BASES MOLECULARES DE LA, HETEROGENEIDAD CLINICA DE LA FIBROSIS QUISTICA

G. Antiñolo.
Unidad de Genética Médica y Diagnóstico Prenatal. Hospital Maternal. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla.

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad hereditaria autosómica recesiva más frecuente entre caucasianos. Su frecuencia estimada en la población general es de 1:2.500 recién nacidos vivos, lo que establece una frecuencia de portadores de 1:25.[(1)] Clínicamente se caracteriza por insuficiencia pancreática, afectación pulmonar progresiva, electrolitos elevados en sudor y esterilidad masculina.

La FQ presenta una gran variabilidad en su expresión clínica, tanto en la forma y edad de presentación, como en la gravedad de sus síntomas y/o en la progresión de los mismos.

La mayor parte de los pacientes son diagnosticados en el primer año de vida con la forma clásica de la enfermedad: insuficiencia pancreática con o sin afectación pulmonar inicial y test de sudor elevado[(2)]. Sin embargo, se observan también pacientes con una forma de enfermedad moderada y/o atípica[(3-4)]. La afectación pulmonar, que constituye la causa más frecuente de mortalidad en pacientes afectos de FQ, presenta una gran heterogeneidad tanto en la edad de comienzo, como en la progresión[(2-3-4)]. También la gravedad de la afectación pancreática es variable: aunque la mayor parte de los pacientes padecen una insuficiencia pancreática, el 15% de los enfermos tiene una función pancreática suficiente[(5)].

La FQ se produce debido a mutaciones en el gen que codifica la proteína Reguladora Transmembrana de la Conductancia de FQ (CFTR), identificado en 1989[(6)]. La mutación más frecuente de dicho gen es una delección (pérdida) de tres pares de bases que codifica el aminoácido fenilalanina en la posición 508 de la secuencia de la proteína. Dicha mutación se designa IncrementoF508. Esta mutación representa el 70% del conjunto de las mutaciones presentes en los cromosomas FQ en todo el mundo, aunque su frecuencia varía según la población estudiada[(7)].

El origen y la evolución de esta mutación en Europa se han estudiado recientemente utilizando marcadores intragénicos altamente polimórficos[(8)]. Según los resultados de este estudio, dicha mutación surgió hace más de 52.000 años en una población distinta genéticamente de la población europea actual. La mutación se distribuyó en oleadas cronológicamente diferentes, lo que probablemente se relaciona con las diferentes frecuencias de IncrementoF508 en Europa.

El objetivo de este artículo es la revisión de las bases moleculares de la expresión y variabilidad clínica de la FQ. Para comprender cómo mutaciones diferentes alteran la función de la proteína CFTR normal y cómo estas alteraciones conducen a la enfermedad, es necesario conocer primero el gen CFTR, su producto y la naturaleza y frecuencia de sus mutaciones.

El gen CFTR comprende 27 exones, tiene un tamaño de 250 kilobases y está situado en la región q31 del cromosoma 7. La proteína CFTR se compone de 1.480 aminoácidos, 2 dominios hidrofóbicos que atraviesan la membrana celular, cada uno compuesto por seis segmentos de estructura helicoidal, 2 dominios de unión a ATP y un dominio regulador[(9)]. La proteína CFTR se localiza en la membrana apical de las células epiteliales normales, donde se fija mediante sus dos regiones hidrofóbicas transmembrana, mientras su dominio regulador y los dos de unión a ATP permanecen intracitoplasmáticos. Esta proteína pertenece a una familia de glucoproteínas P de transporte de membrana y actúa como un canal de cloro regulado mediante fosforilación[(10-11-12)].

Hasta ahora se han identificado alrededor de 600 mutaciones del gen CFTR (CF Genetic Analysis Consortium, comunicación personal, http://www.genet.sickkids.on.ca). Sólo unas pocas además de IncrementoF508 tienen una frecuencia del 1-3%[13]. La distribución de las mutaciones presenta considerables variaciones según el grupo étnico y/o el área geográfica estudiada[2-13]. Las mutaciones se distribuyen a lo largo de todo el gen CFTR aunque se producen con mayor frecuencia en algunas regiones del mismo. El patrón de distribución de las mutaciones sugiere que la unión o hidrólisis de ATP son críticas para el funcionamiento normal del canal de cloro.

La identificación del gen y de sus mutaciones han permitido el estudio de la correlación fenotipo/genotipo mediante el análisis de la relación de las diferentes mutaciones presentes con la expresión clínica de la enfermedad.

El genotipo más frecuente en pacientes con FQ es la homocigosidad para IncrementoF508. Estos pacientes presentan la forma más severa de la enfermedad, en particular desde el punto de vista de la afectación pancreática. A pesar de la naturaleza severa pancreática de esta mutación, la gravedad de la afección pulmonar varía de unos pacientes a otros, incluso dentro de la misma familia[2-14]. El estudio de la correlación fenotipo/genotipo ha puesto de manifiesto que existen otras mutaciones asociadas con una enfermedad pancreática severa (Tabla 1) y que la presentación clínica en pacientes portadores de alelos severos es similar a la observada en los homocigotos IncrementoF508[2-14-16] .

TABLA 1

CLASIFICACIÓN DE MUTACIONES DE ACUERDO CON LA SEVERIDAD DEL FENOTIPO

Severa	Moderada	Variable
ΔF508	R117H	R334W
ΔI507	A455E	G85E
G542X	3849+10kb C→T	5T
W1282X		
N1303K		
1811+1,6kb A→G		

Algunas mutaciones se han asociado con un fenotipo más moderado de la enfermedad (Tabla 1). Las mutaciones moderadas son dominantes sobre las mutaciones severas del gen CFTR, de forma que los pacientes que tienen al menos una mutación moderada se diagnostican con mayor edad, presentan un mejor estado nutricional, un gran número son pancreáticos- suficientes y su edad de inicio de infección crónica por pseudomona aeruginosa es mayor[3-4].

Los estudios in vitro del efecto de diferentes mutaciones sobre el ARN mensajero, la proteína y el funcionamiento celular han contribuido al conocimiento de los mecanismos moleculares que conducen al fallo del canal de cloro controlado por CFTR. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que diferentes mutaciones producirían diferentes errores en la producción y función de la proteína[17-18-19].

Se han sugerido cinco mecanismos moleculares por los que una mutación produciría una disfunción del canal CFTR (Tabla 2).

TABLA 2

CLASES DE MUTACIONES DEL GEN CFTR

Clase I (producción de la proteína)	Clase II (procesamiento)	Clase III (Regulación)	Clase IV (conducción)	Clase V (nivel reducido de ARNm o proteína normal)
G542X	ΔF508	G551D	R117H	3849+10kb C→T
621+1 G→T	N1303K		R334W	5T
3905 ins T	S549R		R347P	1811+1,6kb A→G
	ΔI507			A455E

Mientras que las clases I y II se asocian con insuficiencia pancreática, las clases I, IV y V presentan una gran variabilidad en su expresión clínica. Las mutaciones Clase I conducen a la ausencia de producción de la proteína. Las mutaciones Clase II, como IncrementoF508, no permiten que la proteína alcance la membrana epitelial. Las mutaciones Clase III, como las que afectan a los dominios regulador o de unión de ATP, producen un defecto de la regulación del canal de cloro. Las mutaciones Clase IV son mutaciones en los dominios transmembrana y dan lugar a una conducción anómala de la corriente CIregulada por AMP cíclico. Por último, las mutaciones Clase V incluyen aquellos cambios que originan una reducción de la síntesis de ARN mensajero y de proteína CFTR requeridos para el funcionamiento normal del canal Cloro.

El grupo más numeroso de defectos del gen CFTR lo constituyen las mutaciones que originan el cambio de un solo aminoácido (missense). Estos cambios proporcionan una información muy útil sobre las funciones de los distintos dominios de la proteína y sobre la variabilidad genética de la enfermedad. Los estudios in vitro de mutaciones missense que afectan al dominio regulador o a los de unión a nucleótidos sugerían un efecto severo de dichos cambios, mientras que las mutaciones en los dominios transmembrana producirían un fenotipo moderado. Los datos de correlación fenotipo/genotipo han demostrado que la severidad de una mutación depende tanto de su naturaleza como de su localización y que puede observarse variabilidad en la expresión de la enfermedad en pacientes con la misma mutación, en particular en lo referido a la afectación pulmonar.

Un ejemplo de ello es la mutación R334W, un cambio presente con una frecuencia relativamente alta en pacientes con FQ en nuestra población? Los estudios in vitro indicaban que dicha mutación no daría lugar a insuficiencia pancreática. Sin embargo, este cambio origina una insuficiencia pancreática de comienzo tardío con variabilidad intra e interfamiliar de la afectación digestiva y respiratoria[3].

La variabilidad de la expresión clínica observada entre pacientes portadores de mutaciones Clase V ha añadido nueva luz a los mecanismos moleculares relacionados con la severidad de la enfermedad. En los casos en que la mutación afecta a la maduración del ADN a ARN (splicing), se produce una transcripción originada por splicing normal y anormal. En esta situación, la enfermedad puede ser debida a niveles insuficientes de proteína CFTR normal. Éste es el caso de la mutación 3849+10kbC->T, que produce una forma moderada de FQ con fenotipo variable[24]. Las células epiteliales del tracto respiratorio de estos pacientes tienen diferentes niveles de productos de transcripción derivados del splicing anormal. Dichos niveles tienen correlación con la severidad de la afectación pulmonar: cuanto mayor es la maduración anómala, mayor es la afectación pulmonar. Sin embargo, no existe correlación entre splicing anormal y enfermedad pancreática, lo que hace sospechar que existan factores de maduración específicos en diferentes tejidos. Otra mutación asociada con una gran variabilidad de expresión clínica es IVS86(5T), también denominada alelo 5T. Los pacientes homocigotos para 5T presentan una delección del exón 9 del gen CFTR en el 90% de los productos de transcripción[22]. Este cambio es la mutación moderada más

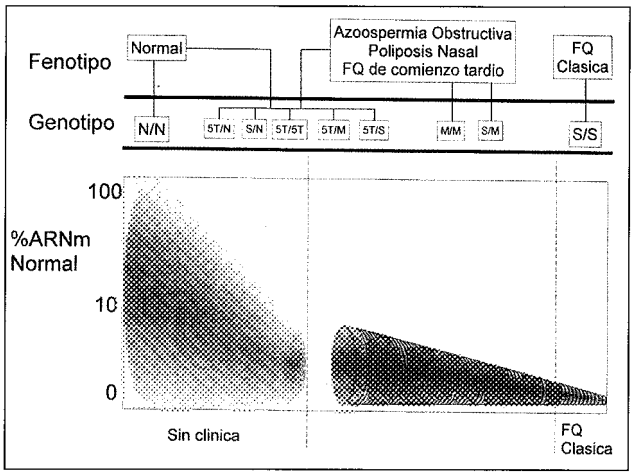

Fig. 1. *Expresión clínica asociada con las mutaciones del gen CFTR. El fenotipo se relaciona con el nivel de CFTR funcional que depende a su vez de las mutaciones presentes en el gen CFTR. (S=mutación severa, M=mutación moderada, N=gen no mutado, 5T=mutación IVS8-6(5T)).*

frecuente en pacientes con azoospermia obstructiva[23]. Recientemente, esta mutación se ha observado en pacientes con formas clásicas y atípicas de FQ. Como en el caso de la mutación 3849+10kb C->T los niveles de transcripción anómala se correlacionan con la severidad pulmonar[24].

Es evidente que las alteraciones del gen CFTR pueden producir una patología de amplio espectro (Figura 1). La forma clásica FQ se origina cuando el paciente presenta dos alelos severos en su genotipo, lo que da lugar a una producción menor del 1-3% de la proteína normal[25]. La situación es distinta en aquellos pacientes que combinan una mutación severa y otra moderada, o en aquellos casos con proteína funcional suficiente en algunos tejidos. La observación en los homocigotos para el alelo 5T de un 812% de CFTR normal[26] situaría el rango de proteína funcional necesaria para que se produzca un fenotipo moderado entre el 1-3% y el 8-12%.

A pesar de lo expuesto, aún no se han dilucidado los mecanismos moleculares que subyacen tras la variabilidad encontrada en pacientes con idéntico genotipo. La variabilidad intra e interfamiliar observada en pacientes con FQ indica que otros factores genéticos afectan la severidad y la progresión de la enfermedad. Los resultados de estudios in vitro de la mutación IncrementoF508 sugieren que las diferencias en la expresión de la enfermedad pulmonar observadas en pacientes homocigotos para esa mutación podrían ser debidos a diferencias alélicas en genes relacionados con el tráfico de la proteína alterada hacia la superficie celular. De hecho, se ha descubierto recientemente un gen no ligado a FQ que modifica la severidad de la enfermedad en animales de experimentación[27].

No quisiera concluir esta revisión sin indicar qué los factores no genéticos contribuyen de manera importante a la diversidad del espectro clínico observado en FQ, en particular a la expresión de la afectación pulmonar y a la severidad de su curso. Estos factores son la edad en que se realiza el diagnóstico, el conocimiento de la enfermedad por el paciente y su familia, la educación sobre su manejo diario, la atención médica específica al curso crónico y sus complicaciones agudas, y el grado de cumplimiento de la terapia indicada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Welsh MJ, Tsui L-C, Boat TF, Beaudet AL. Cystic fibrosis; in Scriver CL, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): The Metabolic Basis of Inherited Disease, Ed.7. New York, McGraw-Hill, 1995; 3799-876.

2. Borrego S, Casals T, Dapena J, Fernández E, Giménez J, Cabeza JC, Sánchez J, Antiñolo G. Molecular and clinical analyses of cystic fibrosis in the South of Spain. Clin Genet 1994; 46: 287-90.

3. Antiñolo G, BorTego S, Gill M, Dapena J, Alfageme 1, Reina E Genotype-phenotype relationship in 12 patients carrying cystic fibrosis mutation R334W. J Med Genet 1997; 34: 89-91.

4. Vázquez C, Antiñolo G, Casals T, Dapena J, Elorz J, Seculi JL, Sirvent J, Cabanas R, Soler C, Estivill X. Thirteen cystic fibrosis patients, 12 compound heterozygous and one homozygous for the missense mutation G85E: a pancreatic sufficiency/insufficiency mutation with variable clinical presentation. J Med Genet 1996; 33: 820-2.

5. Gibbs DE, Bosticck WL, Smith PM. Incomplete pancreatic deficiency in cystic fibrosis of the pancreas. J Pediatr 1950; 37: 320-5.

6. Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Marklewicz D, Cox TK, Chakaravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 1989; 245: 1073-80.

7. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Worldwide survey of the AF508 mutation: Report from the Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Am J Hum Genet 1992; 245: 1073-80.

8. Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Giménez J, Ries A, Varon-Mateeva R, Maceck M, Kalaydjeva I, Angelicheva D, Dancheva R, Romeo G, Russo MP, Garnerone S, Restagno G, Ferrari M, Magnani C,

Clausters M, Desgeorges M, Schwartz M, Dallapicola B, Novelli G, Ferec C, De Arce M, Nemeti M, Kere J, Anvert M, Dahi N, Kadasi L. The origin of the major cystic fibrosis mutation (IncrementoF508) in european population. Nature Genet 1995; 7: 169-75.

9. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczack Z, Zielinski J, Lok S, Plavsic N, Chou J-I, Drumm ML, Ianuzzi C, Collins FS.Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. Science 1989; 245: 1066-73.

10. Dalemans W, Barbry P, Champigny G, Jallat S, Dott K, Dreyer D, Crystal RG, Paviani A, Lecoqc JP, Lazdunski M. Altered chIoride ion channel kinetics associated with the, AF508 cystic fibrosis mutation. Nature 1991; 354: 526-8.

11. Rommens JM, Dho S, Bear CE, Kartner N, Kennedy D, Riordan JR, Tsui L-C, Foskett JK. C-AMP-inducible chloride conductance in mouse fibroblast line stably expressing the human cystic fibrosis conductance regulator. Proc Natl Acad Sel USA 1991; 88: 7500-4.

12. Bear CE, Li C, Karmer N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjeesingh M, Riordan JR. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis conductance transmembrane regulator (CFTR). Cell 1992; 68: 809-18.

13. The Cystic Fibrosis Analysis Concortium: population variation of common cystic fibrosis mutations. Hum Mut 1994; 4: 167-77.

14. Kerem E, Corey M, Kerem B, Rommens JM, Marckiewiez D, Levinson H, Tsui L-C, Durie P. The relationship between genotype and genotype in cystic fibrosis. Analysis of the most common mutation (IncrementoF508). N Engl J Med 1990; 323: 1517-22.

15. Tsui L-C. The spectrum of cystic fibrosis mutations. TIG 1992; 8: 392-8.

16. The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium: Correlation between genotype and phenotype in patients with eystic fibrosis. N Engl J Med 1993; 329: 1308-13.

17. WeIsh M.I, Smith AE. Molecular mechanism of CFTR chIoride channel dysfunction in eystic fibrosis. Cell 1993; 73: 1251-4.

18. Kerem E, Kerem B. The relationship between phenotype and genotype in cystic fibrosis. Curr Opin Pulmonary 1995; 1: 450-6.

19. Wielshanski M, Zielinski J, Markiewiez D, Tsui L-C, Corey M, Levinson H, Durie PR. Correlation of sweat chIoride concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. J Pediatr 1995; 127: 705-10.

20. Augarten A, Kerem B, Yahav Y, Noiman S, RivIin Y, Asher T, Blau H, Ben-Tur L, Szeinberg A, Kerm E, Gazit E. Mild eystie fibrosis and normal or borderline sweat test in patients with the 3849+10kb C->T mutation. Lancet 1993; 342: 25-6.

21. Shoshani T, Kerem E, Ben-Tur L, Tal A, Szeinberg A, Yahav Y, Augarten A, Kerem B. Association between the pulmonary function and levels of aberrantly spliced mRNA transcribed in epithelial cells from the 3849+10kb C->T mutation. Pediatr Pulmonol 1994;S 10:213.

22. Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG. Genetic basis of exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. Nature Genet 1993; 3: 151-6.

23. Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, Romey M-C, Ruiz Romero J, Verligue C, Claustres M, Nunes V, Ferec C, Estivill X. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. N Engl J Med 1995; 332: 1475-80.

24. Kerem E, Rave-Harel N, Nissim-Raffinia M, Goshen R, Magdar 1, Augarten A, Kerem E. Variable levels of aberrantly spliced CFTR mRNA transcribed from the 5T allele: The cause for variable disease severity among individuals and between organs of the same individual. Am J Hum Genet 1995; S57: 1412.

25. Chillón M, Dork T, Casals J, Giménez G, Fonknechten N, Will K, Ramos D, Nunes V Estivill X. A novel donor splice site in intron 11 of the CFTR gene creates a mutation 1811+1.6 kb A->G that produce a new exon: High frecuency in spanish cystic fibrosis chromosomes and association with severe phenotype. Am J Hum Genet 1995; 56: 623-9.

26. Chu CS, Trapnell BC, Murtagh JJ Jr, Moss J, Dalemans W, Jallat S, Mercenier A, Paviani A, Lecoqc JP, Cutting GR, Guggino WB, Crystal RG. Variable deletion of exon 9 coding sequence in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mRNA transcripts in normal bronchial epithelium. EMBO J 1991; 10: 1355-63.

27. Rozmahel R, Wilschanski M, Angabin M, Plyte S, Oliver M, Auerbach W, Moore A, Forstner L, Durie P, Nadeau J, Bear C, Tsui L-C. Modulation of disease severity in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficient mice by a secondary genetic factor. Nature Genet 1996; 12: 280-7.