

Usher Syndrome Coalition | Análisis genético del Síndrome de Usher, Gema García-García, PhD, Valencia (ES)

Buenos días, mi nombre es Gema García. Soy investigadora pos-doctoral en el grupo del doctor José María Millan. Nuestro laboratorio está localizado en el Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario y Politécnico de Valencia y también formamos parte del CIBER de Enfermedades Raras. Hoy voy a hablaros del análisis genético del síndrome de Usher.

El síndrome de Usher es una enfermedad hereditaria, por tanto tiene un origen genético. El patrón de herencia es autosómico recesivo. De cada gen tenemos dos copias, una procedente de la madre y otra procedente del padre. Para que la enfermedad-- para que el síndrome de Usher se manifieste, las dos copias del mismo gen tienen que estar alteradas. Y las alteraciones que encontramos en los genes las llamamos mutaciones. Por tanto, la estrategia diagnóstica utilizada para el síndrome de Usher tiene que ser capaz de detectar las dos mutaciones responsables de la enfermedad.

Tradicionalmente, el diagnóstico molecular del síndrome de Usher se realizaba analizando gen a gen, empezando por aquel gen que tiene una mayor prevalencia en cada tipo clínico. Sin embargo, el alto número de genes implicados en el síndrome de Usher, el gran tamaño de algunos de ellos y la existencia de casos atípicos, donde sus características clínicas no encajan exactamente en ninguno de los tres tipos clínicos, dificultan el análisis molecular. Otra estrategia es el microarray de genotipado de Asper Biotech. Es una estrategia fácil y rápida. Sin embargo, sólo es capaz de detectar mutaciones que han sido previamente descritas.

En los últimos años, la complejidad diagnóstica del síndrome de Usher se ha solventado con la aparición de la Secuenciación de Nueva Generación. Esta tecnología nos permite estudiar todos los genes, y además en varios pacientes al mismo tiempo. Nuestro equipo trabaja con esta tecnología desde el 2013 y hemos desarrollado un panel de genes que incluyen los seis genes responsables para el síndrome de Usher tipo 1, los tres genes implicados en el síndrome de Usher tipo 2, los dos genes asociados a síndrome de Usher tipo 3 y dos genes adicionales, también relacionados con la enfermedad. Además, también hemos incluido cuatro regiones del gen U2A, donde se han descrito mutaciones intrónicas.

De forma muy resumida, la estrategia consiste en varias etapas. La primera etapa es obtener el material donde se van a analizar los genes. Para ello extraemos el ADN, bien de la sangre o de la saliva de los pacientes. La siguiente etapa es fragmentar el DNA en pequeños trozos, en pequeñas piezas, y después, a través de diferentes sistemas, somos capaces de recuperar aquellos fragmentos que corresponden a los genes Usher, en blanco en la figura, y de eliminar los otros, en gris. El siguiente paso, una vez que hemos recuperado a todos aquellos fragmentos correspondientes a los genes Usher, es analizarlos, secuenciarlos.

Una vez tenemos leídas, analizadas, todas las secuencias, tenemos que compararlas, alinearlas contra el genoma de referencia. Os he puesto un ejemplo para que lo entendáis de forma sencilla. Imaginaros que la frase, el síndrome de Usher es una enfermedad hereditaria, es el genoma de referencia. Es la secuencia normal de Usher. Abajo, en blanco, tenéis pequeños fragmentos de la frase que imaginamos que son las secuencias que acabamos de obtener, los pequeños fragmentos que se han mostrado en la diapositiva anterior.

Con todos los pequeños fragmentos, somos capaces de reconstruir la frase original, y además, si comparamos los diferentes fragmentos con la secuencia original, somos capaces de detectar las diferencias. Por ejemplo, vemos que la E de "es" ha cambiado a una O. Esa diferencia, en genética la llamamos una variante.

Entonces, la secuenciación de Nueva Generación nos permite obtener mucha información, y en poco tiempo, pero uno de los problemas que tenemos que afrontar es la interpretación de variantes. ¿Por qué? Porque cuando analizamos todos los genes Usher, nos encontramos con más de 100 variantes, con más de 100 diferencias respecto a la secuencia de referencia. Y entre esas 100 variantes, tenemos que ser capaces de diferenciar aquellas que son neutrales y no tienen ningún efecto para el paciente de aquellas diferencias - de aquellas variantes que tienen un efecto patológico, y que, por tanto, son mutaciones y son las responsables de la enfermedad.

Para asignar ese estado de neutral o benigno o patológico, nos basamos en base de datos públicas. También utilizamos predictores informáticos que nos ayudan a predecir, en cierta forma, el efecto que puede tener esa variante. También realizamos estudios de segregación. Es muy útil también estudiar a los familiares de los pacientes, e incluso a veces es necesario hacer estudios funcionales, bien con células o con modelos animales. Sin embargo, las grandes deleciones y duplicaciones son difíciles de detectar por la secuenciación de Nueva Generación, y por ello para detectar este tipo de mutaciones utilizamos otra estrategia, que se conoce como array-CGH.

¿En qué consiste? De forma sencilla, tenemos a nuestro paciente, al DNA de nuestro paciente, y al DNA de un control sano. El DNA de nuestro paciente va a estar marcado en rojo, y el DNA del control sano va a estar marcado en verde. Después, lo que vamos a hacer es comparar las intensidades de los colores. De tal forma que si fuera una región para gen, la intensidad del color rojo de mi paciente es más baja que la intensidad del color verde de mi control. Quiere decir que mi paciente tiene menos copias para esa región que el control, y por tanto, mi paciente tiene una deleción de esa región o de ese gen.

Como he dicho anteriormente, nuestro equipo lleva trabajando con la secuenciación masiva desde el 2013, y desde ese momento hemos analizado más de 100 pacientes. En el 89% de los pacientes, hemos encontrado al menos una de las mutaciones. En el 71%, concretamente hemos encontrado las dos mutaciones responsables de la enfermedad. En un 18% sólo hemos podido detectar una de las dos mutaciones, y en un 11% de los casos ninguna mutación se ha podido detectar.

En el siguiente esquema podéis ver representado el porcentaje de mutaciones que se han detectado en cada gen. Como podéis observar, el 43% de las mutaciones se han encontrado en el gen U2A, y los dos otros genes que tienen una mayor prevalencia es el gen MYO7A y el gen GPR98. Además, la posibilidad de secuenciar todos los genes Usher al mismo tiempo facilita encontrar las mutaciones en los casos de pacientes, que teniendo una clínica característica de tipo 2, tienen mutaciones en genes que típicamente están implicados en el tipo 1 como puede ser MYO7A o CDH23.

Cómo acabo de decir anteriormente, hay un 18% de los casos en los que solo hemos detectado una de las dos mutaciones y hay un 11% de los casos en los que no se ha detectado ninguna mutación. Entonces, en estos casos la pregunta que nos hacemos es, ¿por qué no detectamos el 100% de las mutaciones? ¿Donde se encuentran estas mutaciones que faltan? Una de las posibilidades es que las mutaciones se encuentren en otros genes, en otros genes que no hemos analizado. Puede que sean genes responsables de Usher, pero que todavía no se han descrito. O puede que realmente estos pacientes presenten otras características clínicas de las que no somos conscientes y realmente tengan otro síndrome que tiene características solapantes con el síndrome de Usher.

Otra posibilidad es que estas mutaciones estén localizadas en regiones no codificantes. Os preguntáis, ¿por qué? Los genes están compuestos por regiones codificantes que contienen la información para producir las proteínas, que se llaman exones, y están en color amarillo en la imagen. Pero también existen unas regiones, llamadas no codificantes. Están en blanco la imagen.

Normalmente, para el análisis genético solo estudiamos los exones, porque, con una mayor frecuencia, las mutaciones se localizan en estas regiones codificantes, y no las regiones no codificantes. Y además, también porque las regiones no codificantes son de gran, gran tamaño. Sin embargo, estas regiones no codificantes también pueden contener mutaciones.

Por eso pensamos que quizás algunos de nuestros pacientes las mutaciones estén localizadas en estas regiones que no se han estudiado hasta la fecha. Por ello pensamos que en los pacientes de los que no hemos detectado ninguna mutación, o sólo una, podrán solucionarse bien con el estudio del exoma más completo, con el estudio de todos los genes que se han descrito hasta la fecha, o bien con el estudio del genoma completo-- el estudio de los exones más estas regiones no codificantes.

Ha sido un placer para mi dar esta charla, y para finalizar me gustaría agradecer a todos los pacientes y a sus familiares porque siempre colaboran de forma muy amable en todos los proyectos que realizamos, y también agradecer a las asociaciones de pacientes por la gran labor que hacen y por facilitarnos muchas veces en el trabajo. Por ello, muchas gracias a todos.