

EXPANSIONES RESPONSABLES DE LAS DISTROFIAS MIOTÓNICAS. COMPARACIÓN DE SUS ESTRUCTURAS SECUNDARIAS

EXPANSIONS RESPONSIBLE FOR MYOTONIC DYSTROPHIES. SECONDARY STRUCTURES COMPARISON

Autores:

Msc. Yulemi González Quesada¹, Ing. Daxel Madrazo Luk², Lic. Miguel Sautié Castellanos³

¹) Centro Nacional de Genética Médica. <yulemiquesda@cngen.sld.cu>

²) Oficina de Transferencia de Tecnologías. <daxel.madrazo@cigb.edu.cu>

³) Centro de Cibernética Aplicada a la Medicina. <msc@infomed.sld.cu>

RESUMEN:

La Distrofia Miotónica (DM) es un trastorno neuromuscular. Este trastorno tiene una herencia y patofisiología molecular muy complejas. Se clasifica en dos formas principales: DM1 y DM2. Ambas son el resultado de una mutación dinámica y difieren en la severidad de los síntomas clínicos así como en la localización del defecto genético.

Las afectaciones moleculares presentes en estas enfermedades, son atribuidas a la longitud y al tipo de los repetidos en el ARNm. Es de esperar que las diferencias en sus estructuras sean responsables de las particularidades de cada una de estas entidades. El objetivo de este trabajo estriba en tratar de explicar las diferencias entre los mecanismos fisiopatológicos asociados a la DM1 y DM2 a partir de las diferencias presentes en la cantidad y estabilidad de las estructuras secundarias formadas por los repetidos de CUG y CCUG de distintas longitudes.

Fue utilizado el servidor Quikfold con el fin de modelar el efecto que tiene sobre las estructuras secundarias la variación del tamaño de estas secuencias repetitivas. Se obtuvo que estos repetidos pueden formar hasta tres estructuras probables

caracterizadas por la presencia de lazos interiores que alternan con regiones de doble cadena de C/G.

Las estructuras formadas por los repetidos CCUG son menos estables que aquellas formadas por los repetidos de tripletes CUG. En estos últimos la estabilidad aumenta drásticamente con el aumento del número de unidades de repetidos. Esto último pudiera explicar algunas de las diferencias entre estas entidades como la necesidad de una mayor cantidad de repetidos para el desarrollo de la sintomatología y la ausencia de la forma congénita en la DM2.

PALABRAS CLAVE:

Distrofia miotónica, Expansiones, Bioinformática, Servidor Quikfold, Modelación, Estructuras secundarias, Molecular, Genética

ABSTRACT:

Myotonic Dystrophy (DM) is a neuromuscular disorder with a very complex inheritance and molecular pathophysiology. It is classified into two main forms: DM1 and DM2. Both forms are the result of a dynamic mutation and differ in the severity of clinical symptoms as well as in the location of the genetic defect.

The molecular disorders present in these diseases are attributed to the length and type of repeats in the mRNA. It is possible that the differences in their structures are responsible for the particularities of each of these entities. The aim of this study was to find an explanation for the differences between the pathophysiological mechanisms associated with DM1 and DM2 on the basis of the differences in the amount and stability of secondary structures formed by the CUG and CCUG repeats of different lengths.

The Quikfold server was used to model the effect on secondary structure that has the variation of the size of these repeats. It was found that these sequences can form three possible structures characterized for the presence of interior loops and doubled stranded regions of C / G pairings.

The structures formed by CCUG repeats are less stable than those formed by CUG triplets. In CUG triplet repeats the stability increases dramatically with the increase in the number of repeat units. This may explain some of the differences between these entities, such as the need for a greater number of repeat units for the onset of symptoms, and the absence of the congenital form in DM2.

KEY WORDS:

Myotonic Dystrophy, Quikfold server, Modeling, Secondary structures, Genetic, Molecular

1. INTRODUCCIÓN

La Distrofia Miotónica (DM) es un trastorno neuromuscular con una herencia y patofisiología molecular extremadamente complejas. [1] Esta enfermedad se clasifica en dos tipos principales, de acuerdo a la localización del defecto genético, que en ambos casos consiste en una mutación dinámica, y a la severidad de los síntomas clínicos.

La Distrofia Miotónica tipo 1 o de Steinert es la forma más frecuente, fue descrita por primera vez en 1909 (Steinert) como un desorden multisistémico. En la actualidad es reconocido como una de las formas más comunes de distrofia muscular en adultos, con una frecuencia de 1/8000. Este síntoma principal se encuentra unido frecuentemente a anomalías cerebrales, cataratas, problemas de la deglución y retraso mental. Se hereda de forma autosómica dominante y está asociado a la expansión de los tripletes CTG en el extremo 3' del gen *DMPK*, en el brazo largo del cromosoma 19 (19q13) [1]; por otra parte, la mutación asociada a la DM tipo 2, segunda en frecuencia de aparición, también heredada de forma autosómica dominante y causada por la expansión de los nucleótidos CCTG del gen *ZNF9*, se encuentra localizada en el brazo largo del cromosoma 3 (3q21) [2].

La alta similitud entre estas entidades, dígame fenotipo asociado, expresividad variable y la presencia del fenómeno de anticipación, generó por mucho tiempo la idea de que el mecanismo por el cual ocurrían las afecciones era idéntico, teniendo en cuenta que las expansiones ocurren en regiones que no se traducen y evitan, mediante un mecanismo aún desconocido, la traducción de la proteína. Por otra parte, es conocido que el aumento del tamaño de las unidades de repetidos genera una región altamente rica en nucleótidos C/G, que sugiere que podrían estar afectadas las mismas proteínas en ambas enfermedades conllevando al fenotipo característico [3].

Sin embargo, luego de detectar las mutaciones asociadas a estas enfermedades y las diferencias en cuanto a la severidad con respecto al tamaño de la expansión, así como la ausencia de correlación entre la talla de la expansión de las repeticiones y la edad de debut y severidad en los síntomas de DM2, particularmente el hecho de que en este tipo de mionía no se manifiesta la forma congénita (Tabla 1); se comenzó el estudio de los eventos producidos por cada una de estas alteraciones de forma independiente. A partir de los mismos se ha demostrado que el ARNm sintetizado a partir de los genes mutados forma agregados en unión con otras proteínas, mayormente unidoras de CUG o CUGBP (del inglés *CUB Binding Protein*), de manera que inhibe sus funciones y provocan la muerte celular. También ha sido comprobado que en los tipos 1 y 2 no son arrestadas las mismas proteínas, ni la misma cantidad de estas, aunque en general sus funciones se encuentran relacionadas, lo que explica el parecido fenotípico [4,5].

Tabla 1. Clasificación de las DM tipos 1 y 2 con respecto al tamaño de los repetidos.

Formas	DM1 Tamaño de las repeticiones CTG	DM2 Tamaño de las repeticiones CCTG
Congénita	+ de 4 000	-
Clásica	100-1 000	Hasta 11 000
Benigna	50-150	75~300

Con la identificación de las bases moleculares de DM1 y DM2 se encontró que las repeticiones CTG en el gen *DMPK* son la causa de la DM1 a través de las repeticiones CUG en una región no traducida del ARN. En los pacientes con DM1 se encuentran afectadas dos familias de proteínas unidoras de ARN específicas a CUG (CUGBP1 y MNBL). Sin embargo, las características específicas del fenotipo DM2 sugieren que los mecanismos moleculares no son del todo similares. Se ha encontrado que las repeticiones CCUG del ARN en DM2 interactúan con diferentes proteínas unidoras de ARN y con grandes complejos proteína-proteína, designados como Mega Protein-Protein Complexes (MPPC). Estos complejos se unen específicamente a las repeticiones CCUG pero no a las CUG. Sin embargo, los complejos MPPC contienen a la proteína CUGBP1 y otras que se involucran con la iniciación de la traslación de los ARNm y quizás en el empalme [5, 6].

Teniendo en cuenta que las afectaciones moleculares, presentes en estas enfermedades, son atribuidas a la longitud y al tipo de los repetidos en el ARNm, es de esperar que las diferencias en sus estructuras sean responsables de las particularidades de cada una de estas entidades; por ello, se realizó este trabajo con el objetivo de determinar diferencias entre los mecanismos fisiopatológicos asociados a la DM1 y DM2 a partir de las presentes en la cantidad y estabilidad de las estructuras secundarias formadas por las unidades de repetidos CUG y CCUG, de distintas longitudes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Fue utilizado el servidor Quikfold o *Quikfold server* (<http://www.bioinfo.rpi.edu/~zukerm>) para la predicción de la estructura secundaria de las repeticiones CUG y CCUG, asociadas a las DM1 y DM2, respectivamente. Este servidor, ubicado en la página Web del grupo de trabajo del matemático Michael Zucker (*The Zuker Group: Algorithms, Thermodynamics and databases for RNA Secondary Structure*) se encuentra libre en Internet y permite determinar, a partir de algoritmos matemáticos, la estructura secundaria de muchas secuencias pequeñas a

la vez; a partir de la entrada de la secuencia seleccionada y otras condiciones como el tipo de secuencia y reglas de energía.

Los datos introducidos al servidor para la recreación de las estructuras secundarias de ARNm desde 30 hasta 300 unidades de repetidos CUG y CCUG, respectivamente, fueron: con respecto a las reglas de energía, ARN a 37°C, con una concentración de Na⁺ de 1M y 0M de iones Mg⁺⁺; tipo de secuencia lineal y el 5% de estructuras subóptimas, con un máximo de 50 estructuras sin límites en la distancia entre pares de bases.

Los resultados de este análisis *in silico* consisten en los términos de ΔG , ΔH y ΔS para la secuencia en cuestión, además de varias, sino todas, las estructuras probables y la estabilidad de estas en términos del dG.

3. RESULTADOS

La estructura que se forma a partir de las repeticiones CUG es una estructura formada por aros o anillos creados a partir de los apareamientos C/G; y las U desapareadas. El servidor Quikfold devolvió los resultados de cada una de las estructuras *on line* donde, para cada caso con diferente tamaño de repetidos, fueron detectadas hasta tres estructuras probables.

Las estructuras probables de cada cantidad de repetidos presentan una horquilla principal, donde se encuentran la mayoría de las unidades de repetidos acoplados en anillos, como se expuso anteriormente. Las diferencias entre estas conformaciones radican en la formación de una horquilla lateral a la derecha o a la izquierda, que implica una pequeña pérdida de la estabilidad, según los valores de dG. De manera que en cada caso serán probables tres conformaciones y una de ellas parece ser la que con más frecuencia se encuentra en la naturaleza (Anexo).

Se observó además, a partir de los resultados obtenidos, que a medida que aumenta el número de repetidos CUG, la estabilidad de la estructura aumenta debido a la característica de presentar regiones ricas en C/G que se aparean.

La estructura que se forma a partir de las repeticiones CCUG es similar a la presente en los repetidos CUG en cuanto a la formación de anillos, aunque estos son de mayor diámetro debido a que se encuentra en este caso además desapareada la C introducida en la repetición. Este servidor devolvió igualmente tres estructuras probables con las mismas características básicas de las anteriores y estabilidad bastante similar entre las estructuras. Sin embargo, la estabilidad para las repeticiones CCUG es menor que la de los tripletes CUG para un mismo número de bases; por otra parte, el aumento de la estabilidad provocado por el incremento de las unidades repetidas no es tan considerable en comparación con la mutación asociada a la DM1 (Figura 1).

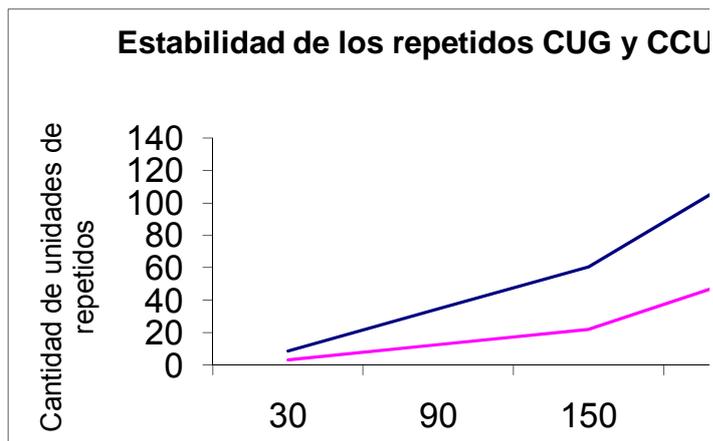


Figura 1. Estabilidad de las estructuras secundarias con respecto a la cantidad de repetidos CCUG (curva rosa) y CUG (curva azul).

4. DISCUSIÓN

Confirmando la observación experimental de otros investigadores, la estructura de las repeticiones CUG del ARNm del gen que codifica para la proteína, también nombrada DMPK (del inglés *Dystrophy Myotonic Protein Kinase*), está caracterizado por la formación de anillos a partir del apareamiento de las C/G. Los ARNm están caracterizados por tener un bajo tiempo de vida media, sin embargo, esta nueva estructura formada por la expansión de las repeticiones le confiere a la estructura un poco más de tiempo de vida debido al aumento de la estabilidad, por lo que la expansión de las repeticiones se vuelve un elemento viable desde el punto de vista termodinámico.

Los resultados alcanzados en esta investigación sugieren que las conformaciones reportadas por el servidor deben ser halladas en la naturaleza, debido a que la estabilidad de ellas no es muy diferente y teniendo en cuenta que existen otros factores, además de la estabilidad, que pueden influenciar en la conformación de las mismas, lo que se podría confirmar con estudios de Difracción de Rayos X.

Evidencias experimentales han demostrado que en la DM1 se encuentran grandes cantidades de ARNm de la proteína DMPK con la expansión de las repeticiones CUG precipitados en el núcleo. Por lo que en este estudio se refiere las grandes cantidades están debidas a la demora en la degradación de los ARNm sumado al efecto regulatorio que se ejerce sobre las señales de transcripción al no existir prácticamente producto proteico y por ende la producción de más ARNm mutado y al posible papel protector de ribonucleasas que puede ejercer la CUGBP al ser arrestado en grandes cantidades por las repeticiones CUG de la secuencia.

La misma interpretación se puede realizar para el aumento de la estabilidad en la expansión de las repeticiones CCUG para la DM2, el ARNm se vuelve más grande y más estable a partir del apareamiento C/G aunque el incremento de la estabilidad

es menor que la secuencia anterior debido a que los anillos que se forman son más grandes y existe desapareamiento de la U al igual que en la DM1, pero también en una de las C de la secuencia expandida. La variación significativa en cuanto a la estabilidad con respecto al aumento del número de repeticiones se comporta con un aumento más dramático en las repeticiones CUG, y no así para las CCUG, por lo que en este último caso el aumento de la estabilidad o de la vida media de ARN es menos brusco.

El aumento de las repeticiones CUG en DM1 desembocan en un aumento considerable en la estabilidad y vida media del ARNm provocando una mayor cantidad de estos en el núcleo y un mayor arresto de proteínas que se unen a las secuencias ricas en C/G, como la CUGBP. De esta manera, las alteraciones que se producen a partir de la ausencia de estas proteínas arrestadas son mayores que las provocadas a partir de la expansión de las repeticiones CCUG, donde la estabilidad y la vida media del ARNm no varían notablemente y el arresto de las proteínas es mucho menor. Esta pudiera ser la razón por la cual en la DM2 se hace necesaria mayor expansión de CCUG, que en la DM1 de CUG, para que se manifieste la sintomatología en el paciente.

5. CONCLUSIONES

En la naturaleza existen hasta tres estructuras probables para cada una de las repeticiones CUG y CCUG, asociadas a las DM1 y 2, respectivamente. El mayor aumento de la estabilidad con el incremento de los tripletes CUG, con respecto al de los repetidos CCUG, explica algunas de las diferencias entre estas entidades, como la necesidad de una mayor cantidad de repetidos para el desarrollo de la sintomatología y la ausencia de la forma congénita en la DM2.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Brook JD, McCurrah ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 1992; 68:799-808.
- [2] Day JW, Ricker K, Jacobsen JF, Rasmussen LJ, Dick KA, Kress W et al. Myotonic dystrophy type 2: molecular, diagnostic and clinical spectrum. *Neurology* 2003; 60: 657-664.
- [3] Krahe R, Ashizawa T, Abbruzzese C, Roeder E, Carango P, Giacanelli M et al. Effect of myotonic dystrophy trinucleotide repeat expansion on DMPK transcription and processing. *Genomics* 1995; 28:1-14.
- [4] Junghans RP, Ebralidze A, Tiwari B. Does (CUG)_n repeat in DMPK mRNA "paint" chromosome 19 to suppress distant genes to create the diverse

phenotype of myotonic dystrophy? A new hypothesis of long-range cis autosomal inactivation. *Neurogenetics* 2001; 3:59-67.

[5] Ranum L, Day J. Review article. Myotonic dystrophy: RNA pathogenesis comes into focus. *Am. J. Hum. Genet.* 2004; 74: 793-804.

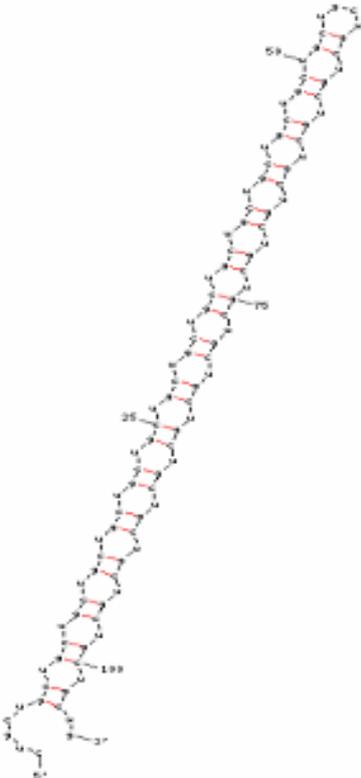
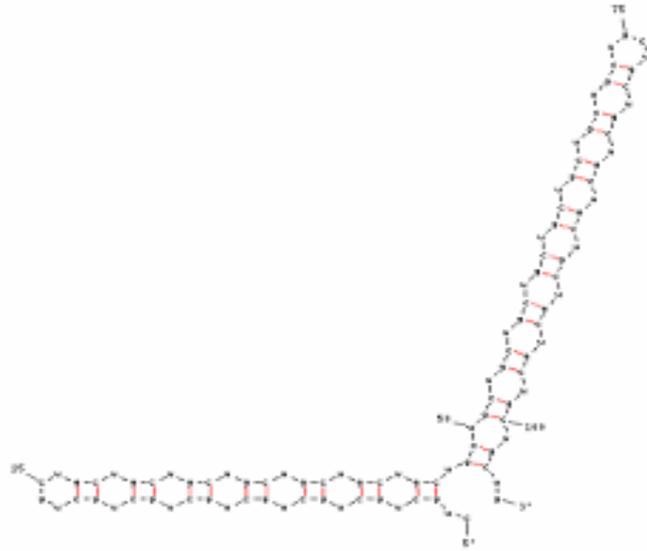
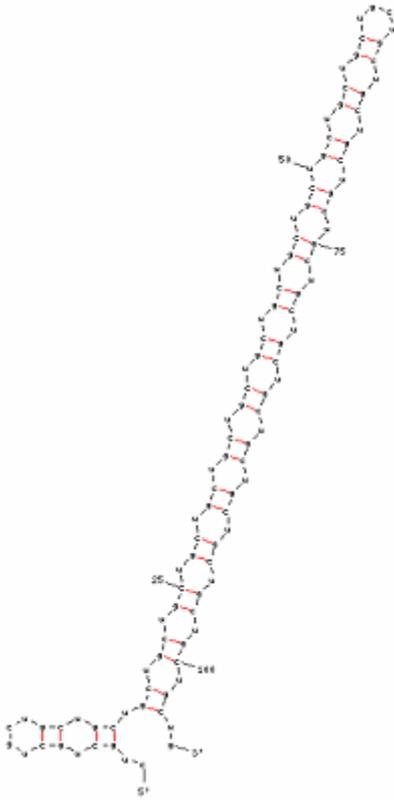
[6] Timchenko LT, Miller JW, Timchenko NA, DeVore DR, Datar KV, Lin L et al. Identification of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res* 1996; 24:4407-4414.

ANEXO



Estructuras secundarias probables de igual número de repetidos CCUG

Izquierda: Estructura más estable.
Arriba: Estructura menos estable aunque probable en la naturaleza.



Estructuras secundarias probables de igual número de repetidos CUG

Izquierda: Estructura más estable.
Arriba: Estructuras menos estables aunque probables en la naturaleza.