



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 333 518**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **01933906 .8**

(96) Fecha de presentación : **30.04.2001**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1278891**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **29.01.2003**

(54) Título: **Método y sondas para el diagnóstico genético de la hemocromatosis.**

(30) Prioridad: **02.05.2000 AT A 766/2000**
08.05.2000 AT A 799/2000

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.02.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.02.2010

(73) Titular/es: **Viennalab Diagnostics GmbH**
Gaudenzdorfer Guertel 43-45
1120 Vienna, AT

(72) Inventor/es: **Piperno, Alberto;**
Gasparini, Paolo;
Camaschella, Clara;
De Villiers, Nico;
Oberkanins, Christian y
Kury, Friedrich

(74) Agente: **Aznárez Urbieto, Pablo**

ES 2 333 518 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método y sondas para el diagnóstico genético de la hemocromatosis.

La invención se refiere a un método para el diagnóstico genético de la hemocromatosis, así como a sondas para el diagnóstico genético de la hemocromatosis.

La Hemocromatosis Hereditaria (HH) /11/ es una enfermedad autosomal recesiva común que se caracteriza por un trastorno del metabolismo del hierro en el cuerpo humano que conduce a una sobrecarga progresiva de hierro. El hierro en exceso se deposita en diversos órganos, principalmente el hígado, el corazón y el páncreas, causando daños irreversibles y enfermedades tales como cirrosis hepática, diabetes, artritis, cardiomiopatías y muerte prematura. Con un diagnóstico temprano y un tratamiento por flebotomía terapéutica se puede prevenir completamente el daño a los órganos y la esperanza de vida de los pacientes es la normal. Debido a que, a menudo, los síntomas clínicos de la hemocromatosis no aparecen antes de los 40, 50 o más años de edad, cuando pueden existir ya daños irreversibles en los órganos, es preferible un diagnóstico presintomático.

Se ha identificado un número de mutaciones puntuales en un nuevo gen de tipo MHC clase I denominado HFE (locus 6p) y que están relacionadas con HH /1,7,9/. Este gen codifica una proteína que interactúa con el receptor de la transferrina (TFRC) y que afecta negativamente a la captación de hierro celular de la transferrina /36/. En 1996 se identificó el gen HFE y se han descrito originalmente dos mutaciones, C282Y y H63D /1/. Estas dos mutaciones se utilizan actualmente para el diagnóstico genético de la hemocromatosis.

La H63D es una mutación C → G en el codón 63, que transforma el aminoácido 63 de histidina en ácido aspártico. Debido a su alta frecuencia en la población general, su papel en el diagnóstico de la enfermedad sigue siendo dudoso.

Un criterio mucho mejor para el diagnóstico de la hemocromatosis es la mutación de C282Y, encontrada en el 65% hasta el 95% de los pacientes en cuestión. C282Y es una mutación G → A en el nucleótido 845 de la secuencia de cADN de HFE que convierte el aminoácido 282 de cisteína a tirosina. Por tanto, la mayoría de los pacientes con HH son homocigóticos para la C282Y /1,13,14,15/. Entre las probandas de HH, los heterocigotos compuestos para C282Y/H63D dan cuenta de aproximadamente un 5-7% /1,16/, los homocigotos para H63D son muy raros y, en general, ambos tienen una forma suave de hemocromatosis /17/. Una minoría de casos que se presentan con un fenotipo HH son heterocigotos para C282Y o H63D o ni C282Y ni H63D. Parece que esto es más común en el sur de Europa que en el norte de Europa /18/19/. Esto significa que el porcentaje de pacientes con hemocromatosis que no presentan una mutación de C282Y varía, siendo, por ejemplo, más alta en Italia que en los países del norte de Europa. En un estudio de colaboración que incluía 188 pacientes italianos con el fenotipo tipo HH, se caracterizó incompletamente un 28% con al menos un cromosoma sin una mutación asignada /19/. En algunos de estos pacientes se ha sugerido la presencia de otras mutaciones de HFE u otros determinantes genéticos unidos en 6p o la existencia de otra forma de sobrecarga genética de hierro no ligada al cromosoma 6 /19,20,21/. Se han descubierto recientemente tres nuevas mutaciones de HFE en el estado heterocigoto en asociación con C282Y en casos únicos con HH clásica: una mutación del sitio de empalme (IVS3 + 1G → T) causando un salto obligado del exón 3 /22/ y dos mutaciones de sentido erróneo (I105T y G93R) localizadas en el dominio $\alpha 1$ que pueden afectar a la unión de la proteína del HFE al receptor de transferrina /23/. Además, se descubrió que la mutación de sentido erróneo S65C estaba enriquecida notablemente en cromosomas de HH que no eran C282Y ni H63D, lo que sugiere que S65C podría ser otra variante que contribuye a una forma suave de HH en asociación con C282Y o H63D /9/. Se han descrito recientemente otras mutaciones de sentido erróneo, pero su papel en la patogénesis de HH sigue siendo poco claro /7/.

Aunque se observa una homocigocidad para C282Y en la mayoría de los pacientes caucásicos con HH y es bien reconocida como la causa de la enfermedad, el valor de diagnóstico de otras mutaciones de HFE sigue investigándose. Sería particularmente interesante definir las mutaciones causantes de la enfermedad en aquellos pacientes con HH que no son homocigotos para C282Y.

Por tanto, es importante encontrar -además de las mutaciones conocidas- otras causas genéticas en el gen HFE u otros genes que pueden conducir al exceso de hierro en un paciente.

Por esta razón, el problema de la presente invención consiste en encontrar otras posibilidades para diagnosticar las causas genéticas de la hemocromatosis.

El problema se resuelve mediante el examen de una muestra biológica en busca de la presencia de una mutación G → T en el nucleótido 502 de la secuencia de cADN de HFE. Esta mutación se descubrió durante el reconocimiento de cinco pacientes italianos no relacionados heterocigotos para C282Y con el fenotipo clásico de hemocromatosis. La mutación (nt 502 G → T o E168X) se identificó en el exón 3 del cromosoma negativo C282Y. La mutación G → T en el nucleótido 502 provoca la conversión del aminoácido 168 correspondiente de ácido glutámico a un codón de parada (E168X).

La presente descripción se refiere también al examen de una muestra biológica en busca de la presencia de una mutación G → C en el nucleótido 502 de la secuencia de cADN de HFE. Esta mutación en el exón 3 (nt 502 G → C o E168Q) se identificó en una mujer caucásica sudafricana de 79 años de edad. Era también heterocigota para la mutación de H63D y su ferritina en suero era moderadamente elevada en el momento de la prueba (242 ng/ml; valores de referencia: 12-119 ng/ml). Se presentó sin síntomas clínicos notables, pero tenía un historial familiar tanto de

ES 2 333 518 T3

enfermedad cardíaca como de distintos tipos de cáncer. Se identificó inicialmente una mutación de E168Q mediante un análisis del polimorfismo de conformación de una sola hebra /7/ (SSCP) y se confirmó posteriormente por secuenciación del ADN. La mutación G → C en el nucleótido 502 causa la conversión del aminoácido 168 correspondiente de ácido glutámico a glutamina (E168Q).

Preferentemente, la muestra biológica se examina adicionalmente en busca de la presencia de una mutación G → A en el nucleótido 845 y/o una mutación C → G en el nucleótido 187 de la secuencia de cADN de HFE, de modo tal que pueda tener lugar un diagnóstico de hemocromatosis aunque se encuentre sólo una de estas mutaciones conocidas.

El problema se resuelve además mediante el examen de una muestra biológica en busca de la presencia de ácidos nucleicos que codifican para los productos de HFE con una sustitución de ácido glutámico por glutamina o un codón de parada en el aminoácido 168 (E168Q, E168X) o el examen de una muestra biológica en busca de la presencia de un producto genético de HFE con una sustitución de ácido glutámico por glutamina o un codón de parada en el aminoácido 168 (E168Q, E168X).

Las mutaciones puntuales conocidas en el estado de la técnica o de acuerdo con la presente invención y descritas anteriormente provocan ciertas sustituciones de aminoácidos y se han encontrado en pacientes afectados de hemocromatosis. Sin embargo, las sustituciones de aminoácidos descritas anteriormente también ser resultado de mutaciones distintas a dichas mutaciones conocidas o mutaciones de acuerdo con la presente invención y conducirán por ello a una afección o una situación portadora. Por tanto, el examen de una muestra biológica en busca de la presencia de una o más de las sustituciones de aminoácidos anteriores proporcionará información sobre si el paciente del que procede la muestra biológica está afectado por o es portador de hemocromatosis.

Como muestra biológica se puede utilizar sangre, tejido biopsico, frotis de la cavidad oral, fluido amniótico o similar y la muestra biológica se somete a un pretratamiento conocido de acuerdo con el procedimiento conocido seleccionado de reconocimiento.

Cuando se examina también la muestra biológica en busca de la presencia de ácidos nucleicos que no muestran las mutaciones mencionadas o las sustituciones de aminoácidos en su gen HFE o productos genéticos respectivos, se puede demostrar si las mutaciones son heterocigotas u homocigotas.

El examen se puede realizar de manera conocida por análisis de secuencia de los ácidos nucleicos procedentes de la muestra biológica.

O los ácidos nucleicos de la muestra biológica se ponen en contacto con al menos una sonda capaz de hibridarse con una región de dichos ácidos nucleicos correspondiente a una región de la secuencia de cADN de HFE que contiene el nucleótido 502 si existe una mutación G → T en la posición 502 de la secuencia de cADN de HFE y/o que contiene el nucleótido 502 si existe una mutación G → C en la posición 502 del gen de HFE y se realiza un examen en relación a si se han creado los productos respectivos de hibridación. A partir de la muestra biológica, los ácidos nucleicos (ADN y/o ARN genómico, por separado o mezclados) se vuelven asequibles por medio de cualquiera de los métodos respectivos conocidos del estado de la técnica.

Cuando también se debe examinar la muestra biológica en busca de la presencia de la mutación conocida de C282Y y/o H63D, los ácidos nucleicos de la muestra biológica se ponen en contacto también con al menos otra sonda capaz de hibridarse con una región de dichos ácidos nucleicos correspondiente a una región de la secuencia de cADN de HFE que contiene el nucleótido 845 si existe una mutación G → A en el nucleótido 845 y/o el nucleótido 187 si existe una mutación C → G en el nucleótido 187 de la secuencia de cADN de HFE y se realiza un examen en relación a si se han creado los productos respectivos de hibridación.

Para diferenciar si una o más mutaciones son heterocigotas u homocigotas, preferentemente los ácidos nucleicos de la muestra se ponen también en contacto con al menos otra sonda capaz de hibridarse con una región de dichos ácidos nucleicos correspondiente a una región de la secuencia de cADN de HFE que contiene al menos uno de dichos nucleótidos si no existe ninguna mutación y se realiza un examen en relación a si se han creado los productos respectivos de hibridación.

Actualmente se utiliza diversos métodos diferentes para el análisis de las mutaciones, entre ellos el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), PCR con cebadores específicos para secuencias (PCR-SSP), hibridación de oligonucleótidos específicos de alelos, polimorfismo de conformación de una sola hebra (SSCP), electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA), PCR en tiempo real de fluorescencia y secuenciación de ADN /1,2,3,4,5,6,7,8,9/. Cuando se examina el ARN, se puede llevar a cabo por ejemplo mediante "NASBA" o el ARN se transcribe en cADN por transcripción inversa, que se amplifica después por PCR y que se caracteriza sucesivamente. Todos estos métodos de análisis conocidos se pueden utilizar para el método de diagnóstico de la presente invención.

La sonda para el diagnóstico de la hemocromatosis por medio de mutaciones en el gen HFE de acuerdo con la invención es capaz de hibridarse con los ácidos nucleicos de una muestra biológica en una región que corresponde a una región de la secuencia de cADN de HFE que contiene el nucleótido 502 para determinar si existe una mutación G → T en la posición 502 de la secuencia de cADN de HFE.

Los siguientes ejemplos describen las posibilidades de ejecución en cuanto a los métodos de diagnóstico de la hemocromatosis de acuerdo con la invención. Las figuras adjuntas ayudan a ilustrar los ejemplos. La ilustración gráfica de la Fig. 1 muestra algunos modelos de tinción posibles que se pueden obtener con ADNs que portan distintos alelos de HFE mutantes y de tipo salvaje por medio de hibridación inversa tal como se explica en el Ejemplo 2.

Ejemplo 1

Aislamiento y Amplificación de ADN

Se aisló ADN de sangre anticoagulada por métodos de extracción estándar /10/ o con reactivos comercialmente disponibles (GenXtract DNA extraction system, ViennaLab). Las secuencias del exón 3 del gen HFE se amplificaron en una reacción PCR utilizando los cebadores 5'-GGA TTG GAG AGC AGC AGA AC-3' y 5'-AAA CTC CAA CCA GGG ATT CC-3'. Cada cebador se utilizó a una concentración final de 0,4 μ M en el tampón 1xPCR que contenía 1,5 mM Mg^{2+} , 200 μ M dNTPs (Epicentre, Madison, WI) y 0,02 U/ μ l de polimerasa AmpliTaq DNA (PE Biosystems, Foster City, CA). Se realizó un programa de termociclos de 30 ciclos (94°C durante 15 s, 58°C durante 30 s, y 72°C durante 30 s) en un GeneAmp PCR System 2400 (PE Biosystems).

Secuenciación

Se purificaron los productos PCR con columnas "Centricon-100" de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El ADN amplificado y purificado se cuantificó por espectrofotometría UV y posteriormente se secuenció estrictamente siguiendo el protocolo descrito en el kit de reacción "BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit - con Polimerasa AmpliTaq DNA, FS" (PE Applied Biosystems) de ABI Prism instrumentation (PE Applied Biosystems).

Ejemplo 2

A continuación, se describe la aplicación con éxito de la hibridación inversa, para establecer una prueba de detección para la detección de algunas mutaciones conocidas y algunas nuevas mutaciones puntuales de HFE y TFR2, así como una nueva mutación por cambio de marco de TFR2. La prueba se basa en la amplificación multiplex de ADN y tiras de prueba de membrana listas para usar que contienen sondas de oligonucleótido para cada alelo de tipo salvaje y mutado inmovilizado como serie de franjas paralelas. La prueba es rápida, fácil de realizar y se puede acceder a la automatización en equipos comercialmente disponibles, y con la adición de nuevas sondas la tira de prueba se puede adaptar fácilmente para abarcar un número creciente de mutaciones.

Aislamiento y Amplificación de ADN

Se aisló ADN de sangre anticoagulada por métodos de extracción estándar /10/ o reactivos comercialmente disponibles (GenXtract DNA extraction system, ViennaLab). Las secuencias de los exones 2, 3 y 4 del gen HFE y las secuencias de los exones 2, 4 y 6 del gen TFR2 se amplificaron en una única reacción PCR multiplex utilizando los cebadores 5'-biotinilados (1,31,32/; Tabla 3). Cada cebador se utilizó a una concentración final de 0,4 μ M en el tampón 1xPCR que contenía 1,5 mM Mg^{2+} , 200 μ M dNTPs (Epicentre, Madison, WI) y 0,02 U/ μ l de polimerasa AmpliTaq DNA (PE Biosystems, Foster City, CA). Se realizó un programa de termociclos de 30 ciclos (94°C durante 15 s, 58°C durante 30 s y 72°C durante 30 s) en un GeneAmp PCR System 2400 (PE Biosystems).

Preparación de las Tiras de Prueba

El principio general de marcar de cola e inmovilizar las sondas de hibridación específicas de las secuencias ya se ha descrito anteriormente /34/. Las sondas (16-24 meros) específicas del alelo de tipo salvaje o mutante de cada mutación se seleccionaron a partir de las secuencias de los bancos de datos para HFE y TFR2 (números de acceso al GenBank: HFE-Z92910, TFR2-AF067864) y se sintetizaron mediante la química de fosforamidita estándar. Se añadió enzimáticamente una marca de cola 3'-poli(dT) (300-500 residuos) mediante la incubación de oligonucleótidos (200 pmol) en presencia de 60 U de transferasa desoxinucleotidilo terminal (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK) y 150 nmol de dTTP (Epicentre) durante 8 horas a 37°C. La reacción terminó por la adición de EDTA 10 mM y se comprobó la eficacia del marcaje de cola mediante electroforesis en gel de agarosa. Las sondas con marca de cola poli(dT) se aplicaron a hojas de membrana de nitrocelulosa (Whatman, Maidstone, UK) como franjas paralelas separadas de 1 mm de ancho utilizando un aparato slot-blot hecho a medida, se secaron y fijaron mediante cocido durante toda la noche a 60°C. Se incluyó un oligonucleótido control 5'-biotinilado para permitir el control del rendimiento de los reactivos de detección. La hoja de membrana finalmente se cortó en tiras de pruebas de 3 mm listas para usar.

Hibridación Inversa y Detección

Se llevó a cabo todo el procedimiento de hibridación y detección en franjas individuales de una bandeja de incubación de plástico de paredes finas (Bio-Rad, Hercules, CA). Se mezclaron volúmenes iguales (10 μ l) del producto de PCR y una solución desnaturalizante (400 mM NaOH, 10 mM EDTA) y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. La reacción alcalina se neutralizó con un tampón de fosfato de sodio, pH 7, se añadió una tira de prueba y se llevó a cabo la hibridación durante 30 minutos a 45°C en un baño de agua, con agitación. Después de tres lavados

rigurosos a 45°C, se detectaron fragmentos unidos de PCR utilizando un conjugado de fosfatasa alcalina-estreptavidina y sustratos de color (NBT/BCIP). Cuando la reacción era positiva, era visible una coloración morada a los 15 minutos de incubación a temperatura ambiente.

5 Resultados

Se estableció un sistema PCR multiplex para obtener fragmentos de ADN biotinilados que comprendían los exones 2, 3 y 4 del gen HFE y los exones 2, 4 y 6 del gen TFR2 en una única reacción de amplificación. Para evitar errores tipográficos potenciales de la mutación C282Y debidos a un polimorfismo intrónico (5569G → A) dentro de la región de unión del cebador inverso original de Feder y col. (1996) /1/, el fragmento del exón 4 se modificó de acuerdo con Jeffrey y col. (1999) /32/.

Para desarrollar el ensayo de hibridación inversa, se recogieron muestras de ADN de individuos conocidos por portar las siguientes mutaciones exónicas de HFE: HFE: V53M, V59M, H63D, H63H, S65C, Q127H, E168Q, E168X, W169X, C282Y, Q283P; TFR2: E60X, M172K e Y250X (Tabla 1).

TABLA 1

Franja	Especificidad de la sonda	Designación de la mutación	Referencia
	(control)		
1	nt 157 G → A exón 2	HFE V53M	Villiers y col. /7/
2	nt 175 G → A exón 2	HFE V59M	Villiers y col. /7/
3	nt 187 C → G exón 2	HFE H63D	Feder y col. /1/
4	nt 189 T → C exón 2	HFE H63H	Villiers y col. /7/
5	nt 193 A → T exón 2	HFE S65C	Mura y col. /9/
6	nt 381 A → C exón 3	HFE Q127H	Villiers y col. /7/
7	nt 502 G → C exón 3	HFE E168Q	Presente
8	nt 502 G → T exón 3	HFE E168X	invención
9	nt 506 G → A exón 3	HFE W169X	Presente
10	nt 845 G → A exón 4	HFE C282Y	invención
11	nt 848 A → C exón 4	HFE Q283P	Nuevo
12	nt 84-88insC exón 2	TFR2 E60X	Feder y col. /1/
13	nt 515 T A exón 4	TFR2 M172K	Rubini y col. /41/
14	nt 750 C G exón 6	TFR2 Y250X	Nuevo
15	Codón 53 tipo salvaje HFE		Nuevo
16	Codón 59 tipo salvaje HFE		Nuevo
17	Codones 63-65 tipo salvaje HFE		
18	Codones 168-169 tipo salvaje HFE		
19	HFE		
20	Codones 282-283 tipo salvaje HFE		
21	HFE		
22	Codón 60 tipo salvaje TFR2		
	Codón 172 tipo salvaje TFR2		
	Codón 250 tipo salvaje TFR2		

ES 2 333 518 T3

Se seleccionaron varias sondas candidatas de entre 16 y 24 nucleótidos de longitud que codifican el alelo de tipo salvaje o mutante de cada mutación a partir de las secuencias del GenBank para HFE y TFR2. Después del marcaje de cola enzimático poli(dT), los oligonucleótidos se aplicaron a una membrana de nitrocelulosa como una serie de franjas paralelas y se fijaron mediante cocido. Finalmente, la hoja de membrana se cortó en tiras de prueba individuales. Los productos de amplificación procedentes de distintas muestras de ADN que cubren las 14 mutaciones totales fueron hibridados en estas tiras de pruebas preliminares en condiciones de rigurosidad idénticas y controladas con precisión. Las secuencias biotiniladas unidas se detectaron por medio de un conjugado de estreptavidina-enzima y reacción de tinción. A partir de estos resultados, se diseñó la tira de pruebas final mediante la selección de sondas que reconocían específicamente el alelo de tipo salvaje o el alelo mutante en las mismas condiciones estandarizadas. Se incluyó una sonda de control que contenía residuos de biotina para que reaccionara positivamente sin tener en cuenta la presencia de fragmentos de ADN de hibridación para controlar el rendimiento del sistema de detección. La ilustración gráfica de la Fig. 1 muestra algunos modelos posibles de tinción obtenibles con ADNs que llevan distintos alelos de HFE o TFR2 mutantes o de tipo salvaje.

Se utilizaron las siguientes muestras:

1. no mutante
2. HFE:V53M heterocigoto
3. HFE:V59M heterocigoto
4. HFE:H63D homocigoto
5. HFE:H63H heterocigoto
6. HFE:S65C heterocigoto
7. HFE:S65C homocigoto
8. compuesto HFE:H63D + HFE:S65C heterocigoto
9. compuesto HFE:H63D + HFE:Q127H heterocigoto
10. compuesto HFE:H63D + HFE:E168Q heterocigoto
11. compuesto HFE:H63D + HFE:W169X heterocigoto
12. compuesto HFE:E168X + HFE:C282Y heterocigoto
13. HFE:C282Y heterocigoto
14. compuesto HFE:H63D + HFE:C282Y heterocigoto
15. compuesto HFE:S65C + HFE:C282Y heterocigoto
16. compuesto HFE:C282Y + HFE:Q283P heterocigoto
17. HFE:C282Y homocigoto
18. TFR2:E60X homocigoto
19. TFR2:M172K heterocigoto
20. TFR2:Y250X heterocigoto
21. TFR2:Y250X homocigoto
22. control PCR negativo

La mayoría de las técnicas conocidas son muy limitadas en su capacidad para identificar más de una mutación en una sola prueba; por tanto, un análisis genético completo puede resultar más bien laborioso. Por otra parte, los métodos altamente informativos como la secuenciación de ADN no son adecuados para los laboratorios de diagnóstico rutinarios, en los que se necesita alta capacidad de producción de muestras. Con el ensayo descrito más arriba, la técnica de hibridación inversa se aplicó con éxito para analizar 14 mutaciones diferentes (11 mutaciones de HFE, 3 mutaciones de TFR2) simultáneamente en un único experimento. Antes, se empleaba mucho este método para la

genotipificación de enfermedades hereditarias complejas, tal como la fibrosis cística /30/ y la talasemia /33/, así como agentes infecciosos, como el virus de la hepatitis C /35/.

El modelo de tinción de una sonda mutante y su sonda de tipo salvaje correspondiente permite la discriminación de tres genotipos posibles: la mutación está ausente sólo si la sonda de tipo salvaje se tiñe de positivo, ambas señales son visibles en los heterocigotos y sólo la sonda mutante es positiva en muestras de mutantes homocigotos. Se aplica el mismo principio a la mayoría de los heterocigotos compuestos para dos mutaciones (Fig. 1, calles 8-12, 14-16). Sin embargo, el gen HFE contiene al menos dos regiones, una en el exón 2 (nt 187-193) y la otra en el exón 3 (nt 502-506), donde se han encontrado varias mutaciones muy cercanas. Como las sondas de hibridación abarcan más de una mutación en esta zona, no se observa ninguna señal de tipo salvaje si las dos mutaciones procedentes del mismo grupo (por ejemplo H63D y S65C) tienen lugar en distintos cromosomas en la misma muestra (Fig. 1, calle 8). La aparición de dos mutaciones cercanas en un solo cromosoma conduciría de nuevo a un modelo diferente, pero hasta la fecha no ha sido descrito.

El ensayo de hibridación inversa presentado aquí tiene la capacidad de convertirse en una herramienta valiosa para el diagnóstico rutinario de múltiples mutaciones de HFE y/o TFR2. Al utilizar una única reacción de amplificación multiplex y tiras de prueba elaboradas previamente, listas para usar, el procedimiento es sencillo, fiable y se puede realizar en pocas horas desde la extracción de sangre hasta los resultados finales. Para una gran producción de muestras, se pueden automatizar las pruebas en un equipo ya existente comercialmente disponible, tal como profiBlot II T (TECAN AG, Hombrechtikon, Suiza). El número de mutaciones abarcado por el presente ensayo se puede ampliar fácilmente utilizando la misma aproximación para seleccionar sondas de hibridación adicionales.

Ejemplo 3

Se estudiaron cinco probandas italianas afectadas por HH que eran heterocigotas para C282Y y negativas para H63D. Cumplían todas con los criterios fenotípicos clásicos para la HH homocigota:

- 1) aumento de la saturación de transferrina (en repetidas ocasiones > 50% en ayuno) y aumento de niveles de ferritina en suero;
- 2) depósitos hepatocelulares de hemosiderina de grado III o IV según Scheuer y col. /24/;
- 3) índice de hierro hepático ≥ 2 .

Se excluyeron las anemias por carga de hierro, hepatitis viral crónica B y C e historiales de alto consumo de alcohol o de transfusiones de sangre. Todos los pacientes y sus parientes dieron su consentimiento con previo conocimiento al estudio.

En los estudios clínicos, la presencia de fibrosis y cirrosis se determinó mediante una biopsia de hígado. Todos los cirróticos se encontraban en la clase Child A. La presencia de complicaciones clínicas relacionadas con la HH se determinó de acuerdo con los criterios anteriormente descritos /25/. La saturación de transferrina y la ferritina en suero se midieron por métodos estándar. La concentración de hierro hepático (HIC) se determinó por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin-Elmer S2380, Norwak, CT) y se calculó el índice de hierro hepático (HII) (relación entre HIC [$\mu\text{mol/g}$ en peso seco] y la edad [años]). La cantidad total de hierro eliminada por flebotomía (IR) se evaluó tal como se ha indicado anteriormente /25/. El origen geográfico de los pacientes se comprobó hasta la cuarta generación.

En los estudios moleculares, se extrajo ADN genómico de leucocitos de sangre periférica. Se detectaron las mutaciones de C282Y y H63D por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y digestión por enzimas de restricción con Rsa I y Bcl I, respectivamente /18/. Se analizaron los microsatélites D6S265, D6S105 y D6S1281 tal como se describe /26/. Los antígenos HLA-A se definieron mediante la prueba de microlinfotoxicidad. Se construyeron manualmente los haplotipos en base a la segregación intrafamiliar de los alelos marcadores.

Toda la secuencia de codificación y los límites exón-intrón del gen HFE se amplificaron por PCR según Carella y col. /18/. La secuencia de nucleótidos de ambas hebras de ADN se determinaron independientemente en todas las probandas y en las relacionadas con el cromosoma negativo de C282Y idéntico a la probanda por medio de la reacción de terminación de la cadena de didesoxi con la versión 2.0 de Sequenase/USB Amersham, Cleveland, Ohio) y 35 S- α -dATP, de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Las reacciones se separaron en un gel de poliácridamida desnaturizante al 6% y se visualizaron mediante autorradiografía. Los cebadores empleados para la secuenciación fueron los mismos que los que se utilizaron para las reacciones de PCR.

Para confirmar además la presencia de las nuevas mutaciones (véase la sección de resultados), se realizó un análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Como las dos mutaciones no crearon ni destruyeron ningún sitio de endonucleasa de restricción, la porción de exón 3 que contenía las mutaciones se amplificó por PCR utilizando el oligonucleótido de sentido erróneo específico de cada mutación (Bria-F: 5' TGGCCCCACCAAGCTGGACT 3'; Dom-F: 5' GCCTGGCCCCACCAACTG 3') para crear un sitio de restricción informativo para BsrSI en la secuen-

cia de HFE de tipo salvaje. El oligonucleótido antisentido era el mismo que el que se utilizó para la secuenciación. Se muestran los resultados en la siguiente Tabla 2.

TABLA 2

Datos de las 5 probandas afectadas por hemocromatosis

	Sexo	Edad	TS%	SF µg/l	Grado de Scheuer	HIC µmol/g	HII	IR	Complicación clínica
1	M	48	96	694	4	238	4,9	4	ninguna
2	M	47	79	1206	4	359	7,6	23	C
3	M	42	86	608	3	144	3,4	3,6	ninguna
4	M	50	106	2740	4	425	8,5	21	C, H, D
5	M	66	100	1351	4	421	5,4	-	C,H,A,D

Leyenda. TS: saturación de transferrina; SF: ferritina en suero; HIC: concentración de hierro hepático; HII: índice de hierro hepático; IR: hierro eliminado; C: cirrosis hepática; H: hipogonadismo; A: artropatía; D: diabetes.

La Tabla 2 indica el hierro y los datos clínicos de las 5 probandas. Tres pacientes (1, 2 y 3) tenían sus orígenes en el mismo valle subalpino al noroeste (Ossola) y dos (4 y 5) en una región alrededor de la ciudad de Monza (Brianza). Los análisis de secuencia del gen HFE en las probandas mostraron dos nuevas mutaciones sin sentido en el exón 3 en el estado heterocigoto. La primera, una mutación G → T en el nucleótido 502 de la secuencia de cADN de HFE (codón 168) (GAG → TAG, Glu → Stop) se encontró en las probandas del valle de Ossola. La segunda, una mutación de G → A en el nucleótido 506 de la secuencia de cADN de HFE (codón 169) (TGG → TAG, Trip → Stop) se detectó en las probandas de la región de Brianza. Las nuevas variantes se llamaron HFE-Ossola y HFE-Brianza, según el origen de los pacientes.

En una familia se encontró a un hermano afectado que compartía los mismos haplotipos del cromosoma 6p y las mismas mutaciones de HFE con la probanda. Su HIC era de 176,2 µmol/g y el HII de 3,92.

Las dos nuevas variantes estaban en completo desequilibrio de enlace con las mutaciones C282Y y H63D. HFE-Ossola estaba asociada con el haplotipo D6S265-3, HLA-A24, D6S105-5 y D6S1281-6 en dos familias, mientras que en la tercera familia, el haplotipo cambiaba en los loci D6S265 y HLA-A, sugiriendo que un evento de recombinación ocurría entre HLA-A y D6S105. HFE-Brianza estaba asociada con el haplotipo D6S265-3, HLA-A24, D6S105-6 y D6S1281-6.

Las dos mutaciones determinan un codón de parada en el nucleótido 502 y 506 del marco de lectura abierto (nt 502 GAG → TAG y nt 506 TGG → TAG) respectivamente, conduciendo a proteínas que carecen del dominio a3, el dominio de transmembrana y la cola citoplásmica. Estas mutaciones producen probablemente, a diferencia de C282Y, una disrupción completa de la función de HFE similar a la que es inducida por la delección parcial del exón 4 en ratones carentes de HFE /27,28/. Así, estos alelos mutados pueden comportarse como un alelo nulo. Se espera que la combinación de estas mutaciones en el estado heterocigoto compuesto con C282Y conduzca a la expresión fenotípica severa. Tres de las cinco probandas (2, 4 y 5) tenían realmente una enfermedad grave caracterizada por la presencia de grandes cantidades de sobrecarga de hierro y complicaciones clínicas relacionadas con la HH. La probanda 3 tenía un fenotipo suave, probablemente debido al hecho de que había sido donante de sangre en los últimos 10 años, mientras que la probanda 1 y su hermano afectado tenían un fenotipo relativamente suave y ningún otro factor protector obvio como pérdida de sangre o malabsorción.

Por tanto, existe una variabilidad fenotípica en estos pacientes que se puede relacionar con factores tanto medioambientales como genéticos. La existencia de genes de modificación localizados alrededor de la región de D6S105 que influyen en la expresión fenotípica de pacientes con HH homocigotos para C282Y ha sido recientemente propuesta /25,29/, pero se necesitan otros estudios para aclarar las correlaciones genotipo-fenotipo en pacientes con HH.

Los heterocigotos para las mutaciones de HFE-Ossola y HFE-Brianza no tenían índices elevados de hierro en suero, lo que indica que la mutación tampoco era capaz de producir una sobrecarga de hierro en el estado heterocigoto. Además, los tres heterocigotos compuestos para HFE-Ossola o HFE-Brianza y H63D no mostraron ninguna evidencia de sobrecarga de hierro. Como eran mujeres y/o personas jóvenes, es posible que, como ocurre para C282Y, la com-

binación de las dos mutaciones sin sentido con H63D u otras mutaciones suaves de HFE puedan producir un fenotipo de HH con baja penetrabilidad /17/.

Este es el primer descubrimiento reportado de mutaciones sin sentido del gen HFE. Además, ésta es la primera descripción de varias probandas no relacionadas afectadas por HH que son heterocigotos compuestos para C282Y y una mutación distinta de H63D. Las dos mutaciones indicadas aquí tuvieron su origen probablemente en las dos regiones del noroeste de Italia y su frecuencia aumentó como consecuencia de un efecto fundador local. Como no existe ninguna cosanguinidad hasta las cuartas generaciones entre las familias afectadas dentro de cada una de las dos regiones geográficas, las dos mutaciones debieron producirse hace mucho más de 100 años. El análisis de la frecuencia de genotipos de HFE en probandas de HH originarias de las dos regiones italianas de Ossola y Brianza muestra que los heterocigotos compuestos para C282Y y HFE-Ossola o HFE-Brianza son más frecuentes que, o al menos tan frecuentes como, los heterocigotos compuestos para C282Y/H63D (datos no mostrados). De hecho, los heterocigotos compuestos para C282Y/HFE-Ossola dan cuenta de un 25% de probandas de HH en la región de Ossola (contra un 8,3% de C282Y/H63D) y los heterocigotos compuestos para C282Y/HFE-Brianza y C282Y/H63D dan cuenta cada uno de un 8,4% de probandas de HH en la región de Brianza. Aunque la baja frecuencia de heterocigotos compuestos para C282Y/H63D se debe a la muy baja penetrabilidad de este genotipo (del 0,44% al 1,5% en distintas poblaciones) /17/, se espera que los heterocigotos compuestos para C282Y/HFE-Ossola o HFE-Brianza tengan un 100% de penetrabilidad debido a la severidad de ambas mutaciones. Estos resultados confirman que la HH en Italia no es tan homogénea como en el norte de Europa y subraya la posibilidad de otras mutaciones de HFE que pueden tener distinta relevancia en distintos países. El reconocimiento de estas mutaciones puede tener implicaciones prácticas en las estrategias de diagnóstico y exploración de la HH.

Referencias

1. Feder J. N., Gnirke A., Thomas W., Tsuchihashi Z., Ruddy D. A., Basava A., Dormishian F., Domingo R., Ellis M. C., Fullan A., Hinton L. M., Jones N. L., Kimmel B. E., Kronmal G. S., Lauer P., Lee V. K., Loeb D. B., Mapa F. A., McClelland E., Meyer N. C., Mintier G. A., Moeller N., Moore T., MoriKang E., Prass C. E., Quintana L., Starnes S. M., Schatzman R. C., Brunke K. J., Drayana D. T., Risch N. J., Bacon B. R., Wolff R. K.. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996; 13:399-408.
2. Jazwinska, E. C., Cullen, L. M., Busfield, F., Pyper, W. R., Webb, S. I., Powell, L. W., Morris, C. P., and Walsh, T. P. (1997). Haemochromatosis and HLA-H. *Nature Genet.* 14, 249-251.
3. Obericanins C., Kazemi-Shirazi L., Kury F., Polli C., Maier-Dobersberger T., Yeganehfar C., and Ferenci P. (1997). Genotyping of the hereditary haemochromatosis mutation (HLA-H:C282Y) in microtiter plates. *Am. J. Hum. Genet.* 61, A225 (Suppl.).
4. Steffensen R., Varming K., and Jersild C. (1998). Determination of gene frequencies for two common haemochromatosis mutations in the Danish population by a novel polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Tissue Antigens* 52, 230-235.
5. Bollhalder M., Mura C., Landt O., and Maly F. E. (1999). LightCycler PCR assay for simultaneous detection of the H63D and S65C mutations in the HFE hemochromatosis gene based on opposlte melting temperature. *Clin. Chem.* 45, 2275-2278.
6. Christiansen L., Bygum A., Thomsen K., Brandrup F., Horder M. and Petersen N. E. (1999). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the hemochromatosis (HFE) gene: impact of HFE gene mutations on the manifestation of porphyria cutanea tarda. *Clin. Chem.* 45, 2025-2026.
7. Villiers J. N., Hillermann R., Loubser L., Kotze M. J. Spectrum of mutations in the HFE gene implicated in haemochromatosis and porphyria. *Hum Mol Genet* 1999; 8:1517-22.
8. Mangasser-Stephan K., Tag C., Reiser A., and Gressner A. M. (1999). Rapid genotyping of haemochromatosis gene mutations on the LightCycler with fluorescent hybridization probes. *Clin. Chem.* 45,1875-1878.
9. Mura C., Raguenes O., Ferec C.. HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood* 1999; 93:2502-5.
10. Miller S. A., Dykes D. D., and Polesky H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 1215.
11. Bacon B. R., Powell L. W., Adams P. C., Kresina T. F., Hoofnagle J. H. Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. *Gastroenterology* 1999; 116:193-207.
13. Jouanolle A. M., Gandon G., Jezeque P., Blayau M., Campion M. L., Yaouanq Y., Mosser J., Fergelot P., Chauvel B., Bouric P., Cam G., Andrieux N., Gicquel I., Le Gail J. Y., David V. Haemochromatosis and HLA-H. *Nat Genet* 1996; 14:251-2.

14. **Beutler E., Gelbert T., West C., Lee P., Adams M., Blackston R., Pockros P., Kosty M., Venditti C. P., Phatak P. D., Seese N. K., Chomey K. A., Ten Elshof A. E., Gerhard G. S., Chorney M.** Mutation analysis in hereditary hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis* 1996; 22:187-94.
- 5 15. **Pietrangelo A., Camaschella C.** Molecular genetics and control of iron metabolism in Hemochromatosis. *Haematologica* 1998; 83:456-61.
16. **Beutler E.** Genetic iron beyond haemochromatosis: clinical effects of HLA-H mutations. *Lancet* 1997; 349:296-7.
- 10 17. **Beutler E.** The significance of 187G (H63D) mutation in hemochromatosis. *Am J Hum Genet* 1997; 61:762-4.
18. **Carella M., D'Ambrosio L., Totaro A., Grifa A., Valentino M. A., Pipemo A., Girelli D., Roetto A., Franco B., Gasparini P., Camaschella C.** Mutation analysis of HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. *Am J Hum Genet* 1997; 60:828-32.
- 15 19. **Pipemo A., Sampietro M., Pietrangelo A., Arosio C., Lupica L., Montosi G., Vergani A., Fraquelli M., Girelli D., Pasquero P., Roetto A., Gasparini P., Fargion S., Conte D., Camaschella C.** Heterogeneity of hemochromatosis in Italy. *Gastroenterology* 1998; 114:996-1002.
- 20 20. **Camaschella C., Fargion S., Sampietro M., Roetto A., Bosio S., Garozzo G., Arosio C., Pipemo A.** Inherited HFE-unrelated hemochromatosis in Italian families. *Hepatology* 1999; 29:1563-4.
21. **Pietrangelo A., Montosi G., Totaro A., Garuti C., Conte D., Cassanelli S., Fraquelli M., Sardini C., Vasta F., Gasparini P.** Hereditary Hemochromatosis in adults without pathogenic mutations in the hemochromatosis gene. *New Engl J Med* 1999; 341:725-32.
- 25 22. **Wallace D. F., Dooley J. S., Walker A. P.** A novel mutation of HFE explains the classical phenotype of genetic hemochromatosis in a C282Y heterozygote. *Gastroenterology* 1999; 116:1409-12.
- 30 23. **Barton J. C., Sawada-Hirai R., Rothenberg B. E., Acton R. T.** Two novel missense mutations of the HFE gene (I105T and G93R) and identification of the S65C mutation in Alabama hemochromatosis probands. *Blood Cells Mol Dis* 1999; 25:146-54.
- 35 24. **Scheuer P. J., Williams R., Muir A. R.** Hepatic pathology in relatives of patients with hemochromatosis. *J. Pathol Bacteriol* 1962; 84:53-64.
25. **Pipemo A., Arosio C., Fargion S., Roetto A., Nicoli C., Girelli D., Sbaiz L., Gasparini P., Boari G., Sampietro M., Camaschella C.** The ancestral hemochromatosis haplotype is associated with a severe phenotype expression in Italian patients. *Hepatology* 1996; 24:43-6.
- 40 26. **Camaschella C., Roetto A., Ciciliano M., Pasquero P., Bosio S., Gubetta L., Di Vito F., Girelli D., Totaro A., Carella M., Grifa A., Gasparini P.** Juvenile and adult hemochromatosis are distinct genetic disorders. *Eur J Hum Genet* 1997; 5:371-5.
- 45 27. **Zhou X. Y., Tomatsu S., Fleming R. E., Parkkila S., Waheed A., Jiang J., Fei Y., Brunt E. M., Ruddy D. A., Prass C. E., Schatzman R. C., O'Neill R., Britton R. S., Bacon B. R., Sly W. S.** HFE gene Knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:2492-7.
- 50 28. **Levy J. E., Montross L. K., Cohen D. E., Fleming M. D., Andrews N. C.** The C282Y mutation causing hereditary hemochromatosis does not produce a null allele. *Blood* 1999; 94:9-11.
29. **Pratiwi R., Fletcher L. M., Pyper W. R., Do K. A., Crawford D., Powell L. W., Jazwinska E. C.** Linkage disequilibrium analysis in Australian haemochromatosis patients indicates bipartite association with clinical expression. *Journal of Hepatology* 1999; 31:39-46.
- 55 30. **Chehab F. F., and Wall J. (1992).** Detection of multiple cystic fibrosis mutations by reverse dot blot hybridization: a technology for carrier screening. *Hum. Genet.* 89, 163-168.
- 60 31. **Douabin V., Moirand R., Jouanolle A. M., Brissot P., Le Gall J. Y., Deugnier Y., and David V. (1999).** Polymorphisms in the HFE gene. *Hum. Hered.* 49, 21-26.
32. **Jeffrey G. P., Chakrabarti S., Hegele R. A., and Adams P. C. (1999).** Polymorphism in intron 4 of HFE may cause overestimation of C282Y homozygote prevalence in haemochromatosis. *Nature Genet.* 22, 325-326.
- 65 33. **Maggio A., Giambona A., Cai S. P., Wall J., Kan Y. W., and Chehab F. F. (1993).** Rapid and simultaneous typing of hemoglobin S, hemoglobin C, and seven Mediterranean (-thalassemia) mutations by covalent reverse dot-blot analysis: application to prenatal diagnosis in Sicily. *Blood* 81, 239-242.

34. **Saiki R. K., Walsh P. S., Levenson C. H., and Erlich H. A. (1989).** Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6230-6234.

35. **Stuyver L., Rossau R., Wyseur A., Duhamel M., Vanderborght B., Heuverswyn H. V., and Maertens G. (1993).** Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a fine probe assay. *J. Gen. Virol.*

36. **Lebron J. A., Bennett M. J., Vaughn D. E. et al** Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell.* 1998, 93:111-123.

41. **Rubini, M. Carturan S., Barp L., Bononi I., Baricordi O., Europ. J. Hum. Genet. (2000),** Vo1.8 (Suppl. 1), p.158.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Sonda para el diagnóstico de la hemocromatosis, **caracterizada** porque la sonda es capaz de hibridarse con los ácidos nucleicos de una muestra biológica en una región que corresponde a una región de la secuencia de cADN del gen HFE que contiene el nucleótido 502 para determinar si existe una mutación $G \rightarrow T$ en la posición 502 de la secuencia de cADN del gen HFE.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

