

## *Breve Informe*

# Análisis molecular de 30 pacientes Niemann-Pick tipo C de España

Macías-Vidal J<sup>a,b</sup>, Rodríguez-Pascau L<sup>b,c,d</sup>, Sánchez-Ollé G<sup>b,c,d</sup>, Lluch M<sup>a,b</sup>, Vilageliu L<sup>b,c,d</sup>, Grinberg D<sup>b,c,d</sup>, Coll MJ<sup>a,b</sup>, el Grupo NPC Español de Trabajo\*. Análisis molecular de 30 pacientes Niemann-Pick tipo C de España. Clin Genet 2010. ©John Wiley & Sons A/S, 2010

<sup>a</sup>Institut de Bioquímica Clínica, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, España

<sup>b</sup>CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, España

<sup>c</sup>Departament de Genètica, Universitat de Barcelona, Barcelona, España

<sup>d</sup>Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, España

\*El Grupo NPC Español de Trabajo incluye a todos los médicos que han enviado muestras de los pacientes para el estudio: A. Alonso (Hospital Virgen del Camino, Pamplona), M. Arellano (Hospital Mútua de Terrassa, Barcelona), O. Blanco de la Barca (Complejo Hospitalario Universitario de Vigo), M.R. Cazorla (Hospital de Fuenlabrada, Madrid), J. Dalmau (Hospital Universitari La Fe, Valencia), R. Domingo (Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia), M.T. García-Silva y E. Martín (Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid), M. Gil-Campos (Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba), P. Jara (Hospital Universitario La Paz, Madrid), D. Lefeber (Radboud University Medical Centre Nijmegen, Holanda), J.A. Martínez-Matos y L. Romero (Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona), I. Ortiz (Hospital General de Elda, Alicante), G. Ozaita (Complejo Hospitalario de Ourense), M.S. Pérez-Poyato y M. Pineda (Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona), J. Prieto (Hospital Universitario de Salamanca), S. Roldán (Hospital Virgen de las Nieves, Granada), L. Ruiz del Portal (Hospital Virgen del Rocío, Sevilla) y A. Verdú Pérez (Hospital Virgen de la Salud, Toledo)

Palabras clave: gran delección – enfermedad de acumulación lisosomal – enfermedad de Niemann-Pick tipo C – gen *NPC1* – mutaciones de *splicing*

Las mutaciones en el gen *NPC1* o *NPC2* son responsables de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC) (OMIM # 257220), un trastorno autosómico recesivo neurodegenerativo de almacenamiento lisosomal causado por una regulación incorrecta del tráfico intracelular de lípidos. El análisis molecular realizado a 30 pacientes no relacionados permitió identificar 43 mutaciones diferentes en el gen *NPC1*, de las cuales 12 no habían sido descritas previamente. Los nuevos alelos *NPC1* mutados fueron cuatro cambios de aminoácido (p.F995L, p.F1079S, p.L1106P y p.G1209E), una mutación sin sentido (p.E1089X), una inserción de 1-bp (p.L1117PfsX4), una delección de un aminoácido (p.N916del), cuatro cambios intrónicos (c.58-3280C>G, c.882-28A>T, c.2604+5G>A y c.3591+5G>A) que afectan al mecanismo de *splicing*, y la primera delección descrita en la enfermedad de NPC que incluye todo el gen. Para todas las mutaciones de *splicing*, se confirmó la formación de transcritos anormales mediante el análisis del cDNA, y también fue evaluada la degradación del mRNA a causa del proceso de *nonsense-mediated mRNA decay*. Tal como se había descrito anteriormente en esta enfermedad, las correlaciones genotipo-fenotipo son limitadas debido al gran número de mutaciones privadas. Nosotros describimos por primera vez un paciente homocigoto para la mutación p.I1061T, el cual presentó el fenotipo clínico infantil precoz, y otro paciente con el fenotipo bioquímico variante, cuya presentación clínica fue la forma neonatal de la enfermedad.

### **Conflicto de intereses**

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses.

La enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC) (OMIM #257220) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM>) es un trastorno autosómico recesivo de almacenamiento de lípidos. A nivel celular, la enfermedad produce una acumulación endosomal tardía/lisosomal de colesterol no esterificado que conduce a la acumulación de un patrón complejo de lípidos en tejidos no neuronales y en el cerebro (1). Las manifestaciones clínicas se caracterizan por la presencia de hepatoesplenomegalia y una progresiva disfunción neurológica variando según la

edad de inicio y la posterior evolución (2).

La heterogeneidad genética y alélica para esta enfermedad fue establecida mediante la identificación de dos genes diferentes, *NPC1* (MIM 607623) y *NPC2* (MIM 601015) (3-5). Unas 294 y 19 mutaciones diferentes causantes de enfermedad han sido publicadas en todo el mundo en los genes *NPC1* y *NPC2*, respectivamente (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).

Varios estudios apuntan hacia un papel clave de las proteínas NPC1 y NPC2 en la modulación del tráfico vesicular de colesterol y glicolípidos (6-8), aunque si trabajan en conjunto, interactuando a nivel funcional y estructural, aún no está claro. Cabe mencionar que las interacciones directas entre las proteínas NPC2 y NPC1 no han sido descritas hasta el momento (9).

En el estudio realizado anteriormente por nuestro grupo, se llevó a término el análisis mutacional del gen *NPC1* a un grupo de 40 pacientes españoles y sugerimos un origen único para las mutaciones p.C177Y y p.G993EfsX4, en contraste con la mutación p.I1061T que mostró diferentes orígenes. Aquí, presentamos el análisis molecular de 30 pacientes NPC no relacionados, el cual permitió la identificación de 12 nuevas mutaciones en el gen *NPC1* incluyendo una gran deleción y varias mutaciones de *splicing* que se han caracterizado a nivel de RNA.

## **Materiales y métodos**

### *Los pacientes*

Las muestras fueron obtenidas de 31 pacientes pertenecientes a 30 familias no relacionadas. La mayoría de ellos fueron de origen español, a excepción de siete pacientes de otros grupos étnicos: Marruecos, Costa Rica, Ecuador y Holanda. Nueve pacientes (NPC02, 03, 07, 13, 21, 29, 36, 38 y 40) habían sido previamente descritos por nuestro grupo (10), pero en cada uno de ellos uno de los alelos mutantes había quedado sin identificar. El diagnóstico de la enfermedad de NPC se determinó por la demostración citoquímica de la acumulación patológica de colesterol mediante la tinción con filipina en los fibroblastos de piel cultivados según lo descrito por Vanier et al. (11). La clasificación de los pacientes respecto a sus características clínicas se realizó según lo propuesto previamente (12).

### *Búsqueda de mutaciones: análisis del cDNA y del DNA genómico*

Para identificar mutaciones en el gen *NPC1*, se realizó la secuenciación de su cDNA. Los cambios identificados fueron confirmados por secuenciación de la región genómica correspondiente. Cuando sólo se encontró una mutación en la secuencia del cDNA, todos los exones y las zonas intrónicas flanqueantes fueron secuenciadas. Para detectar posibles mutaciones cuyos mRNAs son candidatos a sufrir el proceso de *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) (13), las células fueron tratadas con cicloheximida (CHX) (Sigma, St. Louis, MO) según el protocolo descrito previamente (14).

La extracción del RNA y la retrotranscripción (RT-PCR) se realizaron utilizando métodos estándar. El cDNA de *NPC1* se amplificó en 10 fragmentos superpuestos de PCR utilizando cebadores específicos previamente descritos (15) o cebadores de diseño propio, los cuales están disponibles previa solicitud. Para analizar la pérdida del exón 11 (*exon skipping*) en los fibroblastos no tratados y tratados con CHX del paciente NPC29 y de un individuo sano, el cDNA se amplificó usando el cebador directo específico para el transcrito sin exón 11 (superposición de los exones 10 y 12) 5'TTGGGAGGCTATGATGGTTTA3' y el cebador reverso situado en el exón 14 5'GGTTTCCCCTTGAAGACGTT3. El método de PCR a tiempo real utilizado para cuantificar los niveles de mRNA en este paciente fue el descrito previamente (14). Para determinar el cambio intrónico que causa la exonización de 374 bp en el paciente NPC59, fueron utilizados unos cebadores basados en la secuencia del intrón 1 (cebadores disponibles bajo petición). Los productos de PCR fueron examinados en busca de mutaciones mediante la secuenciación del DNA utilizando el kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones de secuenciación se ejecutaron en un analizador genético ABI Prism® 3130xl (Applied Biosystems, Foster City, CA).

El DNA genómico fue extraído de fibroblastos de piel cultivados mediante métodos estándar. Los exones y zonas intrónicas flanqueantes de los genes *NPC1* y *NPC2* se amplificaron utilizando los cebadores y las condiciones de PCR previamente descritas (10, 16). Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados como se describe en el párrafo anterior. Las nuevas mutaciones fueron analizadas en 50

controles sanos.

#### *Caracterización de las mutaciones del paciente NPC57*

Para confirmar la presencia de la mutación p.T1066N en el exón 21 del gen *NPC1* en las muestras del paciente NPC57 y de sus padres, se amplificó el DNA genómico (gDNA).

Para analizar la delección, los experimentos cuantitativos de PCR a tiempo real se realizaron con el aparato StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA). Todas las reacciones de PCR, con un volumen final de 10  $\mu$ l, se llevaron a cabo por triplicado y contenían 50 ng de DNA. Los exones 1, 21 y 25 del gen *NPC1* y el exón 5 del gen *PMM2*, el cual se utilizó como control endógeno, se ejecutaron por separado. Los reactivos fueron SYTO®9 green fluorescent nucleic acid stain (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, Oregon) y Ampli Taq® Gold DNA Polymerase con Gene Amp® 10x PCR Gold buffer y MgCl<sub>2</sub> solution (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los cebadores usados para amplificar el fragmento de *PMM2* fueron, el directo 5'AGGCTGTTTATCTATGTTGCC3' y el reverso 5'CACCAGGCCATATCTTATTT3'. Las condiciones de PCR fueron 95°C durante 10 min, luego 40 ciclos de 95°C durante 15 s y 60°C durante 1 min. Los experimentos fueron monitoreados a través del Software v2.0 StepOne (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los niveles de gDNA se cuantificaron de forma relativa mediante la evaluación de los valores Ct de acuerdo con el método de Ct comparativa ( $\Delta\Delta$ Ct) (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Un total de 13 polimorfismos localizados en el gen *NPC1* se analizaron mediante amplificación por PCR y secuenciación. En particular, tres de los polimorfismos se encontraban en la región 5'UTR, cuatro en el intrón 1, y los seis restantes en los exones 4, 6, 12, 17, 18 y 25 (último exón del gen), respectivamente. Las muestras de los padres también se analizaron para estos polimorfismos.

#### *Nomenclatura de las mutaciones*

Todas las mutaciones fueron descritas de acuerdo con la nomenclatura recomendada (17) (las actualizaciones se encuentran en la página web: <http://www.HGVS.org/mutnomen/>). La numeración de nucleótidos del gen es según

la secuencia de GenBank NM\_000271.3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), siendo la posición +1 la A del codón de inicio. El codón ATG representa la posición +1 para la numeración de los aminoácidos de acuerdo con la secuencia de la proteína NPC1 NP\_000262.1.

## Resultados

### *Fenotipo clínico y bioquímico*

La distribución del fenotipo clínico y bioquímico de los pacientes NPC no relacionados se resume en la Tabla 1. Los fenotipos clínicos fueron clasificados de acuerdo a la edad de inicio de los síntomas neurológicos, a excepción de la forma sistémica neonatal fatal. El grupo de 30 pacientes incluye 3 (10%) con presentación clínica neonatal, 10 (33,3%) infantil severa (edad de inicio <2 años), 6 (20%) infantil tardía (edad de inicio 3-5 años), 6 (20%) juvenil (edad de inicio 5-16 años) y 2 (6,6%) adulta (edad de inicio >16 años). En tres pacientes, el fenotipo clínico no se pudo determinar debido a la falta de datos relativos a la progresión de la enfermedad.

En cuanto al fenotipo bioquímico, 21 (70%) de los pacientes presentaron el fenotipo clásico (una acumulación masiva de colesterol no esterificado) y 8 (26,6%) de ellos mostraron el fenotipo variante (una acumulación moderada de colesterol no esterificado). No fue posible clasificar bioquímicamente a un paciente debido a que no se pudo realizar la técnica de la filipina.

### *Análisis mutacional*

La Tabla 1 muestra los genotipos de los pacientes incluidos en este estudio. El análisis molecular del gen *NPC1* permitió la identificación de 43 mutaciones diferentes, de las cuales 12 no habían sido descritas antes. Las nuevas mutaciones eran cuatro sustituciones de aminoácido [p.F995L (c.2983T>C), p.F1079S (c.3236T>C), p.L1106P (c.3317T>C) y p.G1209E (c.3626G>A)], una mutación sin sentido [p.E1089X (c.3265G>T)], una inserción de 1-pb [p.L1117PfsX4 (c.3349dupC)], una deleción en pauta [p.N916del (c.2746\_2748delAAT)], cuatro cambios intrónicos que afectan el mecanismo de *splicing* (c.58-3280C>G, c.882-28A>T, c.2604+5G> A y c.3591+5G> A), y una deleción de gran tamaño que incluye el gen *NPC1* entero.

También encontramos un nuevo alelo mutante que contiene dos mutaciones *en cis*, p.[R978C; N1156S], como muestra el análisis del DNA de los padres del paciente NPC61 (resultados no mostrados).

Nuestro análisis del gen *NPC1* permitió completar 29 genotipos. En uno de los pacientes (NPC29), después de la secuenciación tanto del cDNA como del DNA genómico, un alelo sigue siendo desconocido (ver siguientes secciones).

**Tabla 1.** Datos clínicos, bioquímicos y mutacionales de 30 pacientes con enfermedad de Niemann-Pick tipo C

?, no encontrado; N, nueva mutación identificada en este estudio; NMD, *nonsense-mediated mRNA decay*.

<sup>a</sup>Clasificación de los fenotipos clínicos según la edad de aparición de los síntomas neurológicos (12), excepto para la forma sistémica neonatal fatal que incluye aquellos pacientes que murieron por insuficiencia hepática en los primeros meses de vida. Incluimos en las formas desconocidas aquellos pacientes que fueron diagnosticados en el período neonatal por los síntomas sistémicos pero todavía no habían presentado ningún síntoma neurológico.

<sup>b</sup>Definido según el grado de severidad de las alteraciones del procesamiento del colesterol intracelular.

<sup>c</sup>Observar que en algunos casos, la proteína putativa podría no ser sintetizada a causa de la degradación del mRNA por NMD.

<sup>d</sup>Pacientes previamente descritos (10), pero que sólo tenían identificado un alelo mutado.

<sup>e</sup>Observar que este paciente fue mencionado como NPC111 en el artículo en el que la mutación c.1554-1009G>A fue descrita por primera vez (24).

<sup>f</sup>Observar que esta mutación fue previamente descrita como p.G1252R (10).

<sup>g</sup>Los pacientes 56 y 56' son hermanos afectados.

Table 1. Clinical, biochemical and mutational features of 30 Niemann-Pick C disease patients

Patient	Origin	Clinical phenotype <sup>a</sup>	Biochemical phenotype <sup>b</sup>	Nucleotide change (allele 1)	Amino acid change <sup>c</sup> (allele 1)	Nucleotide change (allele 2)	Amino acid change <sup>c</sup> (allele 2)	Ref.
NPC13 <sup>d</sup> NPC55	Spanish Spanish	Neonatal Neonatal	Classical Classical	c.2604 +5G>A c.3691 +5G>A	p.I839_D869del p.S1160_S1197del, V1177_S1197del, S1197_V1198ins15]	c.2604 +5G>A c.3691 +5G>A	p.I839_D869del p.S1160_S1197del, V1177_S1197del, S1197_V1198ins15]	N N
NPC61 NPC02 <sup>d</sup>	Spanish Spanish	Neonatal Severe infantile	Variant Classical	c.2932C>T; 3467A>G c.3245 +1dupG	p.I897R; N1156S] p.S1082RfsX15, S1092_Q1090delinsR]	c.3019C>G c.3265G>T	p.P1007A p.E1080X	18, 4, 19 10, N
NPC07 <sup>d</sup> NPC40 <sup>d</sup> NPC47 NPC51 NPC53 NPC57	Spanish Spanish Ecuadorian Spanish Spanish Spanish	Severe infantile Severe infantile Severe infantile Severe infantile Severe infantile Severe infantile	Classical Classical Classical Classical Classical Classical	c.894dupT c.1935T>A c.5303>A c.1496G>A c.952_953delAG c.3197C>A	p.V299GfsX9 p.C645X p.C177Y p.C479Y p.Q119VfsX8 p.T1066N	c.2612A>G c.3236T>C c.5303>A c.3160G>A c.2830G>A Deletion of the whole NPC1 gene	p.Y871C p.F1079S p.C177Y p.A1054T p.D944N	10, 20 10, N 18 10, 21 22, 21 10, N
NPC62 NPC63 NPC64 NPC03 <sup>d</sup> NPC27 <sup>d</sup> NPC36 <sup>d,a</sup> NPC38 <sup>d</sup> NPC45 NPC54	Moroccan Spanish Moroccan Spanish Spanish Spanish Costa Rican Spanish	Severe infantile Severe infantile Severe infantile Late infantile Late infantile Late infantile Late infantile Late infantile	Classical Classical Classical Classical Classical Classical Classical Variant	c.3182T>C c.2324A>C c.3317T>C c.5303>A c.882_28A>T c.1554-1009G>A c.1554-1009G>A c.2201G>T c.352_353delAG	p.H1061T p.Q775P p.L1106P p.C177Y p.K295RfsX6 p.A519QfsX1 p.A519QfsX1 p.S734I p.Q119VfsX8	c.3182T>C c.2830G>A c.3317T>C c.2604 +5G>A c.1274C>A c.2888_2897del c.3754G>C c.2201G>T c.2974G>T	p.H1061T p.D944N p.L1106P p.I839_D868del p.S425X p.I962_F966del p.V1198GfsX4 <sup>f</sup> p.S734I p.G992W	23 21 N N 18, N N, 10 24, 10 24, 10 25 22, 19
NPC29 <sup>d</sup> NPC46 NPC49 NPC52 NPC58 NPC60 NPC50 NPC56/NPC56 <sup>g</sup> NPC48 NPC59 NPC65	Spanish Spanish Spanish Spanish Spanish Spanish Spanish Dutch Moroccan Moroccan	Juvenile Juvenile Juvenile Juvenile Juvenile Juvenile Adult Unknown Unknown Unknown	Classical Classical Classical Classical Classical Classical Classical Unknown Variant Classical	c.1436G>A c.1990G>A c.2292G>A c.2932C>T c.2746_2749delAAAT c.1554-1009G>A c.2974G>C c.3349dupC c.2861C>T c.58-3280C>G c.3657G>A	p.C479Y p.V664M p.A750_G765del p.R978C p.N916del p.A519QfsX1 p.G992R p.L1117PfsX4 p.S854L p.V200CfsX6 p.R1186H	? c.3104C>T c.3425T>C c.2983T>C c.3451G>A c.3182T>C c.2983T>C c.3672C>G c.3628G>A c.2819C>T c.3657G>A	p.A1035V p.M1142T p.F995L p.A1151T p.H1061T p.F995L p.F1224L p.G1208E p.S940L p.R1186H	10 25, 18 18, 21 18, N N, 26 24, 23 21, N N, 10 N, 19 N, 19 4

### *Mutaciones de splicing*

El perfil electroforético de los productos de RT-PCR obtenidos a partir del RNA total aislado de los fibroblastos de varios pacientes, los cuales presentan nuevas mutaciones de *splicing* (c.58-3280C>G, c.882-28A>T, c.2604+5G>A y c.3591+5G>A) o cambios anteriormente descritos (c.1554-1009G>A, c.2292G>A y c.3754G>C), mostró múltiples bandas (Fig. 1). Por lo tanto, estas mutaciones son dignas de ser descritas con más detalle.

La presencia de la mutación intrónica c.58-3280C>G promueve la inserción de un pseudoexón que corresponde a 374 bp del intrón 1, la cual fue detectada por secuenciación directa (c.57\_58ins374) (Fig. 1a). Este cambio presuntamente crea una nueva región aceptora y activa un donador críptico de *splicing* (puntuación 0.92), mientras que los lugares naturales de *splicing* de los exones circundantes permanecen funcionales, lo que resulta en la generación de un transcrito anormal. La secuencia intrónica insertada origina un codón de terminación prematuro (PTC), aunque la banda extra observada estaba presente tanto en la muestra sin tratar como en la tratada con CHX, lo que sugiere que no hay degradación por el mecanismo de NMD (resultado no mostrado).

El cambio intrónico c.882-28A>T, que implica al residuo conservado de adenosina del *ariat branch point* del intrón 6, crea un cDNA anormal al que le falta el exón 7 (c.882\_954del73) (Fig. 1b). La pérdida del exón 7 altera la pauta de lectura dando lugar a un PTC, que activa la degradación del mRNA por el proceso de NMD (resultados no mostrados).

La mutación c.2604+5G>A, que se encuentra en una posición conservada del lugar donador de *splicing* del intrón 17, promueve la pérdida del exón 17 (c.2515\_2604del90) (Fig. 1c).

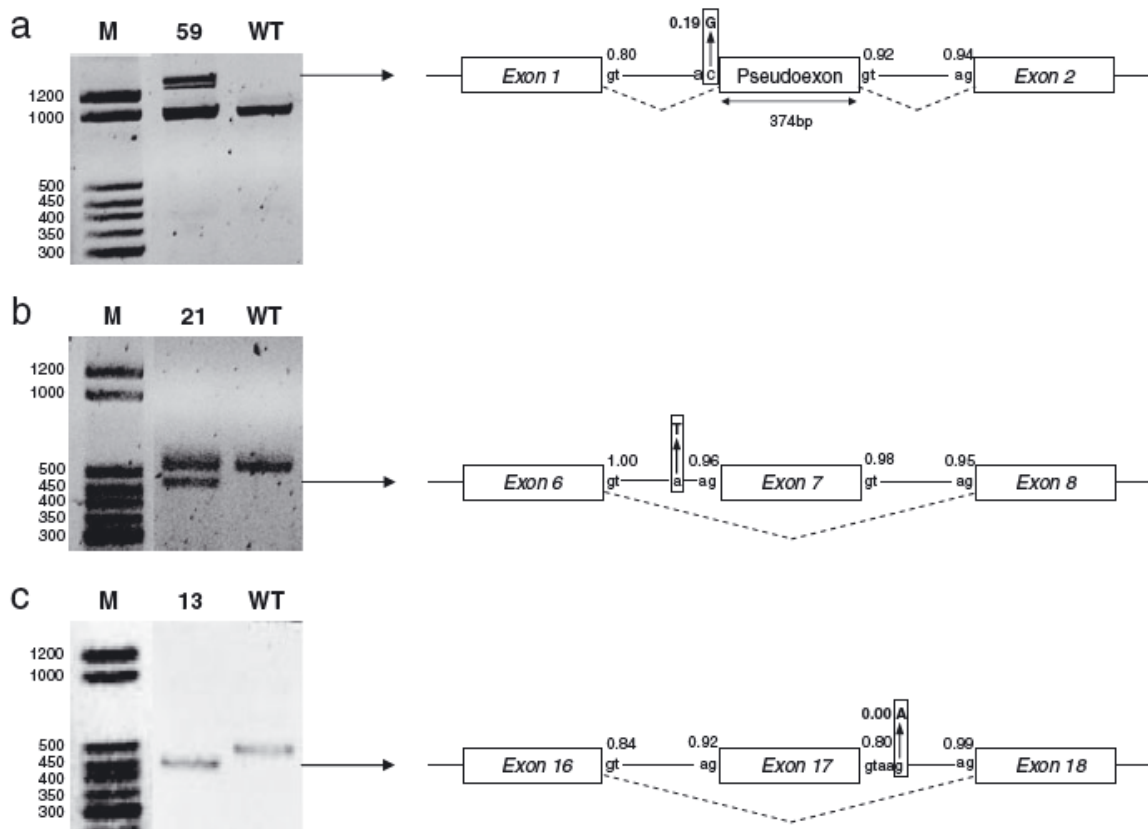
El análisis de los productos c.3591+5G>A revela la presencia de tres transcritos aberrantes: uno con una inserción de los primeros 45 bp del intrón 23 (c.3591\_3592ins45), otro con la delección de los últimos 63 bp del exón 23 (c.3529\_3591del63) y un tercero con la pérdida del exón 23 (c.3478\_3591del114) (Fig. 1d).

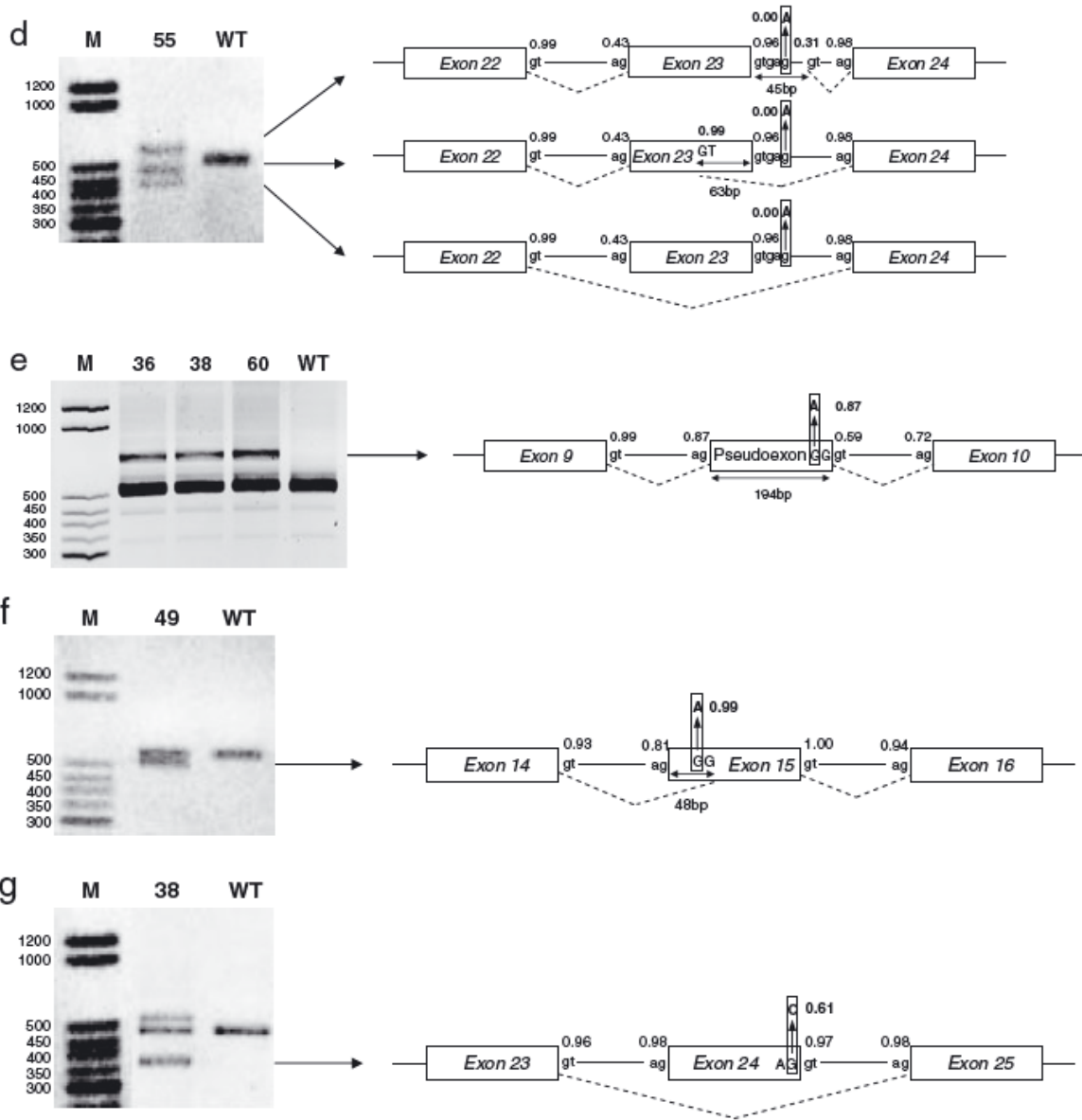
Entre las mutaciones descritas anteriormente, hay el cambio intrónico profundo c.1554-1009G>A (24) que está situado en el intrón 9 y crea un donador críptico de

*splicing* que resulta en la incorporación de 194 bp del intrón 9 (c.1553\_1554ins194) como un pseudoexón (Fig. 1e).

La mutación c.2292G>A conduce a la creación de un lugar aceptor de *splicing* en el exón 15, generando un transcrito al que le faltan los primeros 48 bp del exón 15 (c.2246\_2293del48) (Fig. 1f).

La mutación c.3754G>C afecta al último nucleótido del exón 24, que desempeña un papel clave en la eficiencia del mecanismo de *splicing*, y genera la pérdida del exón 24 (c.3592\_3754del163) (Fig. 1g). En la publicación anterior (10), el efecto de este cambio sobre la proteína NPC1 fue nombrado como p.G1252R; sin embargo, la pérdida del exón 24 interrumpe la pauta de lectura, y el producto de la traducción de este mRNA, el cual no es degradado por el proceso de NMD (resultado no mostrado), es una proteína truncada.





**Fig. 1.** mRNAs de *NPC1* anormales en los casos con mutaciones de *splicing*. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la retrotranscripción y representaciones esquemáticas de los cDNAs de *NPC1* aislados de los fibroblastos tratados con cicloheximida de los pacientes. Las puntuaciones del *splicing* (calculado con el software BDGP) se muestran encima de los correspondientes lugares de *splicing* 5' y 3'. Las puntuaciones de los mutantes se indican en negrita. Las mutaciones están indicadas mediante flechas. M, marcador de peso molecular de DNA de 50 bp (expresado en bp); WT, individuo *wild-type*. (a) Paciente 59 con la mutación c.58-3280C>G. La banda intermedia corresponde a heterodúplex. (b) Paciente 21 con la mutación c.882-28A>T. (c) Paciente 13 con la mutación c.2604+5G>A en homocigosis. (d) Paciente 55 con la mutación c.3591+5G>A en homocigosis. (e) Pacientes 36, 38 y 60 con la mutación c.1554-1009G>A. (f) Paciente 49 con la mutación c.2292G>A. (g) Paciente 38 con la mutación c.3754G>C. La banda superior corresponde a heterodúplex.

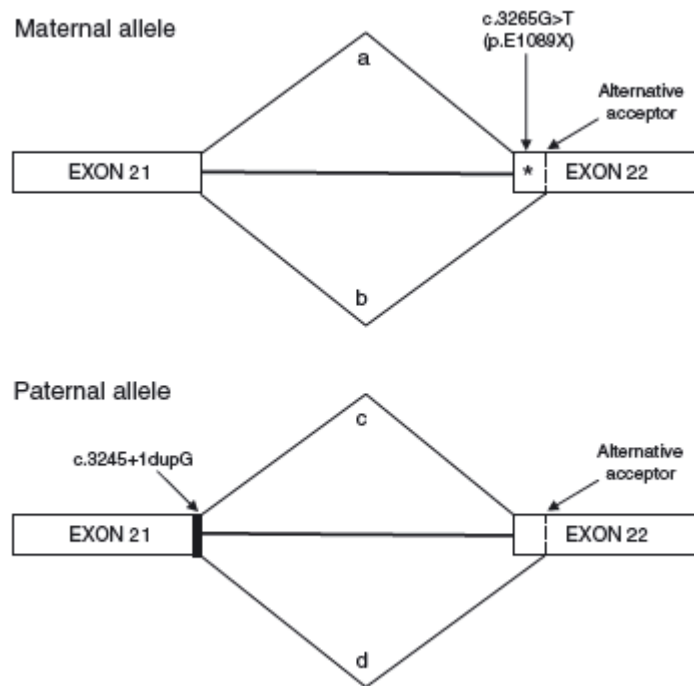
### *Diferentes transcritos encontrados en la muestra del paciente NPC02*

En un estudio anterior (10), uno de los alelos mutantes, c.3245+1dupG, de este paciente fue encontrado. Aquí, se informa de la identificación de una mutación en el segundo alelo, p.E1089X. De esta manera, las dos mutaciones causantes de enfermedad han sido identificadas. Sin embargo, el análisis del cDNA del paciente mostró la aparición de cuatro transcritos diferentes (Fig. 2) como resultado de la combinación de la presencia/ausencia de la dupG y de un patrón alternativo de *splicing* que provoca la pérdida de los primeros 25 nucleótidos del exón 22 (desde la posición c.3246 a la c.3270). En los individuos control, este *splicing* también fue observado pero a niveles muy bajos y sólo fue detectable después del tratamiento con CHX (resultado no mostrado). En el paciente, el transcrito más abundante fue el que lleva la G extra y en el que se utiliza el aceptor alternativo del exón 22 (Fig. 2, transcrito D). Esto sería consecuente con el hecho de que este transcrito no se vería afectado por NMD ya que la alteración de la pauta de lectura causada por la adición de la G se corregiría por la eliminación de los 25 nucleótidos del exón 22 debido al *splicing* alternativo. El análisis de las muestras de DNA genómico y cDNA de los padres confirmaron esta hipótesis. El padre lleva la duplicación de la G y la madre la mutación sin sentido p.E1089X. A nivel del cDNA, la mutación p.E1089X no se observó, lo que sugiere degradación por NMD.

### *Alelo portador de una gran delección en el paciente NPC57*

El primer análisis de las muestras del paciente NPC57 reveló homocigosidad para la mutación p.T1066N. Sin embargo, mientras que el padre era heterocigoto para este cambio, la madre no era portadora de la mutación. El análisis de 13 polimorfismos del gen *NPC1* (tres en la región 5'UTR: rs1620047, rs1788774 y rs1652354; cuatro en el intrón 1: rs1788781, rs1788783, rs1788826 y rs7226548; y seis en la región codificante: p.Y129Y, p.H215R, p.M642I, p.I858V, p.N931N y p.R1266Q) en el paciente y sus padres sugirió una delección del alelo materno, ya que los polimorfismos cubrían el gen entero desde la región 5'UTR hasta el último exón. Los análisis de PCR cuantitativa revelaron que el paciente y la madre tienen la mitad de la cantidad de DNA genómico de *NPC1*. La cuantificación relativa (RQ) del DNA de *NPC1* se normalizó con los niveles de DNA de *PMM2* (control endógeno) usando el

método comparativo Ct ( $\Delta\Delta C_t$ ). La muestra control (individuo *wild-type*) se fijó como valor de referencia (RQ=1). La muestra del padre mostró una RQ alrededor de 1, mientras que el paciente y la madre mostraron una RQ alrededor de 0.50 para el exón 21 y también para el primer y el último de los exones del gen *NPC1*. Para determinar los límites de la delección del paciente NPC57, polimorfismos adicionales situados en otros genes del cromosoma 18 deben ser analizados.

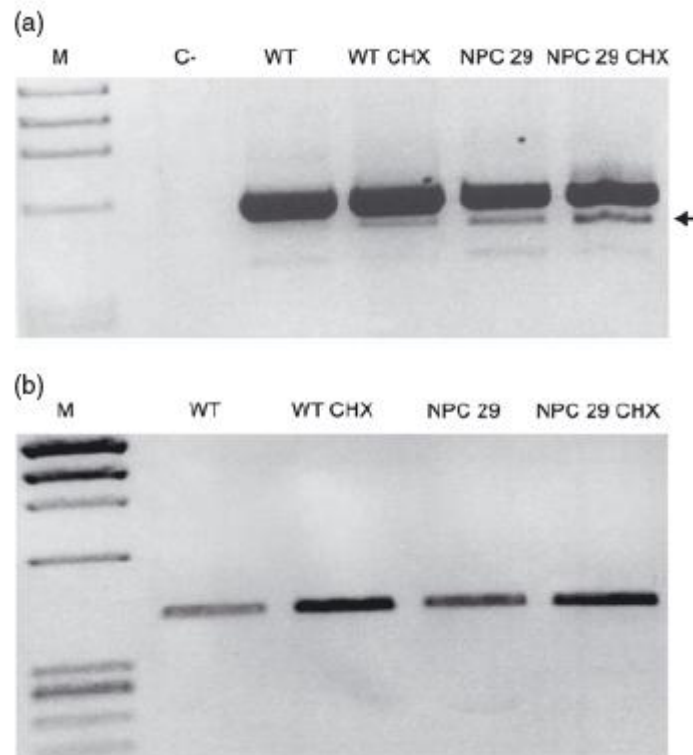


**Fig. 2.** Transcritos de *NPC1* observados en las muestras del paciente NPC02. El alelo materno genera un transcrito (a), el cual usa los lugares de *splicing* normales pero contiene la mutación sin sentido c.3265G>T (p.E1089X) en el exón 22, y otro transcrito (b) que utiliza un aceptor alternativo en el exón 22 y omite los primeros 25 nucleótidos del exón 22. El alelo paterno tiene un nucleótido adicional G al final del exón 21 y genera dos transcritos dependiendo del uso del aceptor normal (c) o del alternativo (d).

#### *Alelo no identificado*

En cuanto al paciente NPC29, además de la identificación de la mutación p.C479Y en un alelo, se detectó una banda adicional correspondiente a la pérdida del exón 11 (103 bp). Sin embargo, ninguna mutación que pudiera explicar este *splicing* alternativo fue encontrada tras la secuenciación del cDNA y del gDNA. Para analizar si este transcrito se produce de forma natural, realizamos la misma amplificación por

PCR en el cDNA procedente de los fibroblastos de un individuo control. La banda extra también se detectó en la muestra control, aunque la intensidad fue menor que en la del paciente (Fig. 3a). El tratamiento con CHX mostró que este transcrito está en parte afectado por el NMD. Para confirmar aún más estos resultados, se llevó a cabo una PCR adicional usando un cebador directo específicamente diseñado para la amplificación del transcrito al que le falta el exón 11. Como se muestra en la Fig. 3b, en todos los casos, se obtuvo una banda del tamaño esperado (416 bp), lo que sugiere que este producto alternativo no está relacionado con la enfermedad. El análisis de marcadores polimórficos en la región codificadora del gen *NPC1* y los niveles normales de mRNA observados por PCR a tiempo real (RQ alrededor de 1) en este paciente, no sugieren la presencia de una delección total del gen *NPC1* o una mutación afectada por el proceso de NMD. El gen *NPC2* también se ha analizado en este paciente, pero no se detectó ningún cambio.



**Fig. 3.** Retrotranscripción y amplificación del cDNA de *NPC1* a partir de las muestras de un individuo *wild-type* (WT) y del paciente 29 (NPC29), en ausencia o presencia de cicloheximida (CHX). M, marcador de peso molecular; C-, control negativo (PCR sin DNA). (a) Amplificación del fragmento 5' del cDNA de *NPC1*, incluyendo los exones 9-13. La flecha indica la banda correspondiente a la falta

del exón 11. (b) Amplificación del transcrito sin el exón 11 usando un cebador directo específico solapado en los exones 10 y 12.

## **Discusión**

### *Perfil mutacional*

Igual que lo descrito anteriormente (27), los resultados moleculares en la serie de pacientes NPC de este estudio muestran un amplio espectro de mutaciones del gen *NPC1* causantes de enfermedad.

El perfil mutacional del grupo estudiado muestra principalmente alelos que contienen mutaciones de cambio de sentido; sin embargo, cabe destacar la relevancia de los defectos de *splicing*. La verdadera prevalencia de este tipo de mutaciones es probablemente subestimada debido a que las secuencias intrónicas profundas no son habitualmente secuenciadas, y en el análisis del mRNA, los transcritos aberrantes (habitualmente con alteración de la pauta de lectura y creación de un PTC) suelen ser propensos a la degradación por NMD (28).

La p.I1061T es la mutación del gen *NPC1* más común en pacientes de descendencia de Europa Occidental (23). En nuestra cohorte de 55 pacientes NPC españoles, incluidos los de este estudio junto con los publicados en nuestro anterior artículo (10), esta mutación representa un 8% de los alelos mutantes. La frecuencia de la mutación p.I1061T es menor que la descrita por otros autores (23, 25, 29); sin embargo, es similar a la descrita en las poblaciones portuguesa e italiana (18, 30). La mutación p.P1007A fue el segundo alelo más frecuente, con una frecuencia de 4.5%, de acuerdo con estudios previos (20). El cambio intrónico c.1554-1009G>A, descrito por primera vez por nuestro grupo en el paciente español NPC36 (24), el cual provoca un error de *splicing*, parece ser relativamente común en nuestro país, ya que tres pacientes (NPC36, NPC38 y NPC60) fueron heterocigotos compuestos para esta mutación (2,7%). Existe una gran heterogeneidad alélica, debido a que pocas mutaciones están presentes en más de un paciente.

En referencia a las nuevas mutaciones, los cambios de aminoácido (p.F995L, p.F1079S, p.L1106P y p.G1209E) son probablemente mutaciones patogénicas debido al hecho de que no se observaron en 100 alelos control sanos; tras la secuenciación de todo el gen *NPC1*, no se encontraron otras mutaciones, y los

aminoácidos afectados están conservados a lo largo de las especies. Además, los programas de predicción sobre la funcionalidad como el PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) o el Panther (<http://www.pantherdb.org/>) confirmaron la posible patogenia de estos nuevos cambios (resultados no mostrados). Aunque para verificar estas predicciones, sería necesario realizar estudios de expresión de estos alelos.

Entre los otros nuevos cambios, existe la mutación p.N916del que causa una deleción en pauta. Aunque el efecto de esta deleción no fue confirmado por estudios de expresión, los programas citados anteriormente sugieren que el residuo 916 es relevante para la proteína NPC1.

Las mutaciones p.E1089X y p.L1117PfsX4 son, sin duda, mutaciones causantes de enfermedad, ya que crean un PTC que provoca la degradación del mRNA por el mecanismo de NMD (resultados no mostrados).

El análisis de las nuevas mutaciones de *splicing* (c.58-3280C>G, c.882-28A>T, c.2604+5G>A y c.3591+5G>A) utilizando software de predicción de *splicing* (<http://www.fruitfly.org/seqtools/splice.html>) indica que alteran los sitios naturales de *splicing*. El efecto de cada mutación sobre la puntuación del *splicing* se muestra en la Fig. 1. En todos los casos la formación de transcritos anormales ha sido confirmada mediante el análisis del cDNA. No obstante, para demostrar que los cambios intrónicos observados son causantes de enfermedad, sería necesario evaluarlos mediante ensayos de transfección de minigenes. En el caso del nuevo cambio intrónico profundo, c.58-3280C>G, el hecho de que después del tratamiento con CHX no se observen diferencias en el cDNA del paciente NPC59 puede ser debido a que se escape del proceso de NMD. Los codones de terminación son reconocidos como prematuros por la maquinaria del NMD si se encuentran a más de 50-55 nucleótidos *upstream* de la unión exón-exón que se encuentra más cerca del extremo 3', pero una serie de excepciones han sido publicadas anteriormente. Los mecanismos implicados en estos casos de resistencia al NMD incluyen la proximidad de las mutaciones sin sentido al codón de iniciación natural, la reiniciación de la traducción y la presencia de una secuencia que actúe *en cis* que confiera inmunidad a la regla de proximidad de los 50-55 nucleótidos (31). Al igual que la mutación c.1554-1009G>A (24), esta mutación puntual intrónica que resulta en la inserción de un

pseudoexón puede ser tratada efectivamente con terapia de oligonucleótidos antisentido. En el caso de la mutación c.882-28A>T, la aparición de la ausencia del exón 7 coincide con lo que fue descrito para la mutación c.882-28A>G (32), ya que ambos afectan al mismo nucleótido. En cuanto a la mutación c.2292G>A previamente descrita, el efecto observado en el producto de PCR del cDNA es el mismo que el descrito por otros autores (18, 25).

También describimos una gran deleción en un paciente NPC, la cual incluye el gen *NPC1* entero. Según nuestro conocimiento, esta es la primera gran deleción descrita en un paciente NPC.

Un alelo sigue sin ser identificado, es el caso del paciente NPC29, a pesar del análisis exhaustivo a nivel genómico y del cDNA. El hecho de que una mutación en *NPC1* haya sido identificada y que no se haya encontrado ninguna mutación en *NPC2*, sugiere que la mutación que falta está en el gen *NPC1*. Se observó un *splicing* anormal que provocaba la pérdida del exón 11; sin embargo, también se produjo en los individuos control, lo que indica que ello no está relacionado con la enfermedad. No se ha detectado ningún otro *splicing* aberrante, lo que descarta la presencia de una mutación intrónica profunda. La mutación (en el exón 9) y los polimorfismos en los exones 4 y 12 fueron detectados en heterocigosis, tanto a nivel genómico como de cDNA. Estos datos descartan una deleción completa del gen o una mutación en una región reguladora que impida la transcripción de un alelo del gen. Por otra parte, no se detectaron diferencias en los niveles de RNA medidos mediante PCR a tiempo real. Un reordenamiento complejo, una pequeña deleción u otra alteración podrían existir, pero es difícil entender cómo no se ha detectado mediante los análisis del DNA genómico ni del cDNA realizados.

### *Correlación genotipo-fenotipo*

Tal como describimos anteriormente, esta serie NPC muestra una gran prevalencia de la forma infantil severa (alrededor del 30%), mientras que esta presentación clínica representa el 20% de los casos en un estudio europeo (27).

Las correlaciones genotipo-fenotipo son limitadas, debido al gran número de mutaciones privadas y a que la mayoría de las muestras de los pacientes son heteroalélicas. Entre estas correlaciones, nos gustaría introducir una serie de

consideraciones referentes a algunas mutaciones. La mutación p.I1061T se ha sugerido que correlaciona con la presentación clínica juvenil (23). Por el contrario, nosotros describimos por primera vez un paciente homocigoto para la mutación p.I1061T (NPC62), quien presentó el fenotipo clínico infantil severo. Este último hecho está en desacuerdo con la conclusión anterior, según la cual un alelo p.I1061T es suficiente para excluir la forma infantil neurológica más severa (20). En este paciente, el gen *NPC1* fue secuenciado por completo y presenta el haplotipo [-, -, -, -, -, -] con respecto a los seis marcadores polimórficos p.Y129Y, p.H215R, p.M642I, p.I858V, p.N931N y p.R1266Q tal como describimos previamente para todos los cromosomas portadores de la mutación p.I1061T (10). Este paciente presentó una colestasis neonatal, pero ausencia de signos neurológicos hasta el segundo año de vida. En ese momento, el presentó retraso del desarrollo psicomotor, seguido rápidamente por la aparición de otros síntomas como ataxia, distonía y cataplejía. Los padres son consanguíneos y un hermano murió al año de vida a causa de una hepatopatía de origen desconocido.

Según los datos publicados, la presencia de la mutación p.P1007A da lugar a la forma clínica juvenil o adulta (10, 18, 21). El paciente NPC61, heterocigoto compuesto para esta mutación y con fenotipo bioquímico variante, mostró la presentación clínica sistémica neonatal de la enfermedad. Este paciente presentó hepatoesplenomegalia y colestasis en el nacimiento. Murió por insuficiencia hepática a los 6 meses de vida, antes de la aparición de los síntomas neurológicos.

En conclusión, nosotros hemos establecido el perfil mutacional de un gran número de pacientes NPC, hecho que contribuye a un mayor conocimiento de este trastorno poco común. Además, queremos hacer hincapié en la necesidad de analizar el cDNA en presencia de CHX en aquellos pacientes con un alelo no identificado después de haber realizado la búsqueda de mutaciones en el DNA genómico. Esto es esencial para detectar defectos de *splicing*, los cuales tienen relevancia (20% de los alelos mutados en este grupo) como mutaciones causantes de enfermedad.

### **Agradecimientos**

Esta investigación fue apoyada por la Fundación Niemann-Pick de España, por el Ministerio Español de Ciencia y Educación (MEC, SAF2006-12276) y el Ministerio de

Ciencia e Innovación (MICINN, SAF2009-11289) y por la Generalitat de Catalunya (SGR2005-00848 y 2009SGR-971). Los autores están agradecidos a ellos y también a todos los pacientes y a sus familias. J. M.-V. es beneficiaria de la beca Juan Girón de la Fundación Niemann-Pick de España y L. R.-P. fue beneficiaria de una beca FI de la Generalitat de Catalunya. Agradecemos también a A. Valle y L. Ozaez su asistencia técnica. El CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER) es una iniciativa del ISCIII.