

# Patología médica ocasionada por repetidos de trinucleótidos

Diego Arenas-Aranda,\* Rosenda Peñaloza,\* Fabio Salamanca-Gómez\*\*

## Resumen

Se han descrito diez enfermedades genéticas en donde la alteración es la expansión de repeticiones de trinucleótidos. Existen cuatro tipos de secuencias trinucleotídicas involucradas en expansiones. El tipo, posición en un gen y número de copias en los individuos afectados, varía según la enfermedad. Algunas de estas repeticiones expandibles están relacionadas con sitios frágiles en los cromosomas y cuando se encuentran expandidas existen 2000 o más copias de la secuencia. Otro tipo de secuencias repetidas se localiza en regiones codificadoras de genes relacionados con problemas neurodegenerativos, como el mal de Huntington, atrofia muscular espinobulbar o ataxia espinocerebral tipo 1, en donde presentan expansiones cortas de 60 a 90 copias del trinucleótido en el gen. La expansión continua de repetidos en estos padecimientos puede explicar la anticipación genética que caracteriza a estas enfermedades y existe una correlación entre la gravedad de la enfermedad y el número de repetidos. Recientemente se ha demostrado este tipo de expansión en secuencias mayores del tipo minisatélites en un caso, está relacionada con la epilepsia tipo 1 y en la otra al sitio frágil 16B sensible a Distamycin.

Esta forma de herencia es importante por su relación con algunas de las enfermedades degenerativas más comunes en los humanos.

**Palabras clave:** Trinucleótidos repetidos, expansión de repetidos, anticipación, minisatélites, síndrome del X frágil, mal de Huntington, distrofia miotónica.

## Summary

Trinucleotide repeat expansion is responsible for ten human diseases described so far. Four types of repeats are involved in these expansions, with type number and position in the gene varying from one disease to another. In some fragile sites, the trinucleotide repeat is found to be enlarged to 200 or more. Smaller expansions have been found within coding regions of some genes that are associated with neurodegenerative diseases, such as Huntington's disease. The continuous expansion of the trinucleotide repeats in subsequent generations explains the genetic anticipation, peculiar to these disorders.

Recently, it was shown that two expanded minisatellite sequences are also involved in both progressive myoclonus epilepsy type 1 and distamycin A-sensitive fragile site, FRA16B. This form of peculiar heredity is very important because of its relationship with some of the common human degenerative diseases.

**Key words:** Trinucleotide repeats, expansion repeats, anticipation, minisatellites, fragile X syndrome, Huntington's disease, myotonic dystrophy.

\*Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

\*\* Académico titular.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Diego Arenas Aranda UIM Genética Humana, H. Peditría, CMN S. XXI, IMSS Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores CP 06725, D.F. E-mail: arenasdi@servidor.unam.mx

## Introducción

Se considera que el DNA es una molécula estable debido a su papel en la transmisión fiel de las características hereditarias de acuerdo a los principios mendelianos. La presencia de transposones, el rearreglo en los genes de las inmunoglobulinas, así como el descubrimiento de secuencias altamente polimórficas en los genomas de diversos organismos, incluido el humano, como los minisatélites y microsátélites, plantea que el DNA es una molécula dinámica. Sin embargo este dinamismo es limitado, pues la transmisión de estas secuencias polimórficas a través de las generaciones es predecible.<sup>1</sup> Recientemente se ha descrito un nuevo tipo de mutaciones dinámicas por expansión de trinucleótido del DNA. Estas también son altamente polimórficas y aumentan su número de una generación a otra. Esta expansión continúa a través de las generaciones, lo que la caracteriza como una mutación dinámica, con un patrón de herencia mendeliano clásico. La inestabilidad de estas secuencias también se da a nivel de la mitosis. De 1991 a la fecha se han identificado diez enfermedades genéticas, en donde las mutaciones corresponden a secuencias polimórficas de repetidos de trinucleótidos.<sup>2,3</sup>

En el genoma humano se han caracterizado cuatro grupos de repetidos de trinucleótido relacionados con la expansión del DNA. Secuencias CGG/GCC, CAG/GTC, CTG/GAC y recientemente GAA/CTT. La secuencia CGG/GCC por lo regular se localizan en las regiones no codificadoras de distintos genes y cuando se expanden, se asocian con sitios frágiles en los cromosomas. Los repetidos CAG/GTC forman parte de la región codificadora y están relacionados con diferentes padecimientos neurodegenerativos. La repetición de CTG/GAC se encuentra en la región 3', no codificadora del gen relacionado con la distrofia miotónica. Por último los tripletes GAA/CTT se encuentran en un intrón de un gen implicado en una ataxia.<sup>2,4</sup>

El número de repetidos en personas no afectadas es variable, sin embargo, para CGG y CTG no es mayor de aproximadamente 30, mientras que para CAG y GAT es de 20. Cuando hay una expansión masiva de estos tripletes, los primeros alcanzan varios miles y los segundos incrementan el número normal en sólo dos o tres veces.<sup>2</sup>

En fecha reciente se informó un nuevo tipo de secuencias inestables diferentes a los repetidos de trinucleótidos. Están relacionadas con un tipo de epilepsia y con un sitio frágil. Estas secuencias del tipo minisatélites se localizan en la región no codificadora del gen cistein B (CSTB) y en el sitio frágil sensible a Distamicina A, FRA16B. Su número es variable, existiendo de dos a tres copias de una secuencia de 12 repetidos rica en GC en el gen cistein B de personas no afectadas por la epilepsia y 60 o más en los afectados. Por lo que respecta al sitio frágil, el minisatélite está formado por una secuencia rica en AT de 33 repetidos. En los individuos que no se induce el sitio frágil, se observan de 7 a 12 copias y más de 2,000 en los que lo presentan.<sup>5-9</sup>

## Sitios frágiles en los cromosomas y trinucleótidos CGG/GCC

Se han caracterizado al menos siete sitios frágiles en los cromosomas humanos, los cuales son visibles citogenéticamente como un adelgazamiento en regiones específicas de los cromosomas en metafase.<sup>10</sup>

### Síndrome del cromosoma X frágil

El síndrome se caracteriza por un sitio frágil sensible a folato ubicado en la banda Xq27.3 del cromosoma X, denominado FRAXA, que está asociado al retraso mental hereditario más frecuente en los seres humanos.<sup>11-13</sup> Alteraciones craneofaciales y macroorquidismo son otras de las características asociadas al síndrome.<sup>14</sup> Esta enfermedad presenta un patrón de herencia dominante ligado al X, con penetrancia incompleta en las mujeres y tiene una incidencia de 1 por cada 1,250 hombres nacidos vivos y 1 en cada 2,500-3,000 mujeres.<sup>14</sup>

Mediante la técnica de clonaje posicional, se aisló el gen FMR1 en 1991, responsable del síndrome del cromosoma X frágil.<sup>15-17</sup> El gen tiene en su extremo 5', una región polimórfica de repetidos críticos CGG interrumpidos por tripletes AGG principalmente en las posiciones 10 y 20.<sup>18,19</sup> El número de repetidos es de 6-52 en personas no afectadas y de más de 200 en los enfermos, en donde se

denomina mutación completa. Hay un tercer grupo de individuos que presentan lo que se denomina premutación, en donde el número de los trinucleótidos está entre los valores normales y los de mutación completa. Alteraciones fenotípicas relacionadas con el síndrome no existen en estos últimos sujetos y se les consideran portadores, ya que tienen una probabilidad alta de tener individuos afectados en la siguiente generación.<sup>17</sup> La expansión de los repetidos en los descendientes de estos individuos solamente se ha descrito por vía materna.<sup>17</sup> El tamaño de repetidos en los afectados depende del número de éstos que tenga la madre, por ejemplo, si la madre tiene 90 o más repetidos todos sus hijos de sexo masculino tendrán más de 200 y manifestarán el retraso mental asociado con la enfermedad.<sup>20</sup> Se ha descrito en algunos pocos casos, regresión de repetidos sólo por vía paterna.<sup>21</sup> El mosaico germinal es común en los individuos con mutación completa, de tal manera que presentan células tanto con premutación como con mutación completa. Esto sugiere que la expansión de repetidos es un evento postzigótico.<sup>17,22</sup>

Se ha observado metilación en el promotor del gen FMRI y en los repetidos cuando el número de éstos es mayor de 200, lo que provoca la inhibición de la transcripción. Se cree que la ausencia del mRNA es la causa de la enfermedad.<sup>23</sup> La ausencia de expresión del gen FMRI en enfermos del síndrome, que tiene *deleciones*<sup>24</sup> o mutaciones puntuales en este gen<sup>25</sup> y no tienen expansión de los tripletes CGG, confirma que el gen FMRI es el responsable de esta enfermedad. También se apoya en el hecho de que ratones transgénicos afectados en el gen FMRI, generados mediante técnicas de recombinación homóloga,<sup>26</sup> presentaron características compatibles con el síndrome como el macroorquidismo, alteraciones cognitivas e hiperactividad.<sup>27</sup>

Debido a que no se han descrito mutaciones de novo en el gen FMRI<sup>28</sup> y a que hay marcadores genéticos que presentan un desequilibrio de ligamiento con el gen, se ha sugerido que hay un cromosoma o un pequeño grupo de cromosomas fundadores.<sup>29</sup> Gracias al análisis de las secuencias de los repetidos del gen FMR en diferentes poblaciones humanas, se cree que la secuencia ancestral relacionada con el síndrome fue una secuencia pura de CGG, carente de las interrupciones AGG.<sup>19,20,30</sup> Esto plantea una posible explicación para la expansión

de los repetidos, en la que la DNA polimerasa, copia equivocadamente varias veces la misma secuencia de repetidos, durante la replicación de la hebra rezagada del DNA.<sup>19</sup>

El gen FMRI se localiza en una región de aproximadamente 38 Kb del cromosoma Xq 27.3 y está formado de 17 exones.<sup>31</sup> Su expresión se ha descrito en distintos tejidos, siendo la máxima en el cerebro, testículos y ovarios.<sup>32,33,34</sup> Existe empalme ("*splicing*") alternativo del extremo 3', del gen, que genera diferentes proteínas con pesos comprendidos entre 39-90 Kd.<sup>35,36</sup> Esta familia de proteínas denominadas FMRP, de las que se desconoce su función, se localiza principalmente en el citoplasma, aunque también se han detectado señales en núcleo.<sup>37</sup> Existen dos regiones conservadas en las FMRPs de unión a RNA.<sup>38,39</sup> Se estima que aproximadamente 4% de mRNA de cerebro fetal de rata interactúa con las FMRPs.<sup>38,40</sup> Recientemente se demostró que una isoforma de las FMRPs presenta dos señales de exportación: una citoplasmática y otra nuclear, y que se asocia a la subunidad ligera del ribosoma, posiblemente al inicio de la traducción!

## X Frágil E (FRAXE)

El descubrimiento de un sitio frágil diferente a FRAXA en el cromosoma X, se obtuvo a partir de individuos que citogenéticamente fueron positivos para el sitio frágil, pero no presentaban expansión de repetidos en el gen FMRI.<sup>42</sup> Este nuevo sitio sensible a folatos denominado FRAXE, se localiza a 600 Kb de FRAXA, hacia el telómero<sup>43</sup> y presenta repetidos de GCC. Los límites normales van de 7-35, en individuos que presentan el sitio frágil son de 230-750 y en mujeres portadoras que no manifiestan el sitio frágil son de 130-150.<sup>44</sup>

Más de 150 repetidos correlacionan con una metilación anormal en una secuencia probablemente reguladora, localizada aproximadamente a 1 Kb de la región de los repetidos.<sup>44</sup> La expansión de los repetidos en esta región, al igual que en el gen FMRI, se da por vía materna, aunque hay unos pocos casos en los cuales ésta se da por vía paterna.<sup>45</sup> Se ha informado que algunos individuos con expansión en esta región presentan un coeficiente intelectual subnormal, con valores de IQ de 60-80.<sup>45,46</sup>

El gen relacionado con esta alteración no se ha aislado aunque se cree que está en una región de aproximadamente 200 Kb de FRAXE.<sup>47</sup>

#### X Frágil F (FRAXF)

Es el tercer sitio frágil sensible al folato en la región del cromosoma Xq27-28. Se encuentra aproximadamente 600 Kb de FRAXE y presenta repetidos CGG.<sup>48,49</sup> Los individuos con el sitio frágil tienen de 300-1000 repetidos GCC metilados. Los rangos de los repetidos en los individuos sin el sitio frágil van de 6-29 y no están metilados.<sup>49</sup> Hasta el momento no se han detectado alteraciones fenotípicas en los individuos con la expansión, probablemente porque no existen genes en esa región genómica.<sup>50</sup>

#### Sitio Frágil 16A (FRA 16A)

Se localizó un sitio frágil sensible al folato en la región cromosómica 16q13.1, con repetidos CGG.<sup>51</sup> Los rangos de estos tripletes en individuos que expresan el sitio frágil van de 1000-1900 y en los que no lo tienen van de 16-49.<sup>51</sup> Como se da en el caso del gen FMR1 asociado al síndrome del cromosoma X frágil, los repetidos también se encuentran metilados, cuando son más de 1000 y la expansión se da preferentemente por vía materna.<sup>52</sup> No se han descrito alteraciones fenotípicas asociadas a la expansión de estos repetidos, aunque esto puede deberse a la falta de individuos homocigotos.

#### Sitio Frágil 11B (FRA11B)

En la región cromosómica 11q23.3 se encontró otra región frágil sensible al folato, que está ligada a la enfermedad denominada síndrome de Jacobsen.<sup>53,54</sup> Este síndrome de delección cromosómica en 11q se caracteriza por un grave retraso mental en los individuos afectados.<sup>55</sup>

Los puntos de rompimiento para la delección relacionada con el síndrome de Jacobsen y el sitio frágil colocalizan en la banda 11p23.3, donde se

encuentra el proto-oncogene CBL-2.<sup>56</sup> Este gen presenta repetidos CGG en su extremo 5', y en los individuos que expresan el sitio frágil hay más de 100 repetidos metilados.<sup>54</sup>

En aproximadamente un tercio de las familias con el síndrome de Jacobsen con la delección 11q, se encontró expansión de los repetidos CGG del proto-oncogen. Esto sugiere que la expansión podría inducir la delección que ocasiona el síndrome.<sup>54</sup> Por otro lado, no está claro si la metilación de los repetidos afecta la expresión de CBL-2, como sucede en el caso del gen FMR1. De ser así, no sería posible que CBL-2 ocasionara un tipo de cáncer, ya que un oncogen se comporta como dominante.

#### Sitios frágiles en los cromosomas y minisatélites

Se ha demostrado que en al menos cinco sitios frágiles sensibles al folato en los cromosomas humanos, la presencia de repetidos de trinucleótidos del tipo CGG está relacionada con la inducción del sitio frágil. Recientemente se demostró que en un sitio frágil sensible a Distamicina A, la secuencia involucrada es un repetido de 33 nucleótidos. Por lo tanto, el fenómeno de expansión también puede ser ocasionado por minisatélites.

#### Sitio Frágil 168 (FRA168)

Este sitio insensible a folato se localiza en la región cromosómica 16q22.1. Se induce por los fármacos antivirales y antitumorales Distamicina A y Netropsina, que interactúan con regiones ricas en AT o por bromodeoxiuridina, el cual sustituye a la timina en el DNA.<sup>57</sup> Esta región se aisló recientemente mediante clonaje posicional y está formada por un repetido rico en AT de 33 nucleótidos, aunque también se han encontrado repetidos con tamaños de 26 a 37 nucleótidos. En los individuos que no manifiestan el sitio frágil, el repetido de 33 nucleótidos varía de 7-12 copias. En los individuos que manifiestan el sitio frágil, el número de copias del repetido de 33 nucleótidos es de más de 2,000.<sup>5</sup> No se han descrito alteraciones fenotípicas asociadas a la expansión de este minisatélite.

## Enfermedades neurodegenerativas y repetidos CAG/CTG

Se han descrito hasta el momento cinco padecimientos neurodegenerativos relacionados con la expansión de repetidos CAG. Todos ellos tienen en común que la expansión no es tan grande como en el caso de los sitios frágiles, y que los repetidos se encuentran en la región codificadora de los genes. Esto ocasiona que en estas alteraciones exista una ganancia de función y no una pérdida, como sucede en el síndrome del cromosoma X frágil.

### Atrofia muscular espinobulbar o enfermedad de Kennedy

Es una neuropatía motora de adultos que presenta un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X.<sup>58,59</sup> La alteración se manifiesta entre la tercera a quinta década de la vida y se caracteriza a nivel clínico por temblores de los músculos terminales, disfagia, reducción de fertilidad, atrofia testicular y ginecomastia en hombres y degeneración de neuronas motoras.<sup>60</sup>

En 1991 se descubrió el gen del receptor de andrógeno (AR) en Xq12, relacionado con la enfermedad.<sup>61</sup> En su primer exón existe una región variable de repetidos CAG, que codifica para glutaminas. Los límites normales de repetidos van de 11-30 y de 38-66 en la expansión. La inestabilidad en un 75% de los casos es por expansión y el resto por contracción en el número de repetidos.<sup>62</sup> En esta enfermedad se presenta el fenómeno de anticipación, ya que existe una alta correlación entre el número de repetidos y la edad de aparición de la enfermedad.<sup>63</sup> Se cree que el exceso de glutaminas en el producto del gen AR, que es un factor de transcripción, modifique la expresión de distintos genes, lo que ocasionaría la degeneración neuronal.<sup>64</sup>

### Ataxia espinocerebral tipo 1

Esta enfermedad neurodegenerativa, con un patrón de herencia autosómico dominante se caracteriza por ataxia, disfagia, neuropatía periférica y degeneración muscular. La enfermedad tiene

una manifestación variable que oscila de los 4-70 años. En familias con la alteración, la manifestación temprana de la enfermedad ocurre en las generaciones finales, lo cual confirma un fenómeno de anticipación.<sup>65</sup>

En 1994 se aisló el gen SCA1 relacionado con la enfermedad, localizado en el cromosoma 6.<sup>66</sup> Las personas que no tienen la enfermedad presentan en la región codificadora del gen de 6-39 repetidos de CAG, los afectados tienen de 41-81 tripletes.<sup>67</sup> El fenómeno de anticipación se ha comprobado a nivel molecular, pues existe una relación inversa entre la edad de manifestación de la enfermedad y el número de repetidos y una correlación entre la gravedad de la enfermedad y el número de repetidos. La expansión solamente se ha descrito por vía paterna.<sup>68</sup> Es interesante notar que la secuencia de repetidos CAG en los individuos no afectados por esta ataxia es críptica (con tripletes diferentes) en 98% de los casos estudiados, puesto que hay dos interrupciones en las posiciones 13 y 15 con el triplete CAT y no es críptica (con tripletes iguales) en 100% de los alelos con expansión.<sup>70</sup> La falta de las interrupciones en los alelos con la expansión podrían favorecerla de una forma similar a la del gen FMR1.

El gen SCA1 está formado de nueve exones distribuidos sobre 450 kb del cromosoma 6.<sup>67</sup> Produce un mRNA de distribución ubicua formado de 10,660 nucleótidos. Sorprendentemente el marco de lectura del transcrito es de solamente 2448 nucleótidos y codifica para una proteína de función desconocida denominada ataxina 1, con un peso molecular de 87 KD.<sup>67,69</sup> Mediante inmunohistoquímica se ha localizado esta proteína en el núcleo de neuronas, en el citoplasma de células de músculo estriado y en núcleo y citoplasma de células de Purkinje. También se demostró la presencia de ataxina normal y mutante en células de enfermos de esta ataxia.<sup>71</sup>

### Enfermedad de Huntington

Esta alteración autosómica dominante tiene incidencia de uno por cada 10,000 individuos en la población caucásica y se caracteriza por trastornos en el movimiento. Las características clínicas asociadas a la enfermedad son un declinamiento

cognoscitivoprogresivoycorea,quegeneralmente se manifiestan en la edad adulta, aunque también se han descrito casos juveniles.<sup>72,73</sup> En 1993 se aisló el gen IT15, relacionado con la enfermedad.<sup>74</sup> Se localiza en el cromosoma 4p16.3 y tiene una región polimórfica de repetidos CAG en el exón 1, con valores de 10 a 35 en personas no afectadas y de 36-121 en las que tienen la enfermedad.<sup>75-76</sup> La amplificación de repetidos es por vía paterna preferencialmente en las familias afectadas que se han estudiado existe el fenómeno de anticipación.<sup>73,76,79</sup>

El gen IT15 está formado de 8 exones distribuidos en una región genómica de 180-200 Kb del cromosoma 4p16.3.<sup>80</sup> Su transcrito se ha encontrado en el cerebro y otros tejidos<sup>74,81</sup> y produce una proteína de 340 KD de función desconocida denominada huntintina, que se encuentra principalmente en el citoplasma.<sup>82,83</sup> Los individuos afectados por esta enfermedad expresan el transcrito y la proteína normal y mutada.<sup>84,85</sup> Se demostró en fecha reciente que la huntintina es sustrato de la apoptosis, una cistein-proteasa involucrada en la muerte celular programada o apoptosis. Esta proteasa utiliza como sustrato a la glutamina de la huntintina. En estudios *in vitro* se demostró que a mayor cantidad de este aminoácido en la huntintina hay más digestión por la apoptosis.<sup>86</sup> Este dato es importante porque podría explicar la conexión entre el número de repetidos en exceso en los individuos con expansión y la degeneración neuronal, lo que sería resultado de un problema con la apoptosis.

#### Atrofia dentarubral-palidolusiana y síndrome del río Haw

Esta neuropatología autosómica dominante se caracteriza por ataxia cerebelar y demencia. Los enfermos de menos de 20 años presentan epilepsia mioclónica progresiva y retardo mental.<sup>87,88</sup> Es una alteración rara con una prevalencia de 1/1 millón en Japón.<sup>89</sup> Se aisló en 1994 un gen relacionado con la enfermedad denominada DRPLA, localizado en el cromosoma 12p y tiene repetidos de CAG en su región codificadora. Los límites norma-

les van de 7-25 y los de expansión de 49-75.<sup>87,90</sup> Esta se ha observado solamente por vía paterna y en las familias estudiadas con la alteración se ha descrito el fenómeno de anticipación.<sup>87</sup>

El gen DRPLA produce un mRNA ubicuo de 4.5Kb, presente principalmente en cerebro, ovarios, testículos y próstata.<sup>91</sup> La proteína producida por el transcrito es de 1184 aminoácidos. Los individuos afectados presentan una proteína normal y una mutada de mayor tamaño debido a un mayor número de glutaminas.<sup>92</sup>

El síndrome del río Haw es un padecimiento neurodegenerativo, autosómico dominante, parecido a la atrofia dentarubral, se ha informado en una sola familia afroamericana.<sup>93</sup> Este padecimiento se diferencia de la atrofia dentarubral por la ausencia de epilepsia mioclónica. Probablemente esta alteración - sin una variedad alélica de la atrofia dentarubral, pues los individuos afectados por el síndrome presentan expansión de CAG en el gen DRPLA.

Mediante un estudio de la frecuencia de repetidos CAG en el gen DRPLA en distintas poblaciones humanas se demostró que el alelo normal con 19 repetidos es más frecuente en la población japonesa (7.4%) que en la afroamericana (1%) y en la caucásica (0%). Esto podría explicar la mayor prevalencia de los alelos con expansión en esta población asiática.<sup>94</sup>

#### Enfermedad de Machado-Joseph o ataxia espinocerebral tipo 3

Esta enfermedad se hereda de manera autosómica dominante y se caracteriza por una degeneración espinocerebral.<sup>95,96</sup> El gen MDJ1 relacionado con la alteración, se localiza en el cromosoma 14q32.1 y presenta en su región codificadora una región polimórfica de repetidos CAG, cuyos límites en personas no afectadas va de 12-37 y en los que presentan la expansión de 61-84.<sup>95,97</sup> El fenómeno de expansión se ha observado tanto por vía materna como paterna, sin embargo, el número de repetidos es mayor por vía paterna.<sup>98</sup> La proteína producida por el gen MNJ1 tiene 359 aminoácidos y no se conoce su función.<sup>95</sup>

Hasta el momento sólo se ha descrito una alteración neuromuscular relacionada con la expansión de repetidos CTG, la distrofiamicotónica. El fenómeno de expansión en esta enfermedad tiene varias diferencias respecto a la de los sitios frágiles y a las enfermedades neurodegenerativas.

### Distrofia miotónica

Esta miopatía se hereda en forma autosómica dominante. Es la distrofia muscular más común en los adultos. Las características fenotípicas relacionadas con esta alteración son muy variables, pudiéndose presentar miotonía, debilidad muscular progresiva, alteraciones cardíacas, cataratas, atrofia testicular o calvicie frontal. En las formas congénitas se presenta retraso mental.<sup>99,100</sup> Se ha descrito el fenómeno de anticipación en las familias afectadas.<sup>101</sup>

El gen DM responsable de la enfermedad se localiza en el cromosoma 19q13.3, presenta una región polimórfica de repetidos CTG en su región 3', con valores de 5-37 en personas no afectadas y de 50 a más de 3000 en los afectados.<sup>99,102</sup> La expansión de repetidos se da por vía materna y pocos casos se han descrito por vía paterna.<sup>103,104</sup> Debido a que existe mosaico somático para los repetidos CTG en los individuos afectados, se cree que la expansión es un suceso postcigótico.<sup>105-107</sup>

El gen DM esta formado de 15 exones.<sup>108</sup> y su transcrito se ha localizado en músculo esquelético y cardíaco. La proteína que produce es del tipo protein-cinasa Ser/Thr y se localiza en las uniones neuromusculares.<sup>109,110</sup> Existe controversia respecto al efecto de los repetidos CTG en la expresión del gen DM; en algunos trabajos se ha informado que los repetidos en exceso no afectan la transcripción y en otros se demostró lo contrario.<sup>111-113</sup> Wang y colaboradores<sup>M4</sup> demostraron que la cantidad de RNAs poliA en células musculares de enfermos por esta miopatía, es menor que en células musculares de individuos sin la enfermedad. Este dato sugiere que el producto del gen DM podría tener un efecto negativo en la regulación genética de muchos genes.

### Ataxia de Friedreich y repetidos GAA/CTT

La ataxia de Friedreich es la ataxia hereditaria más frecuente, con una prevalencia de 1150,000 recién nacidos vivos y una estimación de 1/70 a 1/110 posibles portadores.<sup>115,116</sup> Tiene un patrón de herencia autosómico recesivo y se caracteriza por ataxia, deformaciones esqueléticas, cardiomiopatía y diabetes mellitus en aproximadamente un diez por ciento de los enfermos.<sup>117</sup> La enfermedad aparece antes de los 25 años y muestra una amplia variabilidad fenotípica y edad de manifestación, lo que sugiere un fenómeno de anticipación.<sup>4</sup>

En 1996 se aisló el gen responsable de esta alteración denominado X25, localizado en el cromosoma 9q13.<sup>3</sup> El gen produce una proteína de 210 aminoácidos conocida como frataxina, de función desconocida. En el intrón 1 de este gen existe una región de repetidos variables de GAA. Los límites normales van de 7-22 y en la expansión van de 200 a 1186. La expansión se ha determinado en linfocitos de los enfermos, más no se sabe si existe en las células de los órganos blancos como corazón, hígado, músculo esquelético, páncreas y cerebro. Se ignora de qué manera el exceso de repetidos en un intrón de este gen podría ocasionar la enfermedad, aunque está demostrado que los niveles de mRNA para la frataxina son menores en los enfermos de esta ataxia.<sup>4</sup>

### Epilepsia mioclónica tipo I Unvericht-Lundborg (EPM1) y minisatélites

Esta epilepsia presenta un patrón de herencia recesivo autosómico. Se caracteriza por deterioro mental y ataxia cerebral, con progresión variable. La enfermedad se manifiesta entre los 6-13 años. Es una enfermedad poco común, tiene incidencia de 1 en 20,000 en Finlandia y en ciertas regiones del Mediterráneo.<sup>118,119</sup> El gen cistatin B (CSTB), localizado en el cromosoma 21q22.3 es el responsable de la enfermedad. En sólo 14% de los afectados se encontraron mutaciones puntuales que ocasionarían el padecimiento; en el resto de los pacientes analizados se demostró que la expansión de una secuencia minisatélite de 12 nucleótidos, es la responsable de la enfermedad. Esta secuencia se encuentra aproximadamente 70 nucleótidos antes del inicio de la

transcripción del gen CSTB. En las personas no afectadas existen de dos a tres copias de la secuencia y en los afectados hay más de 60 copias. El transcrito del gen de 0.8 Kb presenta una distribución ubicua. En los afectados sus niveles están reducidos en leucocitos pero no en otras líneas celulares, lo que podría provocarla enfermedad. Hasta el momento no existe una explicación para la disminución del transcrito del gen CSTB, aunque se demostró que la expansión no ocasiona una hipermetilación de la región de los repetidos, como sucede en el gen FMRI y que ocasiona la inhibición de su transcripción.<sup>6-9</sup>

#### Características de las mutaciones por expansión

Existen al menos dos tipos de mutaciones por expansión en los repetidos de trinucleótidos. Una genera una expansión corta y la otra una larga. La primera se caracteriza por la presencia de repetidos CAG, localizados en regiones codificadoras de diversos genes que se expanden por vía paterna. En la segunda los repetidos pueden ser CGG o CTG, se encuentran en regiones no codificadoras y se expanden por vía materna. Debido a que se ha demostrado mosaico somático en la expansión larga, se ha sugerido que estas mutaciones se inician como expansiones cortas durante la meiosis, y la expansión larga de los repetidos CTG o CGG continúa en la embriogénesis temprana.<sup>22,106,107,120</sup> ¿De qué forma se origina la expansión corta? Se ha sugerido que ésta se da por problemas durante la replicación de la hebra rezagada del DNA.<sup>18</sup> Secuencias puras de 38 repetidos o más son inestables; sorprendentemente éste es el tamaño aproximado de los fragmentos de Okazaki. Esto sugiere que secuencias puras de 38 repetidos o más, pueden tener problemas durante su replicación, ya que la DNA polimerasa los podría copiar varias veces.<sup>18,121</sup> Otra alternativa que se ha sugerido para explicar la expansión corta, plantea que los repetidos forman estructuras secundarias que ocasionan su inestabilidad.<sup>122,123</sup>

El efecto de los repetidos a nivel molecular depende del tipo de secuencia y de su tamaño. Los repetidos de CGG se metilan cuando son más de 200, esto ocasiona la inhibición de la transcripción. Cuando los repetidos de CAG se expanden, hay una ganancia o alteración de función, pues existe

mayor cantidad de glutaminas en la proteína mutante, lo que puede ocasionar, al menos en el mal de Huntington, una posible activación del programa apoptótico de la célula.<sup>86</sup> Por lo que respecta a la expansión de los repetidos CTG, no está claro el efecto de la expansión a nivel molecular, sin embargo, los trabajos de Wang y colaboradores<sup>114</sup> sugieren un efecto a nivel de regulación genética.

En fecha reciente se logró reproducir el fenómeno de expansión con los repetidos CTG y CAG en ratones transgénicos.<sup>124-126</sup> Algunas conclusiones importantes obtenidas de estos trabajos fueron: a) la necesidad de otras secuencias que flanqueen a los repetidos para que se dé el fenómeno de expansión. En al menos un caso<sup>124</sup> fue necesario que los repetidos CTG localizados en el extremo 3', del gen DM estuvieran flanqueados por otros dos genes que se encuentran de manera natural asociados a este gen, para que se diera la expansión, y b) el papel del sexo en la expansión: la expansión de repetidos CTG sólo se da en ratones transgénicos hembras, mientras que la de CAG en ratones transgénicos machos.

La ataxia de Friedreich es la primera enfermedad autosómica recesiva relacionada con este fenómeno de expansión. Los repetidos asociados con la enfermedad son diferentes a los anteriormente descritos, tanto en el tipo como en su localización. Es interesante notar que éstos se encuentran en el intrón 1. Hasta el momento se ignora de qué manera, un exceso de repetidos en un intrón pueden ocasionar la enfermedad. Sin embargo, algunos de los afectados además de tener expansión en uno de los alelos, presentan una mutación puntual con sentido equivocado en el otro.<sup>127</sup>

El fenómeno de expansión no está limitado a las secuencias de repetidos de trinucleótidos; recientemente se demostró que dos secuencias minisatélites están relacionadas con la generación de un sitio frágil y con EMP1, como resultado de su expansión.<sup>5,7,9</sup> En la actualidad no está claro cómo se expande este tipo de secuencias y está en discusión si realmente son mutaciones dinámicas, debido a que no se ha demostrado un fenómeno de anticipación para EMP1, y ambos minisatélites no pueden formar estructuras secundarias que ocasionarían inestabilidad en la región y podrían favorecer la expansión.<sup>8</sup>

Es posible que el efecto más claro a nivel fenotípico de la expansión de repetidos, sea el fenómeno de anticipación que describió por prime-

ra vez Augusto Morel en 1857, en lo que él llamó la teoría de la degeneración. Esta fue retomada por Penrose en 1948 y le dió el nombre de anticipación.<sup>129</sup> Antes del descubrimiento de la expansión de repetidos la anticipación se explicaba como una forma de herencia multifactorial o bien por un manejo estadístico inadecuado. Ahora la anticipación se observa como un aumento de penetrancia en el síndrome del X frágil, como manifestación temprana de la enfermedad en el mal de Huntington o como aumento de severidad en el caso de la distrofia miotónica. En los tres casos la anticipación presenta correlación directamente proporcional con el número de repetidos. El fenómeno de anticipación se ha descrito en al menos otras 13 enfermedades.<sup>129,130</sup> Hasta el momento sólo en la esquizofrenia se ha encontrado una posible asociación entre la expansión de los repetidos CAG/CTG y la enfermedad, aunque la expansión de estos repetidos no sería la única causa que explicaría la anticipación en este desorden mental.<sup>131</sup>

El conocimiento molecular del fenómeno de expansión ha permitido conocer las causas de distintas enfermedades genéticas. Esto ha facilitado la implantación de diferentes pruebas diagnósticas de la enfermedad y de posibles portadores con una certeza muy alta lo que permite ofrecer asesoramiento genético a las familias en riesgo. La implantación de diagnósticos presintomáticos para estas alteraciones, tienen implicaciones ético-sociales muy importantes, que deben ser tomadas en cuenta, pues plantean la necesidad de contar con claros principios que normen la realización de estos estudios, más aún cuando en este momento no existen alternativas terapéuticas. Por otro parte, el conocimiento molecular de estas alteraciones permitirá plantear estrategias novedosas para corregirlas mediante terapia génica.<sup>132</sup> Por último, el descubrimiento de esta forma novedosa de herencia ha reforzado la noción de que el DNA es una molécula en constante cambio, aun en un mismo organismo.

## Referencias

1. Armour JAL, Jeffreys AJ. Biology and applications of human minisatellite loci. *Curr Opin Genet Dev.* 1992;2:850-856.

2. Ashley CT, Warren ST. Trinucleotide repeat expansion and human disease. *Annu Rev Genet.* 1995; 29:703-728.
3. Campuzano V, Montermini L, Molto M, Pianese L, Cossée M, Calvalcanti F et al. Friedreich's Ataxia: Autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 1996;271:1423-1427.
4. Filla A, De Michele G, Cavalkanti F, Pianese L, Monticelli A, Campanella G et al. The relationships between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich Ataxia. *Am J Hum Genet* 1996;59:554-560.
5. Yu S, Mangesdorf M, Hewett D, Hobson L, Baker E, Eyre HJ et al. Human chromosomal Fragil site FRA 16B is an amplified AT-rich minisatellite repeat. *Cell* 1997;88:367-374.
6. Lalioti MD, Scott HS, Buresi C, Rossier C, Bottani A, Morris MA et al. Dodecamer repeat expansion in cystatin B gene in progressive myoclonus epilepsy. *Nature* 1997;386:847-851.
7. Lafreniere RG, Rochefort DL, Chretien N, Rommens JM, Cochius JI, Kalvainen R et al. Unstable insertion in the 5' flanking region of the cystatin B gene is the most common mutation in progressive myoclonus epilepsy type 1, FPM1. *Nat Genet* 1997;15:298-302.
8. Buard J, Jeffreys AJ. Big, bad minisatellites. *Nat Genet* 1997;15:327-328.
9. Virtaneva K, D'Amato E, Man J, Koskiniemi M, Norio R, Avanzini G et al. Unstable minisatellite expansion causing recessively inherited myoclonus epilepsy, EPM1. *Nat Genet* 1997;15:393-396.
10. Sutherland GR, Richards RL. The molecular basis of fragile sites in human chromosomes. *Curr Opin Genet Dev* 1995;5:323-327.
11. Tarleton JC, Saul RA. Molecular genetic advances in fragile X syndrome. *J Pediatrics* 1993;122:169-185.
12. Warren ST, Ashley CT. Triplet repeat expansion mutations: the example of fragile X syndrome. *Annu Rev Neurosci* 1995;18:77-99.
13. Warren ST, Nelson DL. Trinucleotide repeat expansions in neurologic disease. *Curr Opin Neurobiol* 1993;3:752-759.
14. Nussbaum RL, Ledbetter DH. The fragile X syndrome. En: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds.) McGraw-Hill Inc. 7a. Edición New York, 1995, pp 795-810.
15. Monaco A. Isolation of genes from cloned DNA. *Curr Opin Genet Dev.* 1994;4:360-365.
16. Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu Y, Kuhl DP, Pizzuti A et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a fragile X syndrome. *Cell* 1991;65:905-914.
17. Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 1991;67:1047-1058.
18. Eichner EE, Holden JJA, Popovich BW, Reiss AL, Snow K, Nelson DL. Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nat Genet* 1994;8:88-94.

19. **Kunst CB, Warren ST.** Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles. *Cell* 1994;77:853-861.
20. **Snow K, Doud LK, Hagemen R, Pergolizzi RG, Erster SH, Thibodeau SN.** Analysis of a CGG sequence at the FMR-1 locus in fragile X families and in the general population. *Am J Hum Genet* 1993;53:1217-1228.
21. **Vits L, De Boule K, Reyniers E, Handig I, Darby JK, Oostra B et al.** Apparent regression of the CGG repeat in FMR1 to an allele of normal size. *Hum Genet* 1994;94:523-526.
22. **Malter HE, Iber JC, Willemsen R, de Graaff E, Tarleton JC, Leisti J et al.** Characterization of the fragile X syndrome mutation in fetal gametes. *Nat Genet* 1997;15:165-170.
23. **Pieretti M, Zhang F, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT et al.** Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* 1991;66:817-822.
24. **Quan F, Zonana J, Gunter K, Peterson KL, Magenis RE, Popovich BW.** An atypical case of fragile X syndrome caused by a deletion that includes the FMR1 gene. *Am J Hum Genet* 1995;56:1042-1051.
25. **De Boule K, Verkerk AJMH, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J.** A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet* 1993;3:31-35.
26. **Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M.** Recombinant DNA. Scientific American books. New York, 1992.
27. **The Dutch-Belgian fragile X consortium.** Fmr1 knockout mice: a model to study fragile X mental retardation. *Cell* 1994;78:23-33.
28. **Smits JK, Dreesen JCFM, Post JG, Smeets DFCM, de Die-Smulders C.** The fragile X syndrome: no evidence for any recent mutations. *J Med Genet* 1993;30:94-96.
29. **Oudet C, Mornet E, Serre JL, Thomas F, Lentès-Zengerlin S, Kretz C et al.** Linkage disequilibrium between the fragile X mutation and two closely linked CA repeats suggests that fragile X chromosomes are derived from a small number of founder chromosomes. *Am J Hum Genet* 1993;52:297-304.
30. **Hirst MC, Grewal PK, Davies KE.** Precursor arrays for triplet repeat expansion at the fragile X locus. *Hum Mol Genet* 1994;3:1553-1560.
31. **Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, Nelson DL.** Fine structure of the human FMR-1 gene. *Hum Mol Genet* 1993;2:1147-1153.
32. **Abilbol M, Menini C, Delezoide AL, Rhyner T, Vekemans M, Mallet J.** Nucleus basalis magnolaris and hippocampus are the major sites of FMR-1 expression in the human fetal brain. *Nat Genet* 1993;4:147-152.
33. **Hergersberg M, Matsuo K, Gassman M, Schaffner W, Luscher B, Rulicket T et al.** Tissue-specific expression of a FMR-1/B galactosidase fusion gene in transgenic mice. *Hum Mol Genet* 1995;4:359-366.
34. **Hinds MC, Ashley CT, Nelson DL, Warren ST, Housman DE, Schalling M.** Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nat Genet* 1993;3:36-43.
35. **Ashley CT, Sutcliffe JS, Kunst CB, Leiner HA, Eichler EE, Nelson DL et al.** Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nat Genet* 1993;4:244-251.
36. **Verheij C, De Graaff E, Bakker CE, Willemsen R, Willems PJ, Meijer N et al.** Characterization of FMR-1 proteins isolated from different tissues. *Hum Mol Genet* 1995;4:895-901.
37. **Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL.** The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons, and appears normal in carriers of the fragile X premutation. *Nat Genet* 1993;4:335-340.
38. **Ashley CT, Wilkinson KD, Reines D, Warren ST.** FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science* 1993;256:563-566.
39. **Siomi H, Matunis MJ, Michael WM, Dreyfuss G.** The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res* 1993;21:193-198.
40. **Siomi H, Siomi MC, Nusshaus ML, Dreyfuss G.** The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA binding protein. *Cell* 1993;74:291-298.
41. **Eberhart DE, Malter HE, Feng Y, Warren ST.** The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet* 1996;5:1083-1091.
42. **Dennis N, Curtis G, Macpherson J, Jacobs P, Heitz D.** Two families with Xq27.3 fragility, no detectable insert in the FMR-1 gene, mild mental impairment and absence of the Martin-Bell phenotype. *Am J Med Genet* 1992;43:232-236.
43. **Sutherland GR, Baker E.** Characterization of a new rare fragile site easily confused with the fragile X. *Hum Mol Genet* 1992;1:111-113.
44. **Knight SJL, Flannery AV, Hirst MC, Cambell L, Christodoulou Z, Phelps SR et al.** Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRAXE mental retardation. *Cell* 1993;74:127-134.
45. **Hamel BCJ, Smits APT, de Graaf E, Smeets DFCM, Schoute F, Fussen BH et al.** Segregation of FRAXE in a large family: clinical, psychometric, cytogenetic, and molecular data. *Am J Hum Genet* 1994;55:923-931.
46. **Knight SJL, Voelckel MA, Hirst MC, Flannery AV, Moncla A, Davies KE.** Triplet repeat expansion at the FRAXE locus and X-linked mild mental handicap. *Am J Hum Genet* 1994;55:81-86.
47. **Gedeon AK, Keinanen M, Ades LC, Kaarlainen H, Geez J, Baker E et al.** Overlapping submicroscopic deletions in Xq28 in two unrelated boys with developmental disorders: identification of a gene near FRAXE. *Am J Hum Genet* 1995;56:907-914.
48. **Hirst MC, Grewal PK, Davies KE.** Precursor arrays for triplet repeat expansion at the fragile X locus. *Hum Mol Genet* 1994;3:1553-1560.
49. **Parrish JE, Oostra BA, Verkerk AJMH, Richards CS, Reynolds J, Spikes AS, et al.** Isolation of a GCC repeat showing expansion in FRAXF, a fragile site distal to FRAXA and FRAXE. *Nat Genet* 1994;8:229-235.
50. **Romain DR, Chapman CJ.** Fragile site Xq27.3 in a family without mental retardation. *Clin Genet* 1992;41:33-35.
51. **Nancarrow JK, Kremer E, Holman K, Eyre H, Doggett NA, Le Paslier D et al.** Implications of FRA 16A structure

- for the mechanism of chromosomal fragile site genesis. *Science* 1994;264:1938-1941.
52. Nancarrow JK, Holman K, **Mangelseorf M**, Hori T, **Denton M**, Sutherland GR et al. Molecular basis of p(CCG)<sub>n</sub> repeat instability at the FRA16A fragile site locus. *Hum Mol Genet* 1995;4:367-372.
  53. **Sutherland GR**, **Jacky PB**, **Baker E**, **Manuel A**. Heritable fragile sites on human chromosomes X. New folate-sensitive fragile sites: 6p23, 9p21, 9q32, 11q23. *Am J Hum Genet* 1983;35:432-437.
  54. **Jones C**, **Penny L**, **Mattina S**, **Yu E**, **Baker L**, **Richards RI** et al. Physical linkage of the fragile site FRA11B and a Jacobsen syndrome chromosome deletion breakpoint in 11q23.3. *Hum Mol Genet* 1994;3:2123-2130.
  55. **Shinzel A**, auf der Maur P, Moser H. Partial deletion of long arm of chromosome 11(del(11)(q23)): Jacobsen syndrome. *J Med Genet* 1977;14:438-444.
  56. Tunnacite A, Mcquire RS. A physical linkage group in human chromosome band 11q23 covering a region implicated in leukocytenoplasia. *Genomics* 1990;8:447-453.
  57. Sutherland GR, **Jacky PB**, **Baker EG**. Heritable fragile sites on human chromosomes. XI. Factors affecting expression of fragile sites at 10q25, 16q22 and 17p12. *Am J Hum Genet* 1984;36:110-112.
  58. **Kennedy WR**, **Alter M**, **Sung JH**. Progressive proximal spinal and bulbar muscular atrophy of late onset: a sexlinked recessive trait. *Neurology* 1968;18:671-680.
  59. La Spada AR, **Wilson EM**, **Lubalin DB**, **Harding AE**, **Fischbeck KH**. Androgen receptor gene mutations X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 1991;352:77-79.
  60. **Sobue G**, **Hashizume Y**, **Mukai E**, **Hirayama M**, **Mitsuma T**, **Takahashi A**. X-linked recessive bulbospinal neuropathy. *Brain* 1989;112:209-232.
  61. **Fischbeck KH**, **Souders D**, **La Spada AR**. A candidate gene for X-linked spinal muscular atrophy. *Adv Neurol* 1991;56:209-214.
  62. **Biancalana V**, **Serville E**, **Pommier J**, **Hanauer A**, **Mandel JL**. Moderate instability of the trinucleotide repeat in spinobulbar atrophy. *Hum Mol Genet* 1992;1:255-258.
  63. **Doyu M**, **Sobue G**, **Mukai E**, **Kachi T**, **Yasuda T**, **Mitsuma T** et al. Severity of X-linked recessive bulbospinal neuropathy correlates with size of the tandem CAG repeat in androgen receptor gene. *Ann Neurol* 1992;32:707-710.
  64. **Mhatre AN**, **Trifiro MA**, **Kaufman M**, **Kazemi-Esfarjani P**, **Figlewicz D**, **Rouleau G** et al. Reduced transcriptional regulatory competence of the androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Genet* 1993;5:184-188.
  65. **Zoghbi HY**, **Pollack MS**, **Lyons LA**, **Ferrell RE**, **Daiger SP**, **Beaudet AL**. Spinocerebellar ataxia: variable age of onset and linkage to human leukocyte antigen in a large kindred. *Ann Neurol* 1988;25:580-584.
  66. **Banfi S**, **Servadio A**, **Chung M**, **Kwiatkowski TJ Jr**, **McCall AE**, **Duvick LA** et al. Identification and characterization of the gene causing type 1 spinocerebellar ataxia. *Nat Genet* 1994;7:5 13-520.
  67. **Matilla T**, **Volpini V**, **Genis D**, **Rosell J**, **Corral J**, **Davalos A** et al. Presymptomatic analysis of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA 1) via the expansion of the SCA 1 CAG-repeat in a large pedigree displaying anticipation and parental male bias. *Hum Mol Genet* 1993;2:2123-2128.
  68. **Ranum LPW**, **Chung M**, **Banfi S**, **Bryer A**, **Schut LJ**, **Ramesar R** et al. Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type 1: evidence for families effects on the age at onset. *Am J Hum Genet* 1994;55:244-252.
  69. **Orr HT**, **Chung M**, **Banfi S**, **Kwiatkowski T J**, **Servadio A**. Expansion of an unstable trinucleotide (CAG) repeat in spinocerebellar ataxia type I. *Nat Genet* 1993;4:221-226.
  70. **Chung M**, **Ranum LPW**, **Duvick LA**, **Servadio A**, **Zoghbi HY**, **Orr HT**. Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet* 1993;5:254-258.
  71. **Servadio A**, **Koshy B**, **Armstrong D**, **Antalfy B**, **Orr HT**, **Zoghbi HT**. Expression analysis of the ataxin-1 protein in tissues from normal and spinocerebellar ataxia type 1 individuals. *Nat Genet* 1995;10:94-98.
  72. **Harper PS**. The epidemiology of Huntington's disease. In: *Huntington's disease*. Harper PS (Ed.). Saunders, London, 1991, pp.251-280.
  73. **Gusella JF**, **MacDonald ME**, **Ambrose CM**, **Duyao MP**. Molecular genetics of Huntington's disease. *Arch Neurol* 1993;50:1157-1163.
  74. **Group THDCR**. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable in Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993;72:97 1-983.
  75. **Andrew SE**, **Goldberg YP**, **Kremer B**, **Telenius H**, **Theilmann J**, **Adams S** et al. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat expansion and age at onset of Huntington's disease. *Nat Genet* 1993;4:398-403.
  76. **Duyao M**, **Ambrose C**, **Myers R**, **Novelletto A**, **Persichetti F**, **Frontali M** et al. Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat Genet* 1993;4:387-392.
  77. **Kremer B**, **Goldberg P**, **Andrew SE**, **Theilmann J**, **Telenius H**, **Zeisler J** et al. A worldwide study of the Huntington's disease mutation. *N Engl J Med* 1994;330:1401-1406.
  78. **Snell RG**, **MacMillan JC**, **Cheadle JP**, **Fenton Y**, **Lazarou LP**, **Davis P** et al. Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nat Genet* 1993;4:393-397.
  79. **Albin RL**, **Tagle DA**. Genetics and molecular biology of the Huntington's disease. *Trends Neurosci* 1995;18:1 1-14.
  80. **Ambrose CM**, **Duyao MP**, **Barnes G**, **Bates GP**, **Li CS**, **Srinidhi J** et al. Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation dueto an expanded CAG repeat. *Somat Cell Mol Genet* 1994;20:27-38.
  81. **Li SH**, **Schilling G**, **Young WS III**, **Li XJ**, **Margolis RL**, **Stine OC** et al. Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron* 1993;11:985-993.
  82. **DiFiglia M**, **Sapp E**, **Chase K**, **Schwarz C**, **Meloni A**, **Young C** et al. Huntington's is a cytoplasmic protein associated

- with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* 1995;14:1075-1081.
83. **Trottier Y, Devys D, Imbert G, Saudou F, An Y, Lutz Y et al.** Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nat Genet* 1995;10:104-110.
  84. Jou YS, Myers RM. Evidence from antibody studies that the CAG repeat in the Huntington's disease gene is expressed in the protein. *Hum Mol Genet* 1995;4:465-469.
  85. **Stine OC, Li SH, Pleasant N, Wagster MV, Hedreen JC, Ross CA.** Expression of the mutant allele of IT-15 (the HD gene) in striatum and cortex of Huntington's disease patients. *Hum Mol Genet* 1995;4:15-18.
  86. Goldberg YP, Nicholson DW, Rasper DM, Kalchman MA, Koide HB, Graham RK et al. Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat Genet* 1996;13:424-429.
  87. Koide R, **Ikeuchi T**, Onodera O, Tanaka H, Igarashi S, **Endo K** et al. Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA). *Nat Genet* 1994;6:9-13.
  88. Takahashi H, Ohama E, Naito H, **Takeda S**, Nakashima S, Nakifuchi T et al. Hereditary dentatorubral-pallidolusian atrophy: clinical and pathological variants in a family. *Neurology* 1988;38:1065-1070.
  89. Miwa S. Triplet repeats strike again. *Nat Genet* 1994;6:3-4.
  90. **Li SH, McInnis MG, Margolis RL, Antonarakis SE, Ross CA.** Novel triplet repeat containing genes in human brain: cloning, expression, and length polymorphisms. *Genomics* 1993;16:572-579.
  91. Nagafuchi S, Yanagisawa H, Oshaki E, Shirayama T, Tadokoro K, **Inoue T** et al. Structure and expression of the gene responsible for the triplet repeat disorder, dentatorubral and pallidolusian atrophy (DRPLA). *Nat Genet* 1994;8:177-182.
  92. Yazawa Y, Nukina N, Hashida H, Goto J, Yamada M, Kanazawa I. Abnormal gene product identified in hereditary dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA) brain. *Nat Genet.* 1995;10:99-103.
  93. **Farmer TW, Wingfield MS, Lynch SA, Vogel FS, Hulette C, Katchinoff B** et al. Ataxia, chorea, seizures, and dementia: pathologic features of a newly defined familial disorder. *Arch Neurol* 1989;46:774-779.
  94. **Burke JR, Ikeuchi T, Kolde R, Tsuji S, Yamada M, Pericak-Vance MA** et al. Dentatorubral-pallidolusian atrophy and Haw River syndrome. *Lancet* 1994;344:1711-1712.
  95. **Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S** et al. CAG expansion in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32. 1. *Nat Genet* 1995;8:221-228.
  96. Rosenberry RN. Machado-Joseph disease: an autosomal dominant motor system degeneration. *Mov Disord* 1992;7:193-203.
  97. **Máciel P, Gasper C, DeStefano AL, Silveira Y, Coutinho P, Radvány J** et al. Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 1995;57:54-61
  98. Maruyama H, Nakamura S, Matsuyama Z, Sakai T, Doyu M, Sobue G et al. Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 1995;4:807-812.
  99. **Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Bukler AJ, Church D, Aburatani H** et al. Molecular basis of the myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 1992;68:799-808.
  100. **Harper PS.** Myotonic dystrophy and related disorders. *En Principles and Practice of Medical Genetics.* Emery A, Rimoin D. (eds.) Londres, WB Saunders, pp579-597
  101. Howeler C, Busch HFM, Geraedts JPM, **Niermeijer MF, Staal A.** Anticipation in myotonic dystrophy: factor or fiction. *Brain* 1989;112:779-797
  102. Fu YH, Pizzuti A, Fenwick RG, King J, Rajnarayan S, Dunne PW et al. An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 1992;255:1256-1258.
  103. Harley HG, **Rundle SA, MacMillan JC, Myring J, Brook JD, Crow S** et al. Size of the unstable CTG repeat sequence in relation to phenotype and parental transmission in myotonic dystrophy. *Am J Hum Genet* 1993;116:4-1174.
  104. Ashizawa T, Anvret M, Baiget M, **Barcelo JM, Brunner H, Cobo AM** et al. Characteristics of intergenerational contractions of the CTG repeat in myotonic dystrophy. *Am J Hum Genet* 54;414-423.
  105. **Anvret M, Aklberg G, Grandell U, Hedberg B, Johnson K, Edstrom.** Larger expansions of the CTG repeat in muscle compared to lymphocytes from patients with myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 1993;2:1397-1400.
  106. Jansen G, **Willems P, Coerwinkel M, Nillensen W, Smeets H, Viis L** et al. Gonosomal mosaicism in myotonic dystrophy patients: involvement of mitotic events in (CTG)<sub>n</sub> repeat variation and selection against extreme expansion in sperm. *Am J Hum Genet* 1994;54:575-585.
  107. Monekton DG, Wong **LJC, Asbizawa T, Caskey CT.** Somatic mosaicism, germline expansions, germline reversions and intergenerational reductions in myotonic dystrophy males: small pool PCR analyses. *Hum Mol Genet* 1995;4:1-8.
  108. Mahadevan MS, **Amemiya C, Jansen G, Sabourin L, Baird S, Neville CE** et al. Structure and genomic sequence of the myotonic dystrophy (DM kinase) gene. *Hum Mol Genet* 1993;2:299-304.
  109. Jansen G, Mahadevan M, **Amemiya C, Workkamp N, Segers B, Hendriks W** et al. Characterization of the myotonic dystrophy region predicts multiple protein isoform-encoding mRNAs. *Nat Genet* 1992;1:261-266.
  110. **van der Ven PFM, Jansen G, van Kuppevelt THSM, Perryman MB, Lupa M, Dunne PW** et al. Myotonic dystrophy kinase is a component of neuromuscular junctions. *Hum Mol Genet* 1993;2:1889-1894.
  111. **Carango P, Noble EN, Marks HG, Funanage VL.** Absence of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) mRNA as a result of triplet repeat expansion in myotonic dystrophy. *Genomics* 1993;18:340-348.
  112. **Fu YH, Friedman DL, Riebard S, Pearman JA, Gibbs RA, Pizzuti A** et al. Decreased expression of myotonin-protein

- Kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science* 1993;260:235-238.
113. Sabourin LA, Mahadevan MS, Narang M, Lee DSC, **Surth LC, Korneluck RG**. Effect of the myotonic dystrophy (DM) mutation on mRNA levels of the DM gene. *Nat Genet* 1993;4:233-238.
  114. Wang J, **Pegoraro E, Menegazzo E, Gennarelli M, Hoop RC, Angelini C** et al. Myotonic dystrophy: evidence for a possible dominant-negative RNA mutation. *Hum Mol Genet* 1995;4:599-606.
  115. Filla A, De Michele G, **Marconi R, Bucci L, Carillo C, Castellano AE** et al. Prevalence of hereditary ataxias and spastis paraplegias in Molise, a region of Italy. *J Neurol* 1990;239:351-353.
  116. Harding AE. Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* 1981;104:589-620.
  117. Geoffroy G, Barbeau A, Breton G, Lemieux B, Aube M, Leger C et al. Clinical description and roentgenologic evaluation of patients with Friedreich's ataxia. *Clin J Neurol Sci* 1976;3:279-286.
  118. **Norio R**, Koskiniemi M. Progressive myoclonus epilepsy: genetic and nosological aspects with special reference to 107 Finnish patients. *Clin Genet* 1979;15:82-398.
  119. **Genton P**, Michelucci R, Tassinari CA, Roger J. The Ramsay-Hunt syndrome revisited: Mediterranean myoclonus versus mitochondrial encephalomyopathy with ragged-red fibers and Baltic myoclonus. *Acta Neurol Scand* 1990;81:8-15.
  120. **Wohrle D**, Hennig Y, Vogel W, Steinbach P. Mitotic stability of fragile X mutations in differentiated cells indicates early post-conceptual trinucleotide repeat expansion. *Nat Genet* 1993;4:140-142.
  121. Richards RL. Simple repeat DNA is not replicated simply. *Nat Genet* 1994;6:114-116.
  122. **Chen X, Mariappan SVS, Catasti P, Ratliff R, Moyzis RK, Laayoun A** et al. Hairpins are formed by a single DNA strands of the fragile X triplet repeats: structure and biochemical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5199-5203.
  123. **Fry M, Loeb LA**. The fragile X syndrome d(CGG)nucleotide repeats form a stable tetrahelical structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4950-4954
  124. Gourdon G, Radvanyi F, Lia AS, Duros C, Blanche M, Abitol M, et al. Moderate intergenerational and somatic instability of a 55-CTG repeat in transgenic mice. *Nat Genet* 1997;15:190-192.
  125. Monckton DG, Coolbaugh MI, Askizawa KT, Siciliano MJ, Caskey T. Hypermutable myotonic dystrophy CTG repeats in transgenic mice. *Nat Genet* 1997;15:193-196.
  126. Mangiarine L, Sathasivam K, Mahal A, **Mott R, Seller M**, Bates GP. Instability of highly expanded CAG repeats in mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Nat Genet* 1997;15:197-200.
  127. Filla A, Michel G, Cavalcanti F, Pianese L, **Monticelli A, Campanella G** et al. The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *Am J Hum Genet* 1996;59:554-560.
  128. McInnis MG. Anticipation: an old idea in new genes. *Am J Hum Genet* 1996;59:973-979.
  129. **Horwitz M, Goode EL, Jarvik GP**. Anticipation in familial leukemia. *Am J Hum Genet* 1996;59:990-998.
  130. Petronis A, **Bassett AS, Honer WG, Vincent JB, Tutch Y, Sasaid T** et al. Search for unstable DNA in schizophrenia families with evidence for genetic anticipation. *Am J Hum Genet* 1996;59:905-911.
  131. **O'Donovan MC, Guy C, Craddock N, Murphy KC, Cardno AG, Jones LA** et al. Expanded CAG repeats in schizophrenia and bipolar disorder. *Nat Genet* 1995;10:380-381.
  132. **Haque NSK, Borghesani P, Isaacson O**. Therapeutic strategies for Huntington's disease based on a molecular understanding of the disorder. *Mol Med Today* 1997;3:175-182.