

## Acondroplasia: estudio molecular de 28 pacientes

Consuelo Climent<sup>a</sup>, Isabel Lorda-Sánchez<sup>b</sup>, Miguel Urioste<sup>b,c</sup>, José M. Gairi<sup>d</sup>, José I. Rodríguez<sup>e</sup> y Vicente Rubio<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Investigaciones Citológicas (FVIB y CSIC). Valencia.

<sup>b</sup>Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC). Universidad Complutense.

Madrid. <sup>c</sup>Hospital Universitario San Carlos. Madrid. <sup>d</sup>Institut Universitari Dexeus.

Barcelona. <sup>e</sup>Hospital La Paz. Madrid.

***acondroplasia: genes: genética: genética molecular: mutaciones genéticas***

**FUNDAMENTO:** Establecer el diagnóstico molecular de la acondroplasia en la población española investigando la mutación Gly380Arg en el receptor de tipo 3 para los factores de crecimiento fibroblástico (FGFR3) en enfermos acondroplásicos.

**PACIENTES Y MÉTODOS:** A partir de ADN genómico (obtenido de la sangre periférica) de 28 pacientes acondroplásicos, se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un segmento de 164 pares de bases (pb) que codifica para el dominio transmembrana del FGFR3. Se investigó la presencia del cambio de una guanina por adenina (transición G → A) y de la sustitución de dicha guanina por citosina (transversión G → C) en la primera base del codón 380 mediante digestiones con las enzimas de restricción *Sfcl* y *MspI* y análisis electroforético de los fragmentos.

**RESULTADOS:** Todos los pacientes con acondroplasia fueron heterocigotos para la mutación Gly380Arg, y se dio la transición G → A en la primera base del codón en 27 de ellos y la transversión G → C en el enfermo restante. Ninguno de estos cambios se dio en los controles, que incluían a un enfermo con hipocondroplasia.

**CONCLUSIONES:** La mutación Gly380Arg en sus dos variantes genéticas puede ser utilizada en la población española como base para el diagnóstico molecular de la acondroplasia. La guanina en posición 1 del codón 380 presenta la elevada mutabilidad observada en otras poblaciones, lo que no apoya que dicha mutabilidad venga condicionada por el sustrato genético de la población.

### Achondroplasia: molecular study of 28 patients

**BACKGROUND:** The main goal of the study is to investigate in the Spanish population the value of searching for the Gly380Arg mutation in the transmembrane domain of fibroblast growth factor receptor-3 (FGFR3) as the basis for the molecular diagnosis of achondroplasia.

**PATIENTS AND METHODS:** Twenty eight achondroplastic patients were studied. Genomic DNA obtained from blood was used to amplify using PCR a 164 bp segment of FGFR3 encompassing the transmembrane domain. The occurrence of the G → A transition and of the G → C transversion at the first base of codon 380 were investigated by digestion with the restriction enzymes *Sfcl* and *MspI* followed by electrophoretic analysis of the products.

**RESULTS:** All achondroplastic patients were found to be heterozygous for the Gly380Arg mutation, as a consequence of the G → A transition in 27 cases and of the G → C transversion in the remaining patient. None of these changes were found in control subjects including a hypochondroplastic patient.

**CONCLUSIONS:** The identification of the Gly380Arg mutation can be used in Spain for conclusive diagnosis of achondroplasia. The guanine at the first position of codon 380 of FGFR3 exhibits similarly increased frequency of mutation than in other populations, an thus it is unlikely that the genetic background of the population determines the mutation potential of this guanine.

*Med Clin (Barc)* 1998; 110: 492-494

Correspondencia: Dr. V. Rubio.

Instituto de Investigaciones Citológicas (FVIB y CSIC). Amadeo de Saboya, 4. 46010 Valencia. E-mail: rubio@ochoa.fib.es

Manuscrito aceptado el 28-11-1996

La acondroplasia, la forma más común de enanismo de miembros cortos, se da en España con una prevalencia estimada de 2,53 por 100.000 nacimientos<sup>1</sup>. Esta condrodisplasia se hereda con carácter autosómico dominante, aunque en aproximadamente el 80% de los enfermos la presentación es esporádica y, por lo tanto, la alteración genética causal aparece en ellos «de novo»<sup>2</sup>. Recientemente, se ha localizado el gen para la acondroplasia en el brazo corto del cromosoma 4<sup>2</sup>, y se ha establecido que es el mismo que el gen que codifica para el receptor de tipo 3 para los factores de crecimiento fibroblástico (FGFR3)<sup>3,4</sup>.

El FGFR3 pertenece a una familia de cuatro receptores de membrana (denominados FGFR1-4), y todos se unen a la familia de polipéptidos mitogénicos conocidos como factores de crecimiento fibroblástico (FGF)<sup>5</sup>. Como los otros 3 miembros de la familia, el FGFR3 está constituido por un solo polipéptido que consta de un dominio extracelular de tipo inmunoglobulina, una alfa-hélice hidrofóbica que atraviesa la membrana (dominio transmembrana), y un dominio intracelular con actividad proteincinasa sobre residuos de tirosina (dominio tirosincinasa)<sup>5</sup>. Es en el dominio transmembrana del FGFR3 donde Shiang et al<sup>3</sup> y Rousseau et al<sup>4</sup> identificaron una única mutación en 39 pacientes acondroplásicos, consistente en el cambio por arginina de la glicina 380 (Gly380Arg). En las series de enfermos estudiados subsiguientemente<sup>6,9</sup>, todas ellas de fuera de España, esta sustitución se ha encontrado en la gran mayoría de los casos, siendo debida al cambio de una guanina por adenina (transición G → A) en la primera base del codón 380 o, mucho más raramente (aproximadamente en el 2% de los casos), a la sustitución de dicha guanina por citosina (transversión G → C)<sup>3,4,6,9</sup>. Dada la alta proporción de casos esporádicos de acondroplasia, esta guanina presenta la tasa de mutación más alta descrita hasta ahora para una sola base en todo el genoma humano (100-1.000 veces mayor que para un «punto caliente» mutacional típico)<sup>10</sup>.

La alta frecuencia de la mutación Gly380Arg hace de su identificación un instrumento de gran valor potencial en el diagnóstico de la acondroplasia. Para validar el uso de esta aproximación diagnóstica en la población española, hemos investigado la presencia de la transición G → A y de la transversión G → C en la primera base del codón 380 del FGFR3 en 28 pacientes acondroplásicos de nuestro país. Tal validación es importante, ya que se han identificado pacientes con acondroplasia que no portan la mutación Gly380Arg<sup>6-8,11</sup> y no puede descartarse «a priori» que la frecuencia de mutación de la guanina en posición 1 del codón 380 del FGFR3 dependa del sustrato genético y difiera para distintas poblaciones, como puede sugerir la existencia de diferencias geográficas en la prevalencia de la acondroplasia<sup>1,12,13</sup>. Nuestro estudio es el primero que investiga en España la presencia de mutaciones en el codón 380 del FGFR3 asociadas a la acondroplasia.

### Pacientes y métodos

Se han estudiado 28 pacientes acondroplásicos esporádicos no relacionados, de distintas procedencias geográficas, dentro del Estado español. Quince de los enfermos procedían del Institut Universitari Dexeus (Barcelona) y otros trece de la Asociación para Problemas del Crecimiento (APAC), a través del Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC, Madrid). Los controles fueron dos de los autores (CC y VR) y otros miembros sanos del Instituto de Investigaciones Citológicas, así como un enfermo con hipocondroplasia.

Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar, a partir del ADN genómico, un fragmento de 164 pares de bases (pb) que contiene la secuencia que corresponde al dominio transmembrana del FGFR3. El ADN genómico se aisló a partir de la sangre venosa utilizando un kit comercial (G-NOME Kit, BIO 101, Inc.). La amplificación se realizó en 50 µl de una solución que contenía 10 mM de Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, un 0,1% (p/v) de Tritón X-100, 200 µM, de dATP, dGTP, dCTP y dTTP, 25 pmol de cada cebador, 2,5 U de ADN polimerasa de *Thermus brockianus* (Dynazyme, Finnzymes OY, Finlandia) y unos 200 ng de ADN genómico. Los cebadores utilizados son los descritos por Shiang et al<sup>3</sup> y el termociclador empleado es el GeneAmp 9600 (Perkin Elmer Hispania, S.A., Madrid). Tras incubar la solución 3 min a 95 °C, se realizaron 35 ciclos de amplificación, consistiendo cada ciclo en 30 s a 94 °C, 60 s a 65 °C y 60 s a 72 °C. Al final de los 35 ciclos se incubó la solución 5 min a 72 °C, y luego se mantuvo a 4 °C hasta su uso.

TABLA 1

### Mutaciones en el FGFR3 encontradas en los enfermos acondroplásicos

| País       | Gly380Arg  |           | Otras mutaciones (n) | Referencia bibliográfica |
|------------|------------|-----------|----------------------|--------------------------|
|            | G → A (n)  | G → C (n) |                      |                          |
| EE.UU.     | 15         | 1         | 0                    | 3                        |
| Francia    | 22         | 1         | 0                    | 4                        |
| EE.UU.     | 150        | 3         | 1 (no conocida)      | 6                        |
| EE.UU.     | 21         | 0         | 2 (no conocidas)     | 7                        |
| Japón      | 6          | 0         | 1 (Gly375Cys)*       | 8                        |
| Francia    | 48         | 2         | 0                    | 9                        |
| Total (%)  | 262 (96,0) | 7 (2,5)   | 4 (1,5)              |                          |
| España (%) | 27 (96,4)  | 1 (3,6)   | 0                    | Este estudio             |

\*Transversión G → T en la primera base del codón 375. La misma mutación ha sido identificada en un paciente de origen croata<sup>11</sup>. n: número de casos; FGFR3: receptor de tipo 3 para los factores de crecimiento fibroblástico; G: guanina; A: adenina; C: citosina.

Para investigar la presencia de la transición G → A en el primer nucleótido del codón 380, se digirió el ADN amplificado con la enzima de restricción *Sfcl* (New England Biolabs, Landerdiagnóstico, S.A., Madrid), que sólo corta el ADN si está presente la mutación, dando dos fragmentos complementarios de 109 y 55 pb. Cuando el ADN no fue susceptible al corte por esta enzima, se utilizó la enzima *MspI* (Amersham Ibérica, S.A., Madrid), que sólo corta el ADN si está presente la transversión G → C en el primer nucleótido del codón 380, dando fragmentos de 107 y 57 pb<sup>3</sup>. Las digestiones se llevaron a cabo durante 12 h a 37 °C, utilizando 5-10 µl de la solución de amplificación que contenía el ADN amplificado y 30 U de la enzima deseada en 30 µl del medio de reacción recomendado por el fabricante de la enzima.

Los productos de las digestiones se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 11% no desnaturalizantes, seguidos por tinción con plata<sup>14</sup>.

### Resultados

La amplificación mediante PCR del ADN de todos los pacientes generó en todos los casos un fragmento del tamaño esperado, estimado electroforéticamente. No se detectó producto alguno en los controles negativos en los que no se incluyó ADN genómico. El análisis electroforético demostró en 27 de los 28 pacientes que la enzima *Sfcl* digería parte del ADN amplificado, generando dos fragmentos de los tamaños esperados para la transición G → A en la primera base del codón 380 (fig. 1). La digestión parcial del ADN indica que sólo una de las dos copias del gen porta la mutación, como corresponde al estado de heterocigosis para la mu-

tación. El ADN amplificado a partir de uno de los pacientes acondroplásicos no fue cortado en absoluto por *Sfcl* y, por lo tanto, no portaba la transición G → A. Como era de esperar, tampoco se observó digestión del ADN amplificado a partir de un sujeto normal o de un enfermo diagnosticado de hipocondroplasia (fig. 1). El ADN del paciente que no fue susceptible a la digestión con la enzima *Sfcl* experimentó digestión parcial por la enzima *MspI*, dando dos fragmentos del tamaño esperado para la transversión G → C en la primera base del codón 380, lo que indica que este enfermo es heterocigoto para dicha mutación. Como para *Sfcl*, no se observó digestión por *MspI* del ADN amplificado a partir de los controles sanos o del enfermo diagnosticado de hipocondroplasia (fig. 1).

Por tanto, 27 de los 28 enfermos son heterocigotos para la transición G → A y el enfermo restante lo es para la transversión G → C en la primera base del codón 380 del FGFR3. La tabla 1 demuestra que en los estudios realizados en otros países las mutaciones que no afectan a la primera G del codón 380 sólo representan el 1,5% del total y, de acuerdo con esta baja frecuencia, ninguno de los enfermos de nuestra muestra presenta tales mutaciones. También hay buen acuerdo cuantitativo entre nuestra serie y los estudios en otras poblaciones en

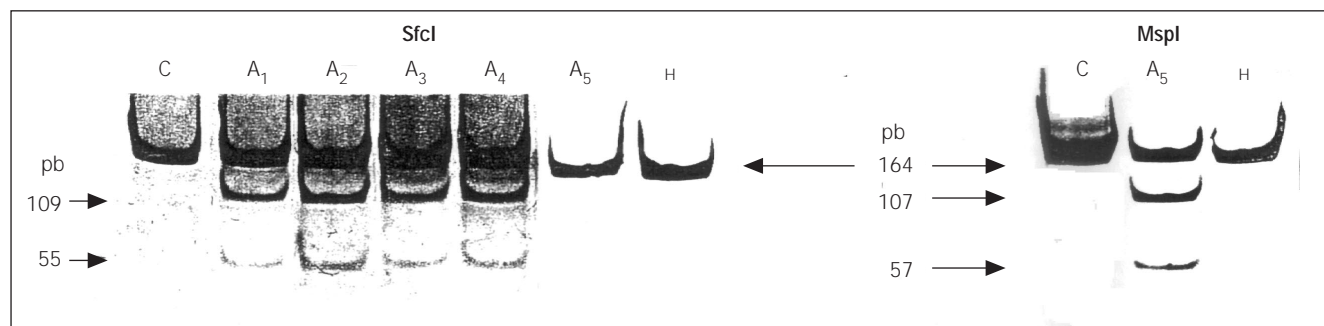


Fig. 1. Análisis de restricción del ADN de varios pacientes acondroplásicos. Se presentan los resultados del análisis electroforético en gel de poliacrilamida al 11% en tampón TBE y tinción con plata. *Sfcl* y *MspI* indican la digestión con una u otra enzima, respectivamente. C: ADN de un control sano; A<sub>1</sub> = A<sub>5</sub>: ADN de 5 enfermos acondroplásicos; H: ADN de un enfermo de hipocondroplasia.

cuanto a las frecuencias relativas de la transición G → A y de la transversión G → C. Esta similitud de resultados permite extender a la población española las observaciones realizadas en otros países, y no está de acuerdo con que diferencias en el sustrato genético de la población tengan un impacto importante sobre la tasa de mutación de la primera base del codón 380 del FGFR3.

**Discusión**

La acondroplasia es una forma de condrodisplasia con acortamiento rizomélico de los miembros, macrocefalia y facies característica con protuberancia frontal, hipoplasia maxilar y depresión del puente nasal, además de hiperlordosis lumbar, limitación de la extensión de los codos y manos, cuya apariencia recuerda a un tridente. En ausencia de hidrocefalia, la inteligencia es normal. El diagnóstico es clínico y radiológico. El carácter homocigoto da lugar a una enfermedad más grave, llegando a la muerte en el período neonatal por fallo respiratorio<sup>2</sup>. La homogeneidad clínica concuerda con la homogeneidad genética de la acondroplasia, establecida previamente para otras poblaciones<sup>3,4,6-9</sup>, y ahora confirmada por nosotros para la población española, al encontrar la mutación Gly380Arg en todos los enfermos que hemos estudiado. Tal hallazgo fundamenta la investigación de esta mutación como base del diagnóstico molecular de la acondroplasia en España. La relativa sencillez del ensayo, que sólo requiere una pequeña cantidad de sangre total, lo pone al alcance de prácticamente cualquier laboratorio. La mutación Gly 380Arg puede considerarse patognomónica para la acondroplasia, aunque su ausencia no permite excluir completamente esta enfermedad, ya que alrededor del 2% de los casos publicados no la presentaban (tabla 1). En cualquier caso, la búsqueda de la mutación Gly380Arg en sus dos variantes tiene particular interés en enfermos muy jóvenes, en presentaciones atípicas o en el diagnóstico diferencial con otras displasias óseas tales como la hipocondroplasia, así como para el diagnóstico prenatal de acondroplasia heterocigota u homocigota.

El carácter dominante de la mutación Gly380Arg indica que el característico cuadro clínico de la acondroplasia se debe a exceso de función del FGFR3: la mutación activaría el receptor (activación constitutiva) en ausencia de ligando (el FGF) y la función del receptor activado sería, por tanto, inhibir el crecimiento óseo. Las evidencias experimentales han confirmado este punto de vista. La elimi-

nación del FGFR3 en el ratón origina un exceso de crecimiento esquelético<sup>15</sup>, y se ha demostrado que este receptor es un regulador negativo del crecimiento óseo endocondrial<sup>16</sup> y que la mutación responsable de la acondroplasia induce la activación constitutiva del receptor<sup>17,18</sup>. En la hipocondroplasia y en la distrofia tanatofórica, que son displasias óseas de menor y mayor gravedad, respectivamente, que la acondroplasia, y que también se transmiten con carácter dominante, se han identificado mutaciones causales en el FGFR3<sup>19,20</sup> y se ha asociado la mayor gravedad de la displasia tanatofórica con una activación constitutiva mayor del receptor mutado que en la acondroplasia<sup>18</sup>. La unión del ligando al FGFR3 induce la formación de dímeros del mismo, la autofosforilación del dominio tirosinasa del receptor y la activación de esta actividad cinasa, con fosforilación subsiguiente de proteínas diana intracelulares<sup>5</sup>. Las mutaciones en el receptor podrían causar la activación constitutiva, bien por inducir la actividad tirosinasa sin necesidad de dimerización, bien por favorecer la formación de dímeros en ausencia de ligando. Este último mecanismo parece ser el responsable de la activación constitutiva del FGFR3 en la acondroplasia<sup>18</sup>. La mutación Gly380Arg reemplaza un residuo pequeño y no cargado por otro grande y cargado, y esto debe desestabilizar el segmento alfa-helicoidal e hidrofóbico que atraviesa la membrana, posiblemente haciendo más favorable la interacción con las regiones transmembrana de otras moléculas del receptor. El estudio genético de la acondroplasia y de otras condrodisplasias ha hecho avanzar nuestros conocimientos tanto básicos como clínicos, y ha puesto de manifiesto la importancia de los receptores de la familia FGFR en enfermedades humanas. Nuestro estudio contribuye a la aplicación diagnóstica de estos conocimientos a la población española. Cabe esperar que en un futuro no lejano estos nuevos conocimientos se traduzcan en aproximaciones terapéuticas, tales como el desarrollo de los inhibidores del FGFR3 o de procedimientos de terapia génica para estos defectos.

**Agradecimiento**

Este trabajo ha sido financiado por el FISS y por la Fundación 1000. Agradecemos la colaboración de la Asociación para Problemas del Crecimiento (APAC) y de los pacientes del Institut Dexeus.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Martínez-Frías ML, Cereijo A, Bermejo E, López M, Sánchez M, Gomalo C. Epidemiological aspects of mendelian syndromes in a Spanish po-

pulation sample. I: autosomal dominant malformation syndromes. *Am J Med Genet* 1991; 38: 622-625.

2. Entrada 100800. En: McKusick VA, editor. *Online Mendelian inheritance in man*. Johns Hopkins University, 1996.

3. Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Church DM, Fielder TJ, Bocian M et al. Mutations in the transmembrane domain in FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell* 1994; 78: 335-342.

4. Rousseau F, Bonaventure J, Legeat-Mallet L, Pellet A, Rozet JM, Maroteaux P et al. Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature (Lond)* 1994; 371: 252-254.

5. Muenke M, Schell U. Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders. *Trends Genet* 1995; 11: 308-313.

6. Bellus GA, Hefferon TW, Ortiz de Luna RI, Hecht JT, Horton WA, Machado M et al. Achondroplasia is defined by recurrent G380R mutations of FGFR3. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 368-373.

7. Stoilov I, Kilpatrick MW, Tsiouras P. A common FGFR3 gene mutation is present in achondroplasia but not in hypochondroplasia. *Am J Med Genet* 1995; 55: 127-133.

8. Ikegawa S, Fukushima Y, Isomura M, Takada F, Nakamura Y. Mutations of the fibroblast growth factor receptor-3 gene in one familial and six sporadic cases of achondroplasia in Japanese patients. *Hum Genet* 1995; 96: 309-311.

9. Bonaventure J, Rousseau F, Legeat-Mallet M, Munnich A, Maroteaux P. Common mutations in the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) gene account for achondroplasia, hypochondroplasia and thanatophoric dwarfism. *Am J Med Genet* 1996; 63: 148-154.

10. Francomano CA. The genetic basis of dwarfism. *N Engl J Med* 1995; 332: 58-59.

11. Superfi-Furqa A, Eich G, Bucher HU, Wisser J, Giedion A, Gitzelmann R. A glycine 375-to cysteine substitution in the transmembrane domain of the fibroblast growth factor receptor-3 in a newborn with achondroplasia. *Eur J Pediatr* 1995; 154: 215-219.

12. Orioli IM, Castilla EE, Barbosa-Neto JG. The birth prevalence rates for skeletal dysplasias. *J Med Genet* 1986; 23: 328-332.

13. Andersen PE, Hange M. Congenital generalised bone dysplasias: a clinical, radiological, and epidemiological survey. *J Med Genet* 1989; 26: 37-44.

14. García-Pérez MA, Sanjurjo P, Rubio V. Demonstration of the spf-ash mutation in Spanish patients with ornithine transcarbamylase deficiency of moderate severity. *Hum Genet* 1995; 95: 183-186.

15. Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, Ornitz DM. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nature Genet* 1996; 12: 390-397.

16. Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 1996; 84: 911-921.

17. Webster MK, Donoghue DJ. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *EMBO J* 1996; 15: 520-527.

18. Naski MC, Wang Q, Xu J, Ornitz DM. Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nature Genet* 1996; 13: 233-237.

19. Bellus GA, McIntosh I, Smith EA, Aylsworth AS, Kaitila I, Horton WA et al. A recurrent mutation in the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor 3 causes hypochondroplasia. *Nature Genet* 1995; 10: 357-359.

20. Tavormina PL, Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Wilkin DJ, Lachman RS et al. Thanatophoric dysplasia (types I and II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. *Nature Genet* 1995; 9: 321-328.