

SEQUENCIACIÓ DIRECTA DE L'EXO 17 DEL GEN DE LA PROTEINA AMILOIDE IMPLICAT EN LA MALALTIA D'ALZHEIMER FAMILIAR.

Rosa Adroer, Cristina López-Acedo i Rafael Oliva. Grup de Genètica Molecular, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.

RESUM

La seqüenciació directa de l'exó 17 del gen del precursor de la proteïna amiloide (APP: "Amyloid Protein Precursor"), ha permès identificar 3 tipus diferents de mutacions patogèniques relacionades amb la malaltia d'Alzheimer familiar (FAD: "Familial Alzheimer's Disease"). Aquestes mutacions es troben amb una freqüència molt baixa la qual cosa implica haver d'estudiar nombroses mostres per tal d'identificar noves famílies afectades i això és laboriós i llarg. Per poder identificar aquestes mutacions en altres països i buscar noves mutacions en el gen APP, hem optimitzat el procediment i hem reduït el temps necessari per a la preparació de les mostres d'11 hores a 3 hores i mitja.

INTRODUCCIÓ

El 1907 Alois Alzheimer va descriure el primer cas de la malaltia que porta el seu nom (Alzheimer) com una alteració del sistema nerviós que resultava en una pèrdua de la memòria i de les funcions intel·lectuals. Aquesta malaltia es correlaciona amb l'aparició d'un acúmul de proteïna en el sistema nerviós en forma de plaques extracel·lulars o plaques senils, i amb la presència de cadenes neurofibrilars i amiloide cerebrovascular (Glennner, 1991; Selkoe, 1991; Katzman and Saitoh, 1991; Holtzman and Mobley, 1991). La malaltia apareix típicament a partir dels 60 anys d'edat tot i que també poden aparèixer alguns casos a partir dels 40 anys. Aquests últims serien els casos pre-senils. És en malalts pre-senils i familiars (on la malaltia s'hereda amb un patró autosòmic dominant) que es va detectar la primera mutació (Goate et al., 1991). Aquesta consisteix en una substitució d'una Valina per una Isoleucina a nivell del codó 717, i per aquest motiu s'anomena mutació APP717 Val-Ile. Fins el dia d'avui s'ha detectat la mutació en 5 famílies: 1 a Anglaterra (Goate et al., 1991), 1 als E.E.U.U. (Goate et al., 1991), i 3 al Japó (Naruse et al., 1991; Yoshioka et al., 1991). Posteriorment s'han descobert dues mutacions més localitzades a nivell del codó 717: en un cas la Valina és substituïda per Glicina (Chartier-Harlin et al., 1991), i en l'altre és substituïda per Fenilalanina (Murrell et al., 1991). Nosaltres hem optimitzat el mètode de preparació de les mostres per seqüenciar descrit per Goate et al. (1991) i l'hem reduït d'11 hores a 3 i mitja. Aquest mètode ens permet buscar de forma senzilla la mutació APP717 en malalts pertanyents a l'Estat Espanyol.

MATERIALS I METODES

La reducció de temps en el processat de les mostres abans de la seva seqüenciació ha estat possible realitzant una sola reacció de PCR ("Polymerase Chain Reaction") en comptes de dues (la primera per amplificar l'ADN, i la segona per obtenir ADN de

cadena senzilla), i estandaritzant el mètode de purificació de cadena senzilla basat en l'afinitat amb esferes magnètiques recobertes d'estreptavidina i la subseqüent seqüenciació directa.

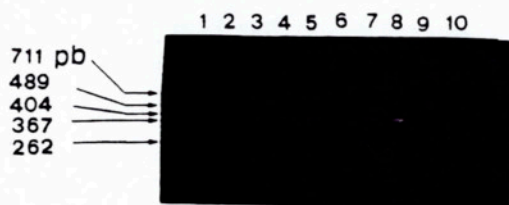


Fig. 1.- Amplificació d'ADN de leucòcits de diferents malalts d'Alzheimer (carrils 1 al 10).

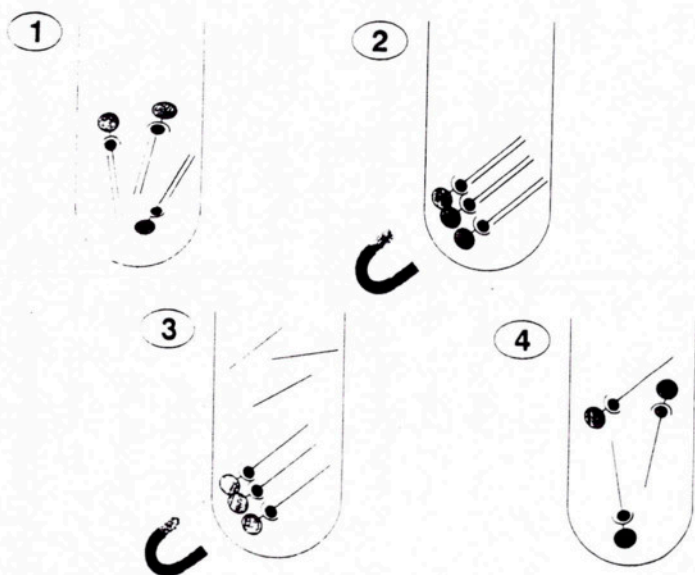


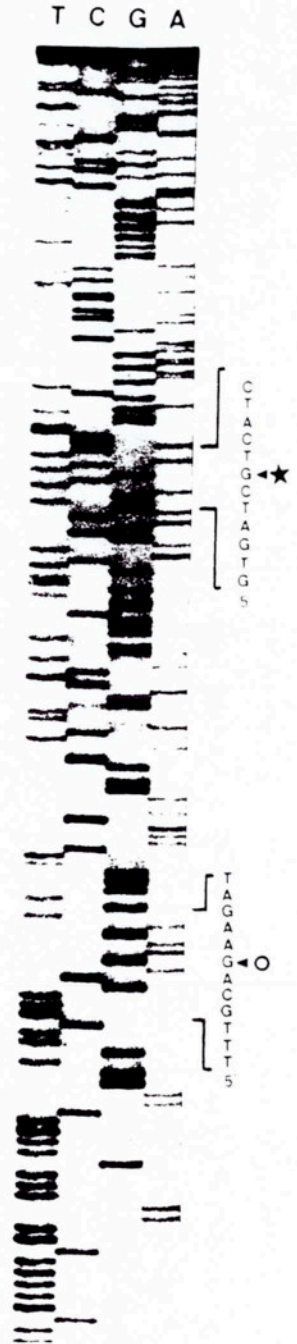
Fig. 2.- (1) Producte de PCR + esferes magnètiques recobertes d'estreptavidina. (2) Captura de l'ADN amb MPC. (3) Desnaturalització de l'ADN. (4) Elució de la cadena no biotinitilada.

Les reaccions d'amplificació es realitzen amb 20 ng d'ADN, 10 pmols de cada encebador (1: biotina-GCCTAATTCTCTCATAGTCTTAATT CCCAC-3' i 2: 5'-GTTGGGCAGAGAATATACTGA-3'), 200 µM de dNTP's, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl i 1 unitat de Taq polimerasa en un volum final de reacció de 25 µl. Les condicions de PCR són: una desnaturalització inicial de 5 min. a 94 °C, seguida de 35 cicles consistents en 1 min. a 60 °C, 1 min. a 72 °C i 1 min. a 94 °C, amb una elongació final de 5 min. a 72 °C (Fig. 1). Per purificar cadena senzilla mitjançant esferes magnètiques recobertes d'estreptavidina es va utilitzar el protocol del fabricant amb algunes modificacions: 20 µl de la reacció de PCR es barregen amb Dynabeads M-280 pre-reatats (10 µl de Dynabeads reatats 3 vegades amb 200 µl de TWS: 0.17% Triton-x-100, 500 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA pH 8.0, i resuspès en 80 µl de TWS) a temperatura ambient en una plataforma rotatòria durant 30 min. Els Dynabeads són separats amb un imán (MPC: "Magnetic Particle Concentrator") i rentats dues vegades amb 20 µl de TWS. Segudament es resuspèn amb 32 µl de TE i s'afegeix 8 µl de NaOH 1M / EDTA 4 mM per desnaturalitzar les dues cadenes del producte de PCR. En aquest punt la cadena d'ADN que conté biotina al seu extrem 5' queda fortament lligada a les esferes magnètiques recobertes d'estreptavidina, mentre que l'altra cadena que no té biotina queda lliure en solució. Eliminem aquesta cadena lliure amb l'ajuda del MPC quedant-nos només amb la cadena unida a les esferes que es renten dues vegades amb 200 µl de TWS i es resuspèn amb 7 µl d'aigua (Fig. 2). La mostra és a punt per ser seqüenciada amb l'encebador 2, seguint el protocol de la Sequenase 2.0 (USB).

RESULTATS

En la figura 3 es pot observar una seqüència obtinguda per aquest mètode. S'obté una seqüència clara del fragment corresponent a l'exó 17 del gen de l'APP on podem buscar si existeix el nucleòtid mutat a nivell del codó 717.

Fig. 3.- Seqüència no mutada de l'exó 17 del gen APP d'un individu afectat d'Alzheimer. ★ Lloc de la mutació APP717 Val-Ile. O Lloc de la mutació de l'Hemorràgia Cerebral tipus Dutch (HCHWA-D: "Human Cerebral Hemorrhage With amyloidosis Dutch type").



Fins ara hem estudiat 54 mostres per aquest procediment i en cap d'elles hem trobat la mutació APP717 Val-Ile, tampoc hem trobat les substitucions Val-Gly ni Val-Phe. Una altra mutació relacionada amb l'exó 17 és la de l'Hemorràgia Cerebral tipus Dutch situada al codó 693, que tampoc hem trobat en cap de les mostres.

Les 54 mostres estudiades corresponen a:

- 19 malalts familiars i pre-senils.
- 18 malalts esporàdics i pre-senils.
- 10 malalts familiars i senils.
- 1 malalt esporàdic i senil.
- 6 controls normals.

Aquests resultats situen el percentatge de malalts d'Alzheimer afectats per les mutacions APP717 a nivell mundial en un 2.8 %.

DISCUSSIO

Aquest mètode és de gran utilitat per a fer un "screening" ràpid de la mutació 717 en un nombre elevat de mostres, i per buscar altres possibles mutacions de l'APP a nivell d'altres exons. És un procediment més ràpid i eficient que altres mètodes alternatius com ara la subclonació del producte de PCR, seqüenciar cadena doble o fer PCR asimètric seguit de purificació de l'ADN.

La digestió del producte de PCR de l'exó 17 amb *Bcl I* produeix dues bandes extremes si existeix la mutació APP717 Val-Ile, però no pot detectar altres possibles mutacions. Una altra alternativa a la seqüenciació de l'ADN és la tècnica del SSCA ("Single Stranded Conformation Analysis") (Orita et al., 1989), però aquesta tècnica no és més ràpida que la seqüenciació directa i no pot identificar tots els canvis a nivell de nucleòtids.

La disponibilitat d'aquest mètode permetrà buscar de forma molt més ràpida i eficient les mutacions de l'exó 17 del gen de l'APP en els diferents malalts.

Aquest treball ha estat subvencionat per l'ajuda d'investigació de la "Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología" (CICYT) SAL90-0334, 1990-1993 i pel III Premi Upjohn d'ajuda a la investigació a R.O., i per les beques F.P.I. del "Ministerio de Educación y Ciencia" a R.A. i F.P.I. de la Generalitat de Catalunya a C.L.-A.

BIBLIOGRAFIA

- Adroer, R., Chartier-Harlin, M.-C., Crawford, F. and Oliva, R. (1992) *Neurosci. Lett.* (in press).
- Chartier-Harlin et al., (1991) *Nature*, 353, 844-846.
- Glenner, G.G. (1991) *Encyclopedia of Human Biology*, 1, 209-216.
- Goate et al., (1991) *Nature*, 349: 704-706.
- Holtzman, D.M. and Mobley, W.C., (1991) *TIBS*, 16, 140-144.
- Katzman, R. and Saitoh, T., (1991) *FASEB*, 5, 278-286.
- Murrell et al., (1991) *Science*, 254, 97-99.
- Naruse, S., Igarashi, S. et al. (1991) *Lancet*, 337, 978-979.
- Orita et al., (1989) *Genomics*, 5, 874-879.
- Selkoe, D.J. (1991) *Neuron*, 6, 487-498.
- Yoshioka et al., (1991) *BBRC*, 178, 1141-1146.