conocimiento previo de la mutación que se quiere detectar, y la tecnología disponible. Los tres primeros métodos (PCR sencillo, PCR alelo-específica y PCR-RFLP) son muy sencillos de llevar a cabo, pero se limitan a aquellos casos en los que la mutación ya ha sido definida por secuenciación (para diseñar los cebadores o conocer la enzima de restricción que se ha de utilizar). Estas técnicas son especialmente útiles para estudiar la distribución de la mutación en otros individuos (familiares, etc.).

Tanto el SSCP como el DGGE son capaces de detectar mutaciones no identificadas anteriormente, y son muy útiles en el

Tabla II Ventajas y desventajas de estudios basados en el análisis de ADN o ARN

	<i>ADN genómico</i>	<i>ARN mensajero</i>
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> - Muy accesible (sangre) - Representación de ambos alelos - Posible demostración de mutaciones en regiones promotoras y de <i>splicing</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Análisis de regiones codificantes largas - Menor número de reacciones de PCR - No es necesario conocer la estructura intrón-exón del gen
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> - Necesidad de conocer la localización de exones e intrones - Análisis de exón en exón - Mayor número de reacciones de PCR 	<ul style="list-style-type: none"> - Probable inaccesibilidad de muestras - Posible representación desigual de los dos alelos en el ARNm - Imposibilidad de detectar mutaciones en la región promotora o de <i>splicing</i>

screening poblacional. No obstante, tienen limitaciones de sensibilidad y además, su puesta a punto puede resultar laboriosa. Otras técnicas de screening de utilización más restringida, y cuya descripción escapa el interés de este capítulo son, por ejemplo, la reacción de corte con RNasa (**RNase cleavage**), el análisis de polimorfismos de conformación de dobles cadenas (**DSCP**), etc. Por otro lado, una vez conocida la existencia de una mutación por cualquiera de estos dos métodos, es necesario determinar la secuencia de nucleótidos para precisar su localización y el tipo de cambio producido.

5. Alteración genómica y función

Por otra parte, es importante recordar que una vez detectada e identificada la alteración en la secuencia de nucleótidos, es necesario definir en qué medida dicho cambio puede influir en la funcionalidad biológica del gen alterado. Las alteraciones que causan mutaciones *nonsense* o sin sentido (aquellas que producen un codón de terminación), o *frameshift* o de cambio de pauta de lectura, eliminan completamente la actividad proteica, ya que truncan su síntesis prematuramente o producen un péptido diferente, respectivamente (véase *cap. 2*). No obstante, los efectos de mutaciones que causan la sustitución de un único aminoácido (*missense*), o alteraciones de regiones intrónicas o no traducidas no son siempre los mismos. En algunos casos, pueden suponer la pérdida total de actividad, pero en otros pueden no tener efectos tan dramáticos, e incluso ser simplemente formas polimórficas normales de la población (no asociadas a patología). En estos casos son necesarios estudios funcionales, bien *in vivo* o *in vitro*, o estudios familiares y poblacionales que confirmen la asociación del cambio genómico con el fenotipo patológico.

6. ARN versus ADN

Hasta ahora, hemos enumerado métodos de detección de mutaciones a partir de ADN. No obstante, también existe la posibilidad de realizar el estudio de mutaciones a partir de ARN mensajero (ARNm). Como se explicó en el *capítulo 2*, el ARNm puede ser convertido en ADN complementario (ADNc) por el método de la retrotranscripción. Posteriormente, este ADNc puede ser amplificado por PCR y analizado con la misma metodología que el ADN genómico. Por lo tanto, el investigador puede

de elegir realizar el estudio en ADN o en ARNm, o lo que es lo mismo, analizar la totalidad del gen o solamente las regiones codificantes o exones.

En general, los estudios genéticos se realizan en ADN genómico por su fácil disponibilidad a partir de sangre periférica. No obstante, cuando es posible la obtención de ARNm (de una biopsia o cultivo celular, por ejemplo) su estudio parece en principio más práctico, ya que se pueden analizar segmentos más largos de la región codificante de una sola vez. Hay que recordar que los intrones pueden representar grandes extensiones de ADN, que no aparecen en el ARNm (*cap. 1*). No obstante, cuando se van a utilizar técnicas cuya sensibilidad se ve afectada por la longitud de los fragmentos analizados (como el SSCP, DGGE), es más interesante analizar los exones de forma independiente, amplificándolos de uno en uno a partir del ADN genómico. Además, en algunas patologías, es posible que la mutación haya alterado la expresión del alelo mutado, de forma que en el ARNm sólo esté representado el alelo normal, y sería necesario buscar la mutación en ADN genómico. En la **tabla II** se resumen las ventajas y desventajas de cada uno de los estudios, teniendo en cuenta que se trata de consideraciones generales, que han de adaptarse a cada situación concreta.

Glosario

Denaturing gradient gel electrophoresis: Véase PCR-DGGE

DGGE: Véase PCR-DGGE

Double-stranded conformational polymorphism: Polimorfismo conformacional de cadenas dobles; véase PCR-DSCP

Electroforesis en gel con gradiente de temperatura: Véase PCR-TGGE

Electroforesis en gel con gradiente desnaturante: Véase PCR-DGGE

PCR alelo-específica: Método selectivo de amplificación PCR, que tiene la particularidad de utilizar primers específicos para determinadas variantes, con lo que solo se amplifican aquellos alelos que presenten esa variante.

PCR-DGGE: Método de *screening* para la detección de mutaciones puntuales, basado en los cambios en la desnaturación

ción de las moléculas de ADN en función de su secuencia, y la diferente migración de secuencias diferentes en geles con un gradiente de agentes desnaturizantes.

PCR-DSCP: Método de screening para la detección de mutaciones puntuales, basado en la migración alterada de cadenas dobles de ADN en geles de matrices complejas.

PCR-RFLP: Método que permite detectar mutaciones, combinando una amplificación por PCR y una posterior digestión con enzimas de restricción. Permite detectar cambios en los tamaños de los fragmentos de restricción.

PCR-SSCP: Método de screening para detección de mutaciones puntuales desconocidas, basado en las características de migración en electroforesis de cadenas sencillas de ADN, en base a su secuencia.

PCR-TGGE: Variante de PCR-DGGE, en el que el gradiente desnaturizante corresponde a variaciones de temperatura a lo largo del gel.

Polimorfismo conformacional de cadenas sencillas: Véase PCR-SSCP

Secuenciación de ADN: Método para la determinación de la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN.

Single Stranded Conformation Polymorphism: Véase PCR-SSCP

SSCP: Véase PCR-SSCP

Temperature gradient gel electrophoresis: Véase PCR-TGGE

Bibliografía

- 1 Castaño L, Bilbao JR. Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (1): Conceptos básicos. *An. Esp. Pediatr.* 1996;**45**: 315-320.
- 2 Castaño L, Bilbao JR, Urrutia I. Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (2): Purificación de ácidos nucleicos. *An. Esp. Pediatr.* 1996;**45**: 541-546.
- 3 Castaño L, Bilbao JR, Calvo B. Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (3): Enzimas de Restricción. Reacción en cadena de la polimerasa. Formas de estudio de mutaciones. *An. Esp. Pediatr.* 1997;**46**: 87-92.
- 4 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. New York, 1989.
- 5 Grompe M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat. Genet.* 1993;**5**: 111-117, .
- 6 Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Struhl K. *Current protocols in molecular Biology*. Ed. J. Wiley & Sons, 1st Ed., 1994.
- 7 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977;**74**: 5463-5467.