
Mapeo cromosómico y refinamiento de la localización de un gen de glaucoma en 2cen-2q12 en una familia peruana: Avances hacia la identificación del gen GLC1B

María Luisa Guevara-Fujita*, Rodolfo Pérez-Grossman**, Enrique Vargas*** y Ricardo Fujita*

RESUMEN

La genética molecular es una herramienta que está revelando los genes responsables de enfermedades hereditarias, incluso algunos de ellos han sido ya identificados y caracterizados. En otros genes la identificación está más cercana porque se les ha localizado (mapeado) en regiones cromosómicas específicas donde su búsqueda se refina paulatinamente. El glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) es una anomalía hereditaria que sin tratamiento puede llevar a la ceguera, pero si es detectado tempranamente, permite preservar la visión. Hay 6 loci (genes) para GPAA: GLCIA localizado en la región cromosómica 1q24.3-q25.2, GLCIB (2cen-q13), GLCIC (3q21-q24), GLCID (8q23), GLCIE (10p14-p15) y GLCIF (7q35-q36). Hemos estudiado varias familias peruanas con GPAA para analizar su asociación con marcadores en las regiones mencionadas. Una familia de Chíncha ha mostrado cosegregación con marcadores de 2cenq13 indicando que el glaucoma en esta familia pertenece a GLCIB. Un análisis posterior con más familiares nos revela una recombinación que restringe la región crítica para GLCIB a 2cen-q12. Esta reducción en términos genómicos descarta varios millones de nucleótidos y muchos genes de 2q13 facilitando la identificación de GLCIB.

Palabras claves: Diagnóstico molecular, enfermedades genéticas, glaucoma, mapeo, ligamiento genético.

ABSTRACT

Molecular genetics is an important tool to elucidate the cause of hereditary diseases. One of the strategies used in this type of studies, is to map the gene responsible of the disease to a specific chromosome region. This has helped in the characterization of some genes, but others remain to be identified. Primary Open Angle Glaucoma (POAG) is a hereditary disease that can lead to blindness if untreated. There are six loci for POAG: GLCIA on chromosome region 1q24.3-q25.2, GLCIB (2cen-q13), GLCIC (3q21-q24), GLCID (8q23), GLCIE (10p14p15) y GLCIF (7q35-q36). In a study of several POAG Peruvian families we have characterized one that cosegregates with markers of chromosome 2 corresponding to a new reported family for GLCIB located at 2cen-2q13. One additional individual in the family reveals genetic recombination that refines the position to a smaller region in 2cen-q12 eliminating several millions of base pairs in the search of the GLCIB gene.

Key Words: Molecular Diagnosis, Genetic diseases, Glaucoma, Mapping Genetic Linkage.

INTRODUCCION

El Glaucoma es una de las principales causas de ceguera a nivel mundial y se debe a una neuropatía óptica con disminución de los axones provenientes de las células ganglionares de la retina (1). La mayoría de los glaucomas está asociada a una malla trabecular de apariencia normal y se les llama glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA). El glaucoma juvenil es un GPAA de aparición temprana y es heredado de una forma dominante. El mecanismo molecular no se conoce del todo bien, se postula la acumulación de una sustancia proteica y/o glicoproteica entre las células de la malla trabecular que causa obstrucción al libre pasaje del humor acuoso (2). El tratamiento consiste en administrar medicamentos para bajar la presión intraocular durante toda la vida del paciente y/o cirugía.

(*) Instituto de Genética y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de San Martín de Porres.

(**) Instituto de Cataratas y Glaucoma.

(***) Instituto de Oftalmología (Ministerio de Salud)

La prevalencia del glaucoma a nivel mundial es de aproximadamente 1% (3). El riesgo de desarrollar glaucoma en los parientes en primer grado de pacientes con GPAA es del 4 - 16% (4), (6) y 13 - 47% tienen historia familiar positiva (4), (7). También se ha reportado familias con glaucoma de herencia autosómica dominante (7,8) y autosómica recesiva (9), (10). Hasta la fecha se han determinado 6 regiones (loci) del genoma que contienen genes para GPAA denominados correlativamente GLCIA-F Y uno de ellos, GLCIA ya ha sido identificado correspondiendo al gen MYOC o TIGR en el cromosoma 1.

Para determinar la causa de una enfermedad hereditaria y para caracterizar familias afectadas se utiliza el estudio de ligación genética (*linkage*) que se basa en la asociación física de dos caracteres en una misma región cromosómica. Cuanto más cerca están en el mismo segmento cromosómico, mayores posibilidades de cosegregar en bloque. Por otro lado, si están lejos en el mismo cromosoma o están en cromosomas distintos, segregan al azar (recombinación). El análisis de *linkage* trata de localizar una enfermedad asociándola por cosegregación a uno de los cientos de marcadores polimórficos repartidos en todos los cromosomas. En consecuencia, se podrá localizar genes que causan enfermedades en una región conteniendo algunos pocos genes para luego analizarlos comparando los de personas normales con las afectadas como paso previo a su identificación. Cabe notar que si se determina que una persona hereda esa región de sus ancestros afectados se puede asumir que recibirá el gen mutado, aún si no ha sido identificado. De esta manera el *linkage* puede predecir qué individuos portan la mutación años antes que se presenten los síntomas, permitiendo un monitoreo y estrategias de tratamiento con mucha anticipación (8).

MATERIAL Y METODOS

Hallazgos clínicos.

Se estudió una familia con pacientes que presentan GPAA con herencia autosómica dominante. Hay un paciente (G85) en la primera generación, con 82 años de edad y con un GPAA avanzado con presiones controladas, con campos visuales con una isla de visión central. Sus hijas G87 y G 78 están afectadas con una edad de inicio alrededor de los 35 años. G87 tiene Presión Intra Ocular (PIO) de 30 mmHg Ojo Derecho (OD) y 6 mmHg Ojo Izquierdo (al), respectivamente. Ella recibió tratamiento médico en forma irregular y cirugía filtrante en al, tiene excavación de los nervios ópticos (N.O.) de 0.9 OD Y 0.5 al y una isla de visión central en OD y al normal. G78 tiene P.I.O. de 22 mmHg y sigue tratamiento con timolol.

Los tres hijos de G87 presentan glaucoma juvenil. El hijo mayor, G70 tiene 25 años, PIO de 30 y 24mm Hg, sin tratamiento médico, excavación N.O. 0.8 OD Y 0.6 al. El segundo hijo G82 de 17 años de edad presenta PIO de alrededor de 23 OD Y 18 al mm Hg, en tratamiento con timolol. El tercer hijo G6 7, de 19 años de edad presenta PIO de 24 mmHg en OD, con tratamiento a base de Timolol. Los demás miembros de la familia presentan PIO dentro de los límites normales (21 mmHg o menos) y no presentan excavación del nervio óptico.

Análisis molecular.

Extracción de DNA.

Para estudiar los individuos de las familias se aisló DNA genómico a partir de sangre colectada con anticoagulante EDTA, usando una técnica simplificada (11). Brevemente, se lavan las células con una solución hipotónica TE 20:5 (20mM Tris, pH 7.4; 5mM EDTA). Los núcleos son lisados con sarkosyl a una concentración final de 1%. Para purificar el DNA se añade proteinasa K a 100 ug a 50°C por un mínimo de 3 horas y luego se le precipita con acetato de amonio y alcohol. Este DNA es transferido a tubos Eppendorf y re suspendido en TE (20:1) a una concentración aprox. de 200ng/ul.

Análisis de cosegregación con marcadores polimórficos de los cromosomas 1, 2 y 3.

En cada familia, el análisis de *linkage* se hace con marcadores genéticos de diferentes regiones cromosómicas que consisten en la amplificación PCR de marcadores polimórficos microsatélites y se estudia su cosegregación con la enfermedad. Los marcadores corresponden a las regiones de GLC1A en el cromosoma 1 (región 1q24.3-q25.2), GLC1B (2cen-q13) y GLC1C (3q21-q24), respectivamente. Ver Tabla 1 para la lista de marcadores usados; para detalles de su secuencia consultar Genome Database: www.gdb.org. Los primers fueron donados por la Dra. Julia Richards (Kellogg Eye Center, U. of Michigan, USA).

Tabla 1. Primers usados para el análisis de las familias peruanas afectadas por glaucoma.

Cromosoma1	Max.Het.	Cromosoma2	Max.Het.	Cromosoma3	Max.Het.
D1S452	0.75	D2S1897	0.89	D3S1569	0.80
D1S242	0.85	D2S2161	0.77	D3S3637	0.90
D1S215	0.73	D2S417	0.76	D3S1535	0.83
D1S212	0.79	D2S2264	?	D3S1744	
D1S218	0.84	D2S135	0.62		
D1S433	0.59	D2S176	0.69		
D1S431	0.79	D2S373	0.74		
D1S196	0.75	D2S113	0.77		
D1S194	0.66				

Los productos obtenidos oscilan entre 200-400 pb, dependiendo del set de primers usado. El programa de amplificación es el siguiente: 94°C por 30", 60-62°C por 30", 72°C por 30" por 35 ciclos de amplificación. Los productos son separados en geles denaturantes de poliacrilamida y los marcadores polimórficos son identificados con el método de tinción de plata.

El nombre de los marcadores utilizados aparece en la Tabla 1 con sus respectivos coeficientes de máxima heterocigocidad, todos mayores de 0.6, lo que da grandes posibilidades de que una persona tomada al azar tenga dos alelos diferentes para ser seguidos a través de las generaciones. Se determinó si había *linkage* (ligación genética) entre el marcador y la enfermedad; cuando uno de los alelos es común a los familiares afectados, señala que el gen de la enfermedad está en el mismo segmento cromosómico. Se determinó recombinación entre el marcador y la enfermedad cuando los pacientes de la familia reciben (o transmiten) aleatoriamente cualquier alelo, indicando que probablemente el gen de glaucoma no está en el mismo segmento cromosómico que el marcador.

RESULTADOS

Linkage de glaucoma al cromosoma 2 en una familia peruana.

La inspección del heredograma de la figura 1 indica que los individuos afectados pertenecen a tres generaciones sucesivas, típico de una enfermedad autosómica dominante y probablemente con una penetrancia de 100%. La distribución de los alelos de los marcadores analizados indican que hay recombinación para los marcadores asociados a GLC1A en el cromosoma 1 y GLC1C para el cromosoma 3, descartando la localización del gen en dichos cromosomas. Con respecto a los marcadores del cromosoma 2, tres de ellos fueron informativos: D2S2264, D2S2161, D2S373 y mostraron cosegregación entre un alelo y la enfermedad.

Figura 1. Linkage del marcador polimórfico D2S2264 (cromosoma 2) con glaucoma en la familia de Chincha localizando al gen mutado en el locus GLC1B. La diferencia de tamaño de los alelos permite ver la segregación de los 2 alelos del abuelo G85 a sus descendientes sanos (alelo superior) y a sus descendientes afectados (alelo inferior, con asterisco)

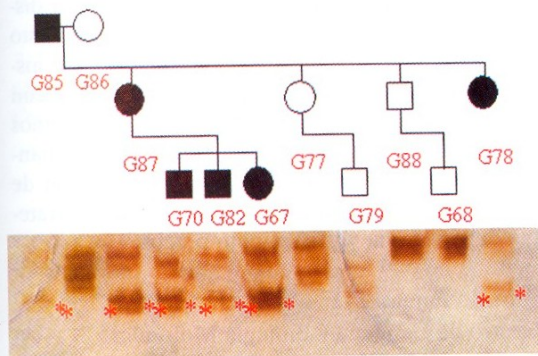


Tabla 2. Marcadores del cromosoma 2 en la familia de Chincha, mostrando ligamiento o recombinación:

Marcador (Primer)	Resultado
D1S433	Recombinación
D2S2264	Linkage
D2S2161	Linkage
D2S373	Linkage
D3S1535	Recombinación
D3S1744	Recombinación
D3S3637	Recombinación

Recombinación entre 2q12-2q13.

Análisis posteriores de un individuo comprobadamente normal (G89), hermano de G87 y G78, reveló que compartía marcadores con sus familiares afectados con glaucoma entre las regiones 2q12-2q13, indicando que este segmento no contenía el gen. Marcadores más proximales, en 2cen-2q12, sí muestran recombinación (no comparte con afectados) lo que indicaría que el gen debe estar en la región entre 2cen y la parte proximal de 2q12. Este individuo tiene 45 años y no muestra signos de la enfermedad. Teniendo en cuenta que en sus hermanas el glaucoma fue detectado alrededor de los 35 años, asumimos que esta persona no debe portar el gen mutado (Fig.2).

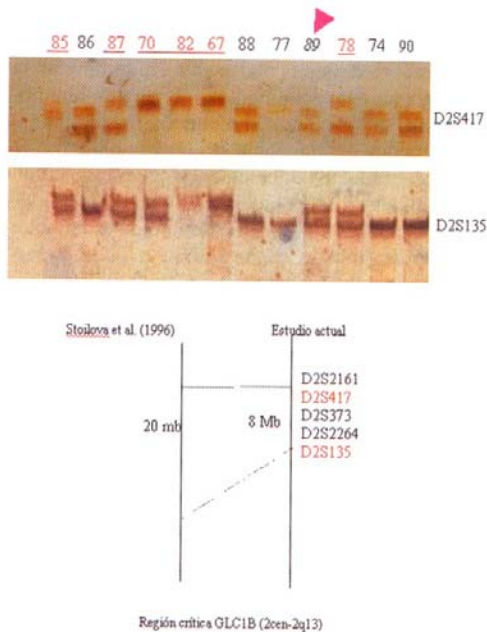


Figura 2. Recombinación genética en marcadores microsatélites ligados a GLC1B en la familia de Chíncha. En el individuo G89 (normal), el alelo paterno D2S417 está en fase con el alelo normal (recibe el mismo alelo paterno que sus hermanos normales), indicando que está dentro de la región que contiene el gen. Por el contrario, el individuo G89 en D2S135 recibe el alelo paterno que es común a los afectados, indicando que esta región no contiene el gen que causa glaucoma. Abajo se muestra un esquema del refinamiento de la posición del locus GLC1B que ha sido reducido de un aprox. de 20 Megabases (20'000.000 bp) a 810 Megabases facilitando la búsqueda del gen responsable de glaucoma en estas familias.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El glaucoma agrupa enfermedades caracterizadas por una degeneración típica del nervio ocular y, causa una severa pérdida visual que es irrecuperable. El mayor factor de riesgo es la presión intraocular elevada que conlleva a un deterioro del nervio óptico y alteración de los campos visuales. La heterogeneidad clínica se manifiesta en diferentes formas incluyendo la edad de inicio y las formas de tratamiento (4,5). Genéticamente también se manifiesta en diferentes formas de herencia: recesiva, dominante y multifactorial (1). La genética molecular actual nos permite develar la etiología de las enfermedades genéticas identificando los genes que causan esas enfermedades.

Varios genes de glaucoma de ángulo abierto han sido localizados en diferentes regiones cromosómicas: GLCIA en 1q24.3-q25.2, GLCIB en 2cen-q13, GLCIC en 3q21-q24. Al menos uno de estos genes ha sido identificado, el gen MYOC o TIGR llamado también GLCIA en 1q24.3-q25.2.(12). Para caracterizar familias peruanas con glaucoma, nosotros hemos utilizado un grupo de marcadores polimórficos correspondientes a los cromosomas 1, 2 y 3. Una de las familias proveniente de Chíncha cosegrega con marcadores del cromosoma 2, que han sido previamente asociados al gen GLCIB en la región 2cen-q13 en el estudio de seis familias del Reino Unido (13).

GLCIB ha sido localizado en una región calculada en 11.2 cM que se traduce aproximadamente entre 10-15 millones de bases posiblemente conteniendo varias decenas de genes. En las familias afectadas se presenta con inicio en la edad adulta, aparenta ser menos severa y responde mejor a los medicamentos en comparación con otro tipo de GPAA bien estudiado como el GLCIA. Además, había prevalencia (cerca de la mitad) de pacientes con presiones intraoculares cercanas a los valores normales (13). La familia peruana muestra que el GPAA de inicio del adulto y glaucoma juvenil comparten una mutación y el cuadro clínico muestra similitud con la familia reportada por Stoilova (13) con presiones intraoculares en el rango de 22 a 30 mm Hg y que responden bien al tratamiento médico

Aparte del reporte inicial mencionado, no se han identificado nuevas familias para GLCIB, incluso en un estudio sistemático de 18 familias con glaucoma de los Estados Unidos ninguna fue localizada en 2cen-q13 (13). El presente sería el segundo estudio en el mundo reportando una familia con GLCIB y el primero en el nuevo mundo. Hemos ampliado la muestra a otras personas de la familia y encontramos un individuo normal de 45 años que compartía marcadores de la región 2q12 -2q13 con los otros afectados; siendo similar distalmente (hacia el telómero) desde este punto. En la meiosis previa a la formación del espermatozoide que dio origen a este individuo normal, justo el par de cromosomas 2 del padre G85 recombinó en algún punto en 2q12-q13. De esta manera, recibió los marcadores y genes proximales (hacia el centrómero) al gen mutado del cromosoma portador; pero felizmente recibió distalmente los marcadores y genes, incluyendo GLCIB, del cromosoma sano. Estos resultados nos permiten descartar varios millones de bases y decenas de genes en la búsqueda de GLCIB restringiendo su localización en una región menor en 2q12-q13 (Fig. 2).

Con la ampliación del análisis con nuevos marcadores y muestras de nuevos individuos afectados y algunos sanos, vamos a explorar la presencia de más recombinantes dentro del intervalo para disminuir el segmento cromosómico a estudiar. Esto será útil para los futuros experimentos de aislamiento en pos de la identificación del aún desconocido gen GLCIB. Por otro lado, podremos identificar personas jóvenes a riesgo, determinando si reciben la región que porta la mutación de GLCIB en esta familia y poder sugerir una estrategia de vigilancia y tratamiento precoz.

Ricardo Fujita PhD.
Centro de Genética y Biología Molecular
Facultad de Medicina Humana
Universidad de San Martín de Porres
rfujita@amauta.rcp.net.pe

BIBLIOGRAFIA

1. THYLEFORS, B.; NEGREL, A D. The global impact of glaucoma. WHO Bulletin OMS. 72:323-326. 1994.
2. NGUYEN, T. D.; CHEN, P.; HUANG, W D.; et al. Gene structure and properties of TIGR, anolfatomedin-related glycoprotein cloned from glucocorticoid-induced trabecular meshwork cells. The Jour of Biol. Chem. 273: 6341-6350. 1998.
3. LESKE, M. C. The epidemiology of open-angle glaucoma: a review. American Journal of Epidemiology. 118: 166-191. 1983.
4. PHELPS, C. D.; PODOS, S. M. Glaucoma. Genetic and Metabolic Eye Diseases. (Ed. Goldberg, M.F) 237-259 Little, Brown, Boston. 1974.
5. MILLER, S. J. H.; PATERSON, G. D. Studies on Glaucoma relatives. Br. J. Ophthalmol. 46: 513-522. 1962.
6. LEIGHTON, D. A. Survey of the first -degree relatives of glaucoma patients. Trans. Ophthalmol. Soco U. K. 96:28-32. 1976.
7. FRANCOIS, J. Genetics and primary open-angle glaucoma. Am. J. Ophthalmol. 61: 652-665. 1966.
8. HARRIS, D. The inheritance of glaucoma - a pedigree of familial glaucoma. Am. J. Ophthalmol. 60, 91-95. 1965.
9. WAARDENBURG, P. J. Über das familiäre Vorkommen und den Erbgang des präsenilen und senilen Glaukoms. Genetica 25, 79129. 1950.
10. BIRO, I. Notes upon the question of hereditary glaucoma. Ophthalmologica 122: 228-238. 1951.

11. FUJITA, R. Localisation du gene de l'ataxie de Friedreich par sa liaison genetique et physique avec les loci D9S5 et D9S 15. Tesis de Doctorado en Ciencias de la Vida y de la Tierra, Universidad Louis Pasteur, Estrasburgo, Francia 1991.
12. SHEFIELD, V. C; STONE, E. M.; ALWARD, W L.; et al. Genetic linkage of familial open-dominant juvenile onset open-angle glaucoma to chromosomelq. Am J. Hum. Genet. 54: 62-70. 1994.
13. STOILOVA, D.; CHILD, A; TRIFAN, O. C., et al. Localization of a locus (GLC1B) for adult-onset primary open angle glaucoma to the 2cen-q 13 region. Genornics 36:142-150. 1996.