

Miguel Mallén Pérez

Desarrollo y optimización de
técnicas que faciliten el
diagnóstico genético. Aplicación a
trastornos del metabolismo lipídico

Departamento
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es
POCOVI MIERAS, MIGUEL

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctora

**DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE
TÉCNICAS QUE FACILITEN EL
DIAGNÓSTICO GENÉTICO.
APLICACIÓN A TRASTORNOS DEL
METABOLISMO LIPÍDICO**

Autor

Miguel Mallén Pérez

Director/es

POCOVI MIERAS, MIGUEL

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2018

Universidad de Zaragoza
Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular y Celular



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo y optimización de técnicas que
faciliten el diagnóstico genético. Aplicación
a trastornos del metabolismo lipídico**

Miguel Mallén Pérez

2018

MIGUEL POCOVÍ MIERAS, Doctor en Ciencias Químicas, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICA:

que la memoria de Tesis Doctoral titulada “DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE TÉCNICAS QUE FACILITEN EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO. APLICACIÓN A TRASTORNOS DEL METABOLISMO LIPÍDICO”, presentada por MIGUEL MALLÉN PÉREZ, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular bajo mi dirección, y que reúne los requisitos necesarios para ser presentada por su autor para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, 22 de junio de 2018.

MIGUEL POCOVÍ MIERAS

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 El diagnóstico genético.....	3
1.1.1 Visión general.....	3
1.1.2 El genoma y la enfermedad.....	3
1.1.3 Tipos de variantes en el genoma.....	5
1.1.4 Objetivo del diagnóstico genético.....	5
1.1.5 Relación entre el genotipo y el fenotipo.....	6
1.2 Las enfermedades mendelianas como modelo de estudio.....	7
1.3 Trastornos del metabolismo lipídico.....	8
1.3.1 Hiperlipoproteinemias	8
1.3.1.1 Hipercolesterolemias autosómicas dominantes.....	8
1.3.1.1.1 Gen LDLR	9
1.3.1.1.2 Gen APOB.....	10
1.3.1.1.3 Gen PCSK9	11
1.3.1.1.4 Gen APOE.....	12
1.3.1.2 Disbetalipoproteinemia.....	13
1.3.2 Lipidosis.....	13
1.3.2.1. Enfermedad de Gaucher.....	14
1.3.2.1.1 Definición.....	14
1.3.2.1.2 Gen GBA.....	14
1.3.2.2 Enfermedad de Niemann-Pick A/B.....	16
1.3.2.2.1 Definición	16
1.3.2.2.2 Gen SMPD1	16
1.3.2.3 Enfermedad de Niemann-Pick C1/C2.....	17
1.3.2.3.1 Definición	17
1.3.2.3.2 Gen NPC1.....	17
1.3.2.3.3 Gen NPC2	19
1.4 Detalle de técnicas empleadas para el análisis de DNA.....	20
1.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	20
1.4.1.1 Introducción.....	20
1.4.1.2 Historia.....	20
1.4.1.3 Fundamento técnico general	21
1.4.1.3.1 Componentes básicos de la reacción.....	22
1.4.1.3.2 Aditivos y potenciadores.....	23

1.4.1.3.3 Esquema de la reacción	24
1.4.1.3.4 Etapas de la amplificación.....	26
1.4.1.3.5 Aspectos termodinámicos y cinéticos de la reacción.....	28
1.4.1.4 Diseño de un experimento	29
1.4.1.4.1 Determinación de la región a amplificar.....	29
1.4.1.4.2 Diseño de los cebadores.....	29
1.4.1.4.3 Condiciones químicas	31
1.4.1.4.4 Condiciones térmicas	31
1.4.1.5 Variantes.....	31
1.4.2 Secuenciación por el método de Sanger.....	33
1.4.2.1 Introducción	33
1.4.2.2 Historia	33
1.4.2.3 Fundamento técnico general.....	34
1.4.2.4 Secuenciación automática capilar.....	36
1.4.2.4.1 Componentes de la reacción.....	36
1.4.2.4.2 Esquema de la reacción.....	37
1.4.2.4.3 Electroforesis capilar	38
1.4.2.4.4 Diseño estándar de un experimento.....	40
1.4.2.4.4.1 Amplificación del material genético.....	40
1.4.2.4.4.2 Diseño del oligonucleótido cebador.....	40
1.4.2.4.4.3 Condiciones de la reacción cíclica.....	41
1.4.2.4.4.4 Condiciones de la electroforesis	41
1.4.2.4.5 Protocolo básico	41
1.4.3 Pirosecuenciación	42
1.4.3.1 Introducción	42
1.4.3.2 Historia	42
1.4.3.3 Fundamento técnico.....	43
1.4.3.3.1 Reacción enzimática.....	43
1.4.3.3.2 Determinación de la secuencia.....	47
1.4.3.4 Diseño estándar de un experimento.....	48
1.4.3.4.1 Amplificación material genético.....	48
1.4.3.4.2 Diseño de las sondas cebadoras	48
1.4.3.4.3 Orden de dispensación de los nucleótidos	49
1.4.3.4.4 Análisis e interpretación de los resultados.....	49
1.4.3.5 Protocolo básico	50
1.5 Justificación del trabajo realizado	50
2. HIPÓTESIS.....	51
3. OBJETIVOS	55

3.1 Principales.....	57
3.2 Secundarios.....	57
4. MATERIALES Y MÉTODOS	59
4.1 Preparación de reactivos.....	61
4.1.1 Disoluciones tampón de pH.....	61
4.1.1.1 TE 100X.....	61
4.1.1.2 TAE 50X.....	61
4.1.2 Tampones de carga para electroforesis.....	61
4.1.2.1 Colorante azul 10X.....	61
4.1.2.2 Colorante marrón 10X.....	61
4.1.2.3 Colorante marrón diluido 10X.....	61
4.1.3 Matrices para electroforesis.....	62
4.1.3.1 Gel de agarosa estándar 0,5%.....	62
4.1.3.2 Gel de agarosa estándar 2%.....	62
4.1.3.3 Gel de agarosa NuSieve 3%.....	62
4.1.4 Tampones para pirosecuenciación.....	62
4.1.4.1 Tampón de unión.....	62
4.1.4.2 Tampón de hibridación.....	63
4.1.4.3 Tampón de lavado.....	63
4.1.5 Disoluciones y reactivos químicos.....	63
4.1.5.1 Acetato amónico 10M.....	63
4.1.5.2 Acetato sódico 3M.....	63
4.1.5.3 Bromuro de etidio 1000X – 0,5 mg/mL.....	63
4.1.5.4 EDTA 0,5M pH 8.....	64
4.1.5.5 Suero salino 0,9%.....	64
4.1.6 Reactivos para PCR.....	64
4.1.6.1 dNTP 2mM (con dITP/dGTP 75:25).....	64
4.2 Procedimientos generales.....	65
4.2.1 Obtención material genético.....	65
4.2.1.2 Criterios de selección de muestras.....	65
4.2.1.2 Obtención de la muestra.....	65
4.2.1.3 Obtención de DNA genómico.....	65
4.2.1.3.1 A partir de sangre.....	65
4.2.1.3.2 A partir de células bucales.....	66
4.2.1.4 Determinación concentración y pureza del DNA extraído.....	67
4.2.1.4.1 Cuantificación del DNA por espectrofotometría.....	67
4.2.1.4.2 Cuantificación del DNA por fluorimetría.....	67
4.2.1.5 Purificación de DNA con fenol-cloroformo.....	67

4.2.1.6 Amplificación del DNA genómico total	68
4.2.2 Diseño protocolo y experimentos.....	68
4.2.2.1 Obtención de las secuencias genéticas	68
4.2.2.2 Obtención de las variantes descritas asociadas a cada gen	69
4.2.2.3 Amplificación por PCR de las regiones génicas a estudiar.....	69
4.2.2.3.1 Diseño de oligonucleótidos cebadores.....	69
4.2.2.3.1 Síntesis oligonucleótidos y diluciones	70
4.2.2.3.3 Puesta a punto de la amplificación por PCR.....	70
4.2.2.3.3.1 Parámetros químicos	70
4.2.2.3.3.2 Parámetros térmicos	70
4.2.2.3.3.3 Determinación experimental de la temperatura de hibridación (T_a) óptima	70
4.2.2.3.3.4 Uso de aditivos químicos	71
4.2.2.3.3.5 Enzimas termoestables utilizadas.....	71
4.2.2.3.3.6 Rediseño de oligonucleótidos cebadores	72
4.2.2.3.3.6 Comprobación de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa.....	72
4.2.2.4 Determinación de la secuencia de DNA.....	73
4.2.2.4.1 Secuenciación automática capilar.....	73
4.2.2.4.1.1 Purificación de la reacción de PCR.....	73
4.2.2.4.1.2 Reacción de secuenciación.....	74
4.2.2.4.1.2.1 Sistema CEQ/GeXP	74
4.2.2.4.1.2.2 Sistema MegaBACE.....	74
4.2.2.4.1.2.3 Optimización de la reacción.....	75
4.2.2.4.1.3 Purificación de la reacción de secuenciación	75
4.2.2.4.1.3.1 Sistema CEQ/GeXP	75
4.2.2.4.1.3.2 Sistema MegaBACE.....	76
4.2.2.4.1.4 Electroforesis capilar	76
4.2.2.4.1.4.1 Sistema CEQ/GeXP	76
4.2.2.4.1.4.2 Sistema MegaBACE.....	77
4.2.2.4.1.5 Lectura de cromatogramas	77
4.2.2.4.1.6 Detección de variantes.....	77
4.2.2.4.2 Pirosecuenciación.....	77
4.2.2.4.2.1 Diseño del experimento.....	77
4.2.2.4.2.2 Modificaciones en el protocolo de PCR para pirosecuenciación	77
4.2.2.4.2.3 Obtención de la hebra sencilla e hibridación con sonda.....	78
4.2.2.4.2.4 Reacción de pirosecuenciación.....	78
4.2.2.4.2.5 Lectura e interpretación de los pirogramas.....	78
4.2.2.5 Interpretación de los resultados	79
4.2.2.5.1 Nomenclatura de variantes.....	79

4.2.2.5.2	Determinación de la funcionalidad de las variantes.....	79
4.2.2.5.3	Variantes con la funcionalidad no determinada.....	80
4.2.2.5.3.1	Predicción bioinformática del efecto de mutaciones de cambio de aminoácido.....	80
4.2.2.5.3.2	Predicción bioinformática del efecto de mutaciones de ajuste o “splicing”	81
4.3	Procedimientos detallados por genes	82
4.3.1	Gen LDLR	82
4.3.1.1	Mutaciones y pequeños reordenamientos.....	82
4.3.1.1.1	Preparación de muestras y reactivos.....	82
4.3.1.1.2	Amplificación por PCR.....	82
4.3.1.1.3	Secuenciación.....	83
4.3.2	Gen APOB.....	84
4.3.2.1	Amplificación por PCR	84
4.3.2.2	Secuenciación	85
4.3.3	Gen APOE.....	86
4.3.3.1	Mediante secuenciación automática capilar.....	86
4.3.3.1.1	Amplificación por PCR.....	86
4.3.3.1.2	Secuenciación.....	87
4.3.3.2	Mediante pirosecuenciación	87
4.3.3.2.1	Amplificación por PCR.....	87
4.3.3.2.2	Enriquecimiento de la hebra reversa	88
4.3.3.2.3	Pirosecuenciación.....	89
4.3.4	Gen PCSK9	90
4.3.4.1	Amplificación por PCR	90
4.3.4.2	Reacción de unión.....	91
4.3.5	Gen GBA	92
4.3.5.1	Amplificación por PCR larga.....	92
4.3.5.1.1	PCR específica 6Kb	92
4.3.5.1.2	PCR 2Kb.....	93
4.3.5.2	LATE-PCR multiplex.....	94
4.3.5.3	Pirosecuenciación.....	95
4.3.6	Gen SMPD1	95
4.3.6.1	Amplificación por PCR	95
4.3.6.2	Secuenciación	96
4.3.7	Gen NPC1.....	97
4.3.7.1	Preparación de muestras y reactivos.....	97
4.3.7.2	Amplificación por PCR.....	98
4.3.7.3	Unión de fragmentos	99

4.3.7.4 Secuenciación.....	100
4.3.8 Gen NPC2	100
4.3.8.1 Amplificación multiplex PCR.....	100
4.3.8.2 Unión de fragmentos	101
4.2.8.3 Secuenciación	102
5. RESULTADOS	105
5.1 Herramientas desarrolladas.....	107
5.1.1 Calculador de volúmenes para reacciones de PCR.....	107
5.1.2 Calculador de volúmenes para reacciones de secuenciación	107
5.1.3 Calculador de tamaños de amplificación para LDLR.....	107
5.1.4 Calculador de valores termodinámicos de oligonucleótidos.....	108
5.1.5 Calculador de Tm y condiciones para reacciones de LATE-PCR.....	108
5.1.6 Simulador de pirogramas.....	108
5.1.7 Analizador de pirogramas.....	109
5.2 Análisis de dislipemias	109
5.2.1 Hipercolesterolemias autosómicas dominantes.....	109
5.2.1.1 Estrategias de diagnóstico desarrolladas	109
5.2.1.1.1 Gen LDLR.....	109
5.2.1.1.1.1 Detección de variantes puntuales y pequeños reordenamientos.....	109
5.2.1.1.1.2 Detección rápida de grandes reordenamientos	112
5.2.1.1.1.2.1 Planteamiento teórico	112
5.2.1.1.1.2.2 Prueba de concepto	114
5.2.1.1.1.2.2.1 Diseño de los cebadores.....	114
5.2.1.1.1.2.2.2 Diseño del experimento	115
5.2.1.1.1.2.2.3 Amplificación por PCR	115
5.2.1.1.1.2.2.4 Comprobación del resultado por electroforesis.....	116
5.2.1.1.2 Gen APOB	117
5.2.1.1.3 Gen APOE	118
5.2.1.1.3.1 Secuenciación	118
5.2.1.1.3.2 Pirosecuenciación	119
5.2.1.1.4 Gen PCSK9.....	123
5.2.1.2 Muestras analizadas	126
5.2.2 Disbetalipoproteinemias	128
5.2.2.1 Estrategias de diagnóstico.....	128
5.2.2.1.1 Gen APOE	128
5.2.2.2 Muestras analizadas.....	129
5.3 Análisis de lipidosis.....	130
5.3.1 Enfermedad de Gaucher	130

5.3.1.1 Estrategias de diagnóstico desarrolladas	130
5.3.1.1.1 Amplificación específica del gen GBA	130
5.3.1.1.2 Pirosecuenciación	132
5.3.1.2 Muestras analizadas	133
5.3.1.2.1 Análisis de GBA	133
5.3.1.2.2 Análisis de APOE en pacientes con EG	134
5.3.2 Enfermedad de Niemann-Pick	134
5.3.2.1 Estrategias de diagnóstico desarrolladas	134
5.3.2.1.1 Tipo A/B - Gen SMPD1	134
5.3.2.1.2 Tipo C - Genes NPC1 y NPC2	136
5.3.2.1.2.1 Desarrollo de una estrategia de amplificación para optimizar el tamaño de los productos de PCR analizados por secuenciación automática capilar	136
5.3.2.1.2.1.1 Motivación	136
5.3.2.1.2.1.2 Planteamiento teórico	136
5.3.2.1.2.1.3 Prueba de concepto	138
5.3.2.1.2.1.3.1 Esquema del experimento	138
5.3.2.1.2.1.3.2 Diseño de los cebadores iniciales	139
5.3.2.1.2.1.3.3 Diseño de los cebadores modificados y de los cebadores universales	139
5.3.2.1.2.1.3.4 Amplificación por PCR	141
5.3.2.1.2.1.3.5 Unión de los productos de PCR	142
5.3.2.1.2.1.3.6 Secuenciación	143
5.3.2.1.2.1.3.7 Ajuste de la cantidad de DNA molde inicial	145
5.3.2.1.2.2 Tipo C1 - Gen NPC1	146
5.3.2.1.2.3 Tipo C2 - Gen NPC2	151
5.3.2.2 Muestras analizadas	153
5.3.2.2.1 Análisis SMPD1	153
5.3.2.2.2 Análisis NPC1 y NPC2	155
5.4 Listado de publicaciones derivadas	156
5.4.1 Artículos publicados en revistas indexadas	156
5.4.2 Patentes derivadas de los resultados	157
6. DISCUSIÓN	159
6.1 Aspectos generales del diagnóstico genético	161
6.2 Planificación de una estrategia de diagnóstico genético	161
6.3 Análisis de las técnicas empleadas	163
6.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	163
6.3.1.1 Procesos de diseño y optimización	163

6.3.1.2 Zonas génicas a amplificar.....	163
6.3.1.3 Diseño de los oligonucleótidos cebadores.....	165
6.3.1.4 Establecimiento de las condiciones químicas.....	166
6.3.1.5 Establecimiento de las condiciones térmicas.....	166
6.3.2 Secuenciación automática capilar.....	167
6.3.2.1 Objetivos del diseño y optimización.....	167
6.4.3.2 Proceso de optimización.....	167
6.4 Protocolos desarrollados.....	168
6.4.1 Hipercolesterolemias autosómicas dominantes.....	168
6.4.1.1 Análisis del gen LDLR.....	168
6.4.1.2 Análisis del gen APOB.....	169
6.4.1.3 Análisis del gen APOE.....	169
6.4.2 Lipidosis.....	170
6.4.2.1 Análisis del gen GBA.....	170
6.4.2.2 Análisis del gen SMPD1.....	170
6.4.2.3 Análisis del gen NPC1 y NPC2.....	171
6.5 Vigencia actual de los métodos diseñados.....	171
7. CONCLUSIONES.....	173
8. BIBLIOGRAFÍA.....	176
9. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	192
9.1 Resultado del análisis de muestras de hipercolesterolemias autosómicas dominantes.....	194
9.2 Listado de mutaciones detectadas en el gen LDLR.....	197
9.3 Artículos publicados.....	200
9.4 Patentes derivadas.....	266

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El diagnóstico genético

1.1.1 Visión general

El diagnóstico genético es el procedimiento por el cual se determina la enfermedad o síndrome que explica los síntomas y signos de un individuo mediante una prueba genética. Dicha prueba identifica cambios en el genoma, cromosomas o proteínas. Frente al diagnóstico médico clásico, el diagnóstico genético presenta la ventaja de poder anticiparse a la presentación de síntomas y, en ciertos casos, gracias a este diagnóstico precoz poder prevenir o mitigar los efectos de la enfermedad.

Teniendo en cuenta el gran impacto social, económico y humano que conllevan las enfermedades, las sociedades desde sus orígenes han tratado de minimizar su impacto a través del desarrollo de la medicina (Magner 2005). Las características únicas que tiene el diagnóstico genético, junto al gran desarrollo del conocimiento sobre los procesos moleculares y celulares de los organismos, permiten avanzar sustancialmente en el conocimiento y gestión de las enfermedades.

Tradicionalmente la aplicación de la genética y del diagnóstico genético a la medicina ha sido considerada desde un punto de vista mendeliano, con enfermedades hereditarias habitualmente poco comunes y normalmente ligadas a un solo gen. Sin embargo es cada vez más evidente que la práctica totalidad de enfermedades o síndromes, excluyendo los causados por traumatismos o lesiones externas, tiene en mayor o menor medida un componente genético, normalmente multifactorial. Incluso en el caso de las enfermedades originadas por factores externos, es decir: infecciones víricas o bacterianas, condiciones físicas, malnutrición y exposición a sustancias químicas hay variabilidad en la adquisición, desarrollo y respuesta al tratamiento de la misma entre individuos dependiendo de su perfil genético (Scriver et al. 2001; Lewis 2009). Así pues, la determinación precisa de la información genética que posee un individuo tiene un gran interés y sin duda resultará fundamental para la medicina del futuro.

1.1.2 El genoma y la enfermedad

El cuerpo humano es un sistema fisicoquímico de elevada complejidad. Desde el nivel celular, pasando por el tisular y el orgánico, hay miles de reacciones químicas simultáneas –muchas de ellas acopladas–, interacciones entre biomoléculas y procesos de transporte. Todo esto permite la existencia de una gran variedad de rutas metabólicas de síntesis y degradación de biomoléculas y estructuras, y de una

distribución compartimentada de biomoléculas por el organismo. Para un correcto funcionamiento del organismo debe haber un equilibrio entre todos los procesos que permita mantener la homeostasis, lo cual se consigue mediante una gran cantidad de sistemas regulatorios.

Toda la información necesaria para la generación de las biomoléculas que llevan a cabo estos procesos está contenida en el genoma, que a su vez también posee un grado muy elevado de regulación en su expresión dependiendo de las interacciones con el entorno y el estado en el que se encuentre la célula, el tejido, el órgano y el organismo.

El genoma humano es un polímero de ácido desoxirribonucleico (DNA), constituido por unos tres mil millones de pares de bases ([International Human Genome Sequencing Consortium 2001, 2004](#)) y que se agrupa, en su punto de máxima condensación durante la mitosis, en 23 pares de cromosomas (dos de ellos ligados al sexo) ([Tjio y Levan 1956](#)). Según la referencia ensamblada más reciente (GRCh38.p12 ([Zerbino et al. 2018](#))) contiene 20 376 genes codificantes de proteínas, 14 692 pseudogenes y 22 305 genes no codificantes. Por diversas causas, el genoma va acumulando variantes en su secuencia a lo largo de su transmisión de generación en generación. El efecto que pueden tener estas variantes es diverso dependiendo de su naturaleza y su localización en el genoma. Desde el punto de vista de la relación con la enfermedad, se pueden considerar cuatro situaciones:

1. La variante no tiene efecto aparente sobre la normalidad funcional o estructural del organismo
2. La variante puede afectar levemente a una o varias rutas metabólicas, estructuras o procesos, sin ser causa suficiente de enfermedad por sí misma pero creando una susceptibilidad mayor a ella en función de la interacción con el ambiente.
3. La variante puede afectar levemente a una o varias rutas metabólicas, estructuras o procesos y, en conjunción a otras variantes similares existentes en otros genes, dar lugar al desarrollo de la enfermedad. Este tipo correspondería a enfermedades de origen poligénico y, como norma general, estarían moderadamente influidas por la interacción con el ambiente.
4. La variante afecta sustancialmente a una o varias rutas metabólicas, estructuras o procesos, dando lugar por sí misma al desarrollo de la enfermedad. Este tipo correspondería a enfermedades monogénicas, con patrón de herencia mendeliano y, en general, poco influidas por la interacción con el ambiente.



1.1.3 Tipos de variantes en el genoma

Por su naturaleza, las variantes presentes en el genoma pueden clasificarse en:

1. Variantes puntuales, en las que simplemente se sustituye una base de la secuencia por otra.
2. Variantes estructurales pequeñas, incluyendo pequeñas deleciones, inserciones, repeticiones o duplicaciones, en las que se produce la eliminación, inserción o repetición de una o más bases.
3. Variantes estructurales grandes o grandes reordenamientos, en las que grandes bloques de cientos o miles de bases se eliminan, insertan o duplican en la secuencia.
4. Reorganizaciones cromosómicas, en las que porciones completas de cromosomas sufren translocaciones.
5. Factores epigenéticos, como estados de metilación o modificación de histonas, en los que se ve afectada la expresión sin existir cambios en la secuencia.

La detección de estas variantes y la determinación del efecto que generan en el organismo es la motivación para el desarrollo del diagnóstico genético.

1.1.4 Objetivo del diagnóstico genético

El objetivo del diagnóstico genético es localizar e identificar algún componente específico –variantes en genoma, cromosomas o proteínas– que indique si un individuo tiene o va a desarrollar algún desorden particular, o dicho de otra

manera, la relación existente entre el material genético de un individuo (genotipo) y sus características o rasgos observables (fenotipo), sin olvidar la influencia que pueda tener el ambiente en esta relación.

1.1.5 Relación entre el genotipo y el fenotipo

Desde el punto de vista del diagnóstico genético, la búsqueda de la relación entre el genotipo y el fenotipo puede abordarse de manera diferente dependiendo de lo que se quiera determinar en función de lo que ya se conoce. Así pues, se pueden considerar dos perspectivas diferentes:

- La determinación del genotipo a partir de información del fenotipo, que se considera cuando, partiendo desde unas características fenotípicas conocidas y bien definidas, se intenta determinar el genotipo que las origina. En la práctica esto se podría asimilar con la determinación de las bases moleculares de una enfermedad, característica o condición, mediante la localización de las variaciones en el material genético cuya alteración está directamente relacionada con ese fenotipo.
- La determinación del fenotipo a partir de información del genotipo, que se considera cuando, partiendo desde la información del genotipo que se obtiene de un análisis genético, se intenta determinar el fenotipo asociado. Evidentemente para poder realizar esto es necesario que previamente se haya descrito la relación entre determinadas variantes en el material genético (normalmente reordenamientos cromosómicos o variantes en uno o varios genes) y una determinada enfermedad, característica o condición. Con la relación definida, se intenta asociar la información del genotipo obtenida con la presentación fenotípica resultante, e incluso lo que puede resultar más interesante, relacionar diferentes genotipos con diferentes presentaciones fenotípicas de una misma enfermedad. En la práctica esto se podría asimilar al concepto clásico de prueba genética con valor diagnóstico y pronóstico.

Como puede intuirse, cada una de estas perspectivas tiene un objetivo diferente que plantea problemas y retos distintos que a su vez requieren estrategias y herramientas diferentes para poder ser abordados y resueltos.

Sin embargo, ambas están fundamentadas en nuestro conocimiento sobre el funcionamiento de los organismos vivos, sobre cómo determinar la estructura y secuencia del material genético –especialmente DNA– y sobre cómo fluye la información genética en los seres vivos hasta su expresión fenotípica. Un

conocimiento lo más amplio y profundo posible de estos temas es imprescindible y fundamental para poder entender la relación genotipo-fenotipo y poder avanzar en la efectividad y capacidad de los diagnósticos genéticos en la aplicación clínica.

1.2 Las enfermedades mendelianas como modelo de estudio

El desarrollo técnico de las herramientas de secuenciación ha contribuido enormemente al estudio de las variantes del genoma a nivel global, dando cada vez una mayor consideración a los trastornos poligénicos con características complejas y globales debido a su mayor prevalencia sobre los trastornos monogénicos (Boyle et al. 2017). Sin embargo, al resultar mucho más compleja la relación genotipo-fenotipo en los trastornos poligénicos que en los monogénicos, la interpretación clínica de los resultados es en consecuencia también más compleja

Las enfermedades monogénicas hereditarias –o mendelianas– han supuesto como modelo de estudio una pieza fundamental para la comprensión de las relaciones genotipo-fenotipo, la dilucidación de los mecanismos moleculares y regulatorios de distintos procesos, y el desarrollo de herramientas de diagnóstico efectivas (Antonarakis y Beckmann 2006). De manera adicional, la continuación del estudio de las enfermedades mendelianas puede seguir contribuyendo de manera muy importante a la comprensión de la etiología de las enfermedades complejas o poligénicas (Spataro et al. 2017).

Las enfermedades metabólicas hereditarias son uno de los mejores ejemplos por todo el desarrollo de conocimiento derivado –molecular, clínico y analítico– que se ha obtenido a partir de su estudio (Scriver et al. 2001). Dentro de estas, son de especial interés las alteraciones del metabolismo lipídico, en particular las hipercolesterolemias autosómicas dominantes y las lipidosis.

Elegimos las hipercolesterolemias autosómicas dominantes para su estudio por la gran importancia que tiene el colesterol como biomolécula para el funcionamiento del organismo, la alta prevalencia que tienen los trastornos de su metabolismo en población general y el impacto en la salud general asociado. Adicionalmente, la existencia de tratamientos que cuanto antes se suministran más efectivos resultan (Goldstein y Brown 2015) hace que el diagnóstico genético temprano, incluso antes de la aparición de síntomas, sea fundamental.

Elegimos las lipidosis por ser uno de los grupos de enfermedades más frecuentes de las llamadas *enfermedades raras* y por la gran importancia que tienen las vías de metabolismo lisosoma para el funcionamiento celular correcto. Dentro de estas, se eligen la enfermedad de Gaucher (EG) y la enfermedad de Niemann-Pick (NP) por

ser las primeras lipodosis descubiertas y estudiadas, por estar muy relacionadas con alteraciones en el metabolismo de lipoproteínas, y adicionalmente por ser la EG la enfermedad rara más frecuente en población general. El diagnóstico genético es fundamental en estas enfermedades para obtener un diagnóstico rápido y preciso que además puede ayudar a elegir las opciones terapéuticas más adecuadas.

1.3 Trastornos del metabolismo lipídico

1.3.1 Hiperlipoproteinemias

Las hiperlipoproteinemias son un grupo de trastornos asociados a unos niveles plasmáticos elevados de lípidos o lipoproteínas. Son las dislipemias más frecuentes en población general y están relacionadas con diferentes enfermedades cardiovasculares. Se clasifican según el tipo de lipoproteína que se encuentra elevado (Fredrickson y Lees 1965).

1.3.1.1 Hipercolesterolemias autosómicas dominantes

Las hipercolesterolemias autosómicas dominantes (HAD, OMIM 143890) son uno de los trastornos hereditarios del metabolismo más frecuente, con prevalencias estimadas de hasta 1:250 en población general. Están asociadas a niveles plasmáticos elevados de colesterol transportado en lipoproteínas de baja densidad (LDLc) que originan xantomas, xantelasmas y depósitos vasculares, que a su vez conducen a una aterosclerosis progresiva y prematura y a enfermedad cardiovascular (Goldstein et al. 2014).

Las HAD está relacionada con mutaciones en varios genes implicados en la captación hepática y retirada de la circulación de partículas LDL por la vía del receptor de lipoproteínas de baja densidad. El principal gen implicado es LDLR (que codifica el receptor de LDL) y en menor medida APOB (que codifica la apolipoproteína B, ligando del receptor LDL), PCSK9 (que codifica una serín proteasa que se une al receptor LDL y promueve su degradación intracelular) y APOE (que codifica la apolipoproteína E).

Existen tratamientos efectivos que permiten retrasar, e incluso prevenir, la aparición de enfermedad cardiovascular (Defesche et al. 2017). Debido a que estos resultan más efectivos cuanto antes empiezan a aplicarse (Goldstein y Brown 2015) es fundamental un diagnóstico temprano, para lo cual el diagnóstico genético supone una herramienta de mucha utilidad.

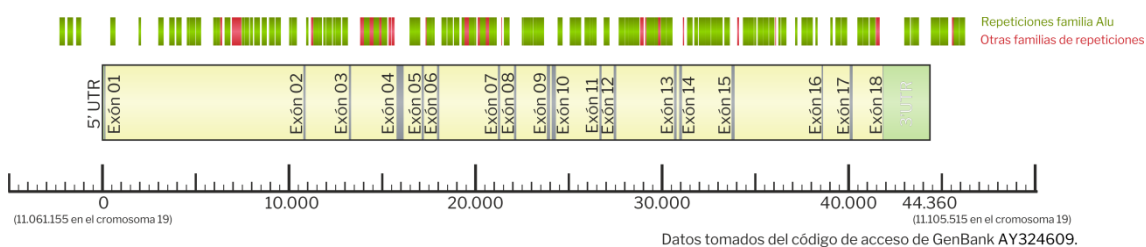
1.3.1.1.1 Gen LDLR

El gen LDLR (Ensembl ENSG00000130164, RefSeqGene NG_009060.1) es el principal gen asociado a la HAD y codifica el receptor de lipoproteínas de baja densidad. La mayoría de pacientes con un diagnóstico genético positivo tienen mutaciones en este gen.

Está situado en el cromosoma 19 (localización citogenética 19p13.2), tiene 18 exones y se expande 44,5 Kb. Tiene un cDNA de 5292 b, siendo codificantes 2580 b (NM_000527.4) que generan una proteína de 860 aa que incluye un péptido señal de 21 aa (NP_000518.1).

Tiene un alto contenido en G+C y elementos repetitivos (especialmente de la familia ALU). Se han descrito cerca de 2000 mutaciones a lo largo de todo el gen, incluyendo cambios de nucleótido, pequeños y grandes reordenamientos (Leigh et al. 2017).

La estructura del gen se detalla a continuación



El tamaño y localización de los exones e intrones es el siguiente

LDLR	Inicio	Final	Tamaño
Exón 1	1	254	254 pb
Exón 1 cod	188	254	67 pb
Intrón 1	255	10 861	10 607 pb
Exón 2	10 862	10 984	123 pb
Intrón 2	10 985	13 302	2318 pb
Exón 3	13 303	13 425	123 pb
Intrón 3	13 426	15 858	2433 pb
Exón 4	15 859	16 239	381 pb
Intrón 4	16 240	17 203	964 pb
Exón 5	17 204	17 326	123 pb
Intrón 5	17 327	18 030	704 pb
Exón 6	18 031	18 153	123 pb
Intrón 6	18 154	21 290	3137 pb
Exón 7	21 291	21 410	120 pb
Intrón 7	21 411	22 152	742 pb
Exón 8	22 153	22 278	126 pb

LDLR	Inicio	Final	Tamaño
Intrón 8	22 279	23 916	1638 pb
Exón 9	23 917	24 088	172 pb
Intrón 9	24 089	24 173	85 pb
Exón 10	24 174	24 401	228 pb
Intrón 10	24 402	26 732	2331 pb
Exón 11	26 733	26 851	119 pb
Intrón 11	26 852	27 497	646 pb
Exón 12	27 498	27 637	140 pb
Intrón 12	27 638	30 730	3093 pb
Exón 13	30 731	30 872	142 pb
Intrón 13	30 873	31 008	136 pb
Exón 14	31 009	31 161	153 pb
Intrón 14	31 162	33 812	2651 pb
Exón 15	33 813	33 983	171 pb
Intrón 15	33 984	38 646	4663 pb
Exón 16	38 647	38 724	78 pb
Intrón 16	38 725	40 151	1427 pb
Exón 17	40 152	40 309	158 pb
Intrón 17	40 310	41 919	1610 pb
Exón 18 cod	41 920	41 955	36 pb
Exón 18	41 920	44 469	2550 pb

1.3.1.1.2 Gen APOB

El gen APOB (Ensembl ENSG00000084674, RefSeqGene NG_011793.1) codifica la apolipoproteína B, que forma parte de diversas lipoproteínas y es ligando del receptor LDL. De manera aproximada, el 5% de pacientes con un diagnóstico genético positivo tienen mutaciones en este gen.

Cerca del 95% de las mutaciones patogénicas en este gen corresponden a la variante p.Arg3527Gln (APOB3500, R3500Q), situada en el exón 26.

El tamaño y localización de los exones e intrones es el siguiente

APOB	Inicio	Final	Tamaño
Exón 1	1	210	210 pb
Exón 1 cod	129	210	82 pb
Intrón 1	211	522	312 pb
Exón 2	523	561	39 pb
Intrón 2	562	1597	1036 pb
Exón 3	1598	1713	116 pb
Intrón 3	1714	2990	1277 pb

APOB	Inicio	Final	Tamaño
Exón 4	2991	3136	146 pb
Intrón 4	3137	5962	2826 pb
Exón 5	5963	6116	154 pb
Intrón 5	6117	6818	702 pb
Exón 6	6819	6974	156 pb
Intrón 6	6975	8365	1391 pb
Exón 7	8366	8490	125 pb

APOB	Inicio	Final	Tamaño
Intrón 7	8491	9172	682 pb
Exón 8	9173	9258	86 pb
Intrón 8	9259	10 555	1297 pb
Exón 9	10 556	10 775	220 pb
Intrón 9	10 776	11 492	717 pb
Exón 10	11 493	11 720	228 pb
Intrón 10	11 721	14 058	2338 pb
Exón 11	14 059	14 176	118 pb
Intrón 11	14 177	14 288	112 pb
Exón 12	14 289	14 435	147 pb
Intrón 12	14 436	15 535	1100 pb
Exón 13	15 536	15 747	212 pb
Intrón 13	15 748	16 008	261 pb
Exón 14	16 009	16 246	238 pb
Intrón 14	16 247	17 109	863 pb
Exón 15	17 110	17 286	177 pb
Intrón 15	17 287	18 949	1663 pb
Exón 16	18 950	19 141	192 pb
Intrón 16	19 142	20 381	1240 pb
Exón 17	20 382	20 549	168 pb
Intrón 17	20 550	21 031	482 pb
Exón 18	21 032	21 243	212 pb
Intrón 18	21 244	24 168	2925 pb

APOB	Inicio	Final	Tamaño
Exón 19	24 169	24 351	183 pb
Intrón 19	24 352	24 960	609 pb
Exón 20	24 961	25 082	122 pb
Intrón 20	25 083	27 424	2342 pb
Exón 21	27 425	27 635	211 pb
Intrón 21	27 636	28 528	893 pb
Exón 22	28 529	28 704	176 pb
Intrón 22	28 705	28 813	109 pb
Exón 23	28 814	29 001	188 pb
Intrón 23	29 002	29 480	479 pb
Exón 24	29 481	29 626	146 pb
Intrón 24	29 627	30 540	914 pb
Exón 25	30 541	30 914	374 pb
Intrón 25	30 915	31 422	508 pb
Exón 26	31 423	38 994	7572 pb
Intrón 26	38 995	39 398	404 pb
Exón 27	39 399	39 513	115 pb
Intrón 27	39 514	39 621	108 pb
Exón 28	39 622	39 805	184 pb
Intrón 28	39 806	40 739	934 pb
Exón 29 cod	40 740	42 344	1605 pb
Exón 29	40 740	42 645	1906 pb

1.3.1.1.3 Gen PCSK9

El gen PCSK9 (Ensembl ENSG00000169174, RefSeqGene NG_009061.1) codifica la proteína convertasa subtilisina kexina tipo 9, proteasa encargada de la captación y degradación intracelular del receptor LDL. De manera aproximada, menos del 1% de pacientes con un diagnóstico genético positivo tienen mutaciones en este gen.

Está situado en el cromosoma 1 (localización citogenética 1p32.3), tiene 13 exones y se expande 25,4 Kb. Tiene un cDNA de 3731 b, siendo codificantes 2076 b (NM_174936.3) que generan una proteína de 692 aa que incluye un péptido señal de 30 aa (NP_777596.2).

El tamaño y localización de los exones e intrones es el siguiente

PCSK9	Inicio	Final	Tamaño
Exón 1 completo	1	497	497 pb
Exón 1 parte codificante	291	497	207 pb
Intrón 1	498	4295	3798 pb

PCSK9	Inicio	Final	Tamaño
Exón 2	4296	4487	192 pb
Intrón 2	4488	6975	2488 pb
Exón 3	6976	7099	124 pb
Intrón 3	7100	12 730	5631 pb
Exón 4	12 731	12 864	134 pb
Intrón 4	12 865	13 102	238 pb
Exón 5	13 103	13 244	142 pb
Intrón 5	13 245	16 445	3201 pb
Exón 6	16 446	16 642	197 pb
Intrón 6	16 643	17 783	1141 pb
Exón 7	17 784	17 967	184 pb
Intrón 7	17 968	18 488	521 pb
Exón 8	18 489	18 662	174 pb
Intrón 8	18 663	18 951	289 pb
Exón 9	18 952	19 100	149 pb
Intrón 9	19 101	19 938	838 pb
Exón 10	19 939	20 116	178 pb
Intrón 10	20 117	21 827	1711 pb
Exón 11	21 828	22 009	182 pb
Intrón 11	22 010	23 821	1812 pb
Exón 12 codificante	23 822	24 037	216 pb
Exón 12	23 822	25 305	1484 pb

1.3.1.1.4 Gen APOE

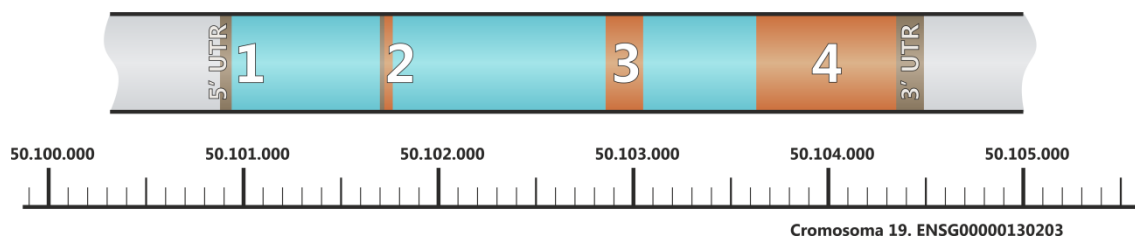
El gen APOE (Ensembl ENSG00000130203, RefSeqGene NG_007084.2) codifica la apolipoproteína E, que forma parte de diversas lipoproteínas y está implicada en la retirada de remanentes de lipoproteínas de muy baja densidad y quilomicrones al ser el ligando de distintos receptores.

Tiene tres isoformas principales E2, E3 y E4, caracterizadas por los aminoácidos situados en posición 130 y 176 del péptido expresado (E2: cisteína/cisteína; E3: cisteína/arginina; E4: arginina/arginina).

Está situado en el cromosoma 19 (localización citogenética 19q13.32), tiene 4 exones y se expande 3,6 Kb. Tiene un cDNA de 1234 b, siendo codificantes 2076 b (NM_000041.3) que generan una proteína de 317 aa que incluye un péptido señal de 19 aa (NP_000032.1).

Recientemente se ha descrito la asociación de la mutación p.Leu167del con la HAD (Marduel et al. 2013; Cenarro et al. 2016).

La estructura del gen se detalla a continuación



El tamaño y localización de los exones e intrones es el siguiente

APOE	Inicio	Final	Tamaño
Exón 1	1	88	88 pb
Intrón 1	89	848	760 pb
Exón 2	849	914	66 pb
Intrón 2	915	2006	1092 pb
Exón 3	2007	2199	193 pb
Intrón 3	2200	2779	580 pb
Exón 4	2780	3640	861 pb

1.3.1.2 Disbetalipoproteinemia

La disbetalipoproteinemia o hiperlipoproteinemia tipo III (OMIM 617347) es un trastorno caracterizado por la acumulación de remanentes de lipoproteínas ricas en triglicéridos, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y quilomicrones (QM), y que originan xantomatosis y enfermedad coronaria prematura o enfermedad vascular periférica.

Está asociada a variantes genéticas disfuncionales de la apolipoproteína E que provocan una retirada plasmática deficiente de QM y VLDL, especialmente la isoforma E2 (p.Arg176Cys) con presentación homocigota y la variante E2-Christchurch (p.Arg154Ser) autosómica dominante con baja penetrancia (Civeira et al. 1996; Pocovi et al. 1996).

1.3.2 Lipidosis

Las lipidosis, o enfermedades de depósito lipídico, son trastornos metabólicos hereditarios en los que el funcionamiento defectuoso de una hidrolasa o de una proteína auxiliar causa que no se degraden con normalidad en el interior celular ciertos sustratos lipídicos. Esta disfunción causa la acumulación de dichos sustratos en el interior celular, específicamente en los lisosomas y otras estructuras membranosas relacionadas (Schulze y Sandhoff 2011).

1.3.2.1. Enfermedad de Gaucher

1.3.2.1.1 Definición

La enfermedad de Gaucher (EG) (OMIM 230800, 230900, 231000, 231005, 608013) es la enfermedad de depósito lisosomal más frecuente y está causada por una actividad insuficiente de la enzima glucosilceramidasa lisosomal (β -glucosidasa ácida [EC 3.2.1.45]) y la acumulación resultante de glucosilceramida principalmente y de otros glucoesfingolípidos en el interior del lisosoma. El proceso de acumulación de glucosilceramida es progresivo y ocurre principalmente en los lisosomas de macrófagos de huesos, médula ósea, hígado y bazo (Rosenbloom y Weinreb 2013) y que adquieren un aspecto espumoso recibiendo el nombre de *células de Gaucher*. De manera secundaria también se produce el acúmulo de otros sustratos, como la glucoesfingosina (Dekker et al. 2011) y el gangliósido GM3 (Ghauharali-van der Vlugt et al. 2008), y además en tipos celulares diferentes (Mistry et al. 2010).

Tradicionalmente se han considerado tres categorías fenotípicas en función de la edad de aparición de la enfermedad, los síntomas clínicos y la presencia y tasa de progresión (tipos 2 y 3) o ausencia (tipo 1) de afectación neurológica (Beutler y Grabowski 2001).

El déficit de la glucosilceramidasa lisosomal está causado por mutaciones en su gen codificante GBA (OMIM 606463) y tiene un patrón de herencia autosómico recesivo. Se han descrito más de 300 mutaciones distintas a lo largo del gen, aunque es especialmente prevalente la mutación p.Asn409Ser (N370S) asociada al tipo 1 de la enfermedad y en menor medida p.Leu483Pro (L444P) asociada con las variantes neuronopáticas (Grabowski et al. 2014).

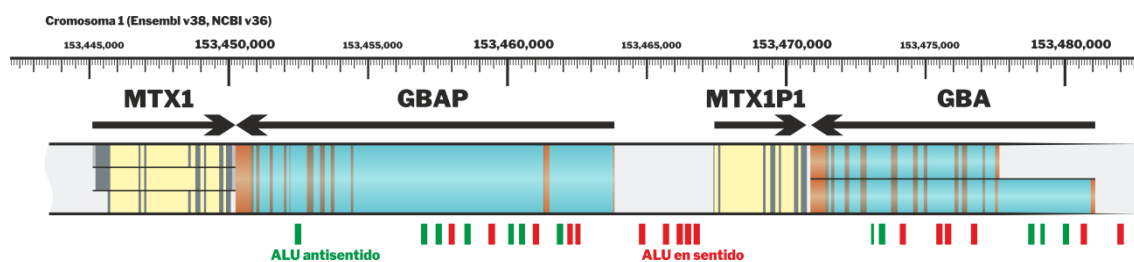
1.3.2.1.2 Gen GBA

El gen GBA (Ensembl ENSG00000177628, RefSeqGene NG_009783.1) codifica la glucosilceramidasa lisosomal, que hidroliza el enlace glucosídico de la glucosilceramida y glucoesfingosina rindiendo ceramida y esfingosina respectivamente.

Está situado en el cromosoma 1 (localización citogenética 1q22), tiene 11 exones codificantes y se expande 6,8 Kb. Tiene un cDNA de 2276 b, siendo codificantes 1608 b (NM_000157.3) que generan una proteína de 536 aa que incluye un péptido señal de 39 aa (NP_000148.2). Se encuentra adyacente al pseudogen MTX1P1 (pseudogen de MTX1), formando junto a este un bloque de alta homología con otro bloque que está situado a pocas kilobases formado por el gen MTX1 y el

pseudogen GBAP (pseudogen de GBA)(Horowitz et al. 1989; Long et al. 1996; Winfield et al. 1997).

La estructura del gen, incluyendo su entorno, se detalla a continuación



El tamaño y localización de los exones e intrones es el siguiente

GBA	Inicio	Final	Tamaño
Exón 01	1	149	149 pb
Intrón 01	150	517	368 pb
Exón 02	518	605	88 pb
Intrón 02	606	1157	552 pb
Exón 03	1158	1349	192 pb
Intrón 03	1350	1472	123 pb
Exón 04	1473	1619	147 pb
Intrón 04	1620	2584	965 pb
Exón 05	2585	2718	134 pb
Intrón 05	2719	2928	210 pb
Exón 06	2929	3101	173 pb
Intrón 06	3102	3656	555 pb
Exón 07	3657	3894	238 pb
Intrón 07	3895	4765	871 pb
Exón 08	4766	4990	225 pb
Intrón 08	4991	5390	400 pb
Exón 09	5391	5554	164 pb
Intrón 09	5555	5923	369 pb
Exón 10	5924	6040	117 pb
Intrón 10	6041	6134	94 pb
Exón 11cod	6135	6240	106 pb
Exón 11	6135	6783	649 pb

1.3.2.2 Enfermedad de Niemann-Pick A/B

1.3.2.2.1 Definición

Los tipos A y B de la enfermedad de Niemann-Pick (OMIM 257200 y 607616) son enfermedades de depósito lisosomal causados por la actividad deficitaria de la esfingomielinasa ácida (ASM; EC 3.1.4.12) y la acumulación intracelular de esfingomielina (Schuchman y Desnick 2014).

El tipo A está asociado a niveles de actividad residual enzimática muy bajos o incluso nulos, lo que provoca un curso grave de la enfermedad con fallos en el desarrollo, hepatoesplenomegalias y rápida neurodegeneración que causan la muerte antes de los 3 años de vida.

Por otra parte, el tipo B está asociado a niveles de actividad residual enzimática ligeramente más elevados, lo que causa una presentación fenotípica muy variada – que oscila desde afectaciones graves con mortalidad infantil hasta presentaciones asintomáticas con supervivencia hasta la adultez– y que suele incluir hepatoesplenomegalias, poca o ninguna afectación del sistema nervioso central y afectación pulmonar.

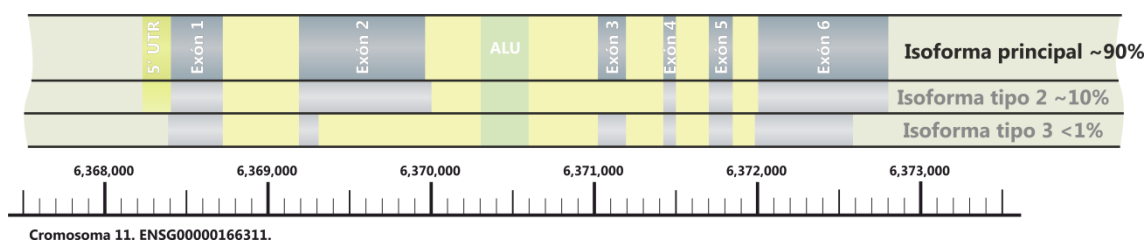
La actividad deficitaria de la ASM está causada por mutaciones en su gen codificante SMPD1 (OMIM 607608) y tiene un patrón de herencia autosómico recesivo. Se han descrito algo más de 180 mutaciones distintas distribuidas a lo largo de todo el gen (Zampieri et al. 2016).

1.3.2.2.2 Gen SMPD1

El gen SMPD1 (Ensembl ENSG00000166311, RefSeqGene NG_011780.1) codifica la esfingomielinasa ácida (esfingomielina fosfodiesterasa 1) que cataliza la conversión de esfingomielina en ceramida y fosforilcolina.

Está situado en el cromosoma 11 (localización citogenética 11p15.4), tiene 6 exones y se expande 4,6 Kb. Tiene un cDNA de 2482 b, siendo codificantes 1893 b (NM_000543.4) que generan una proteína de 631 aa que incluye un péptido señal de 46 aa (NP_000534.3).

La estructura del gen se detalla a continuación



El tamaño y localización de los exones e intrones es el siguiente

SMPD1	Inicio	Final	Tamaño
Exón 1	1	486	486 pb
Exón 1 cod	169	486	318 pb
Intrón 1	487	953	467 pb
Exón 2	954	1726	773 pb
Intrón 2	1727	2785	1059 pb
Exón 3	2786	2957	172 pb
Intrón 3	2958	3186	229 pb
Exón 4	3187	3263	77 pb
Intrón 4	3264	3465	202 pb
Exón 5	3466	3611	146 pb
Intrón 5	3612	3767	156 pb
Exón 6 cod	3768	4177	410 pb
Exón 6	3768	4565	798 pb

1.3.2.3 Enfermedad de Niemann-Pick C1/C2

1.3.2.3.1 Definición

La enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC) (OMIM 257220, 607625) es un trastorno neurovisceral hereditario y poco común. Está caracterizada por una presentación extremadamente heterogénea de síntomas viscerales, psiquiátricos y neurológicos que suelen concluir con una muerte prematura.

Está causada por mutaciones en el gen NPC1 (OMIM 607623) o en NPC2 (601015), con un patrón de herencia autosómico recesivo, que están asociadas a un transporte defectuoso de colesterol y otros lípidos en el interior celular. Este fallo en el transporte lipídico intracelular provoca la acumulación de diversos lípidos en el interior lisosomal y otras estructuras relacionadas y una disminución de la actividad de la esfingomielinasa ácida lisosomal (Vanier 2010; Patterson et al. 2014).

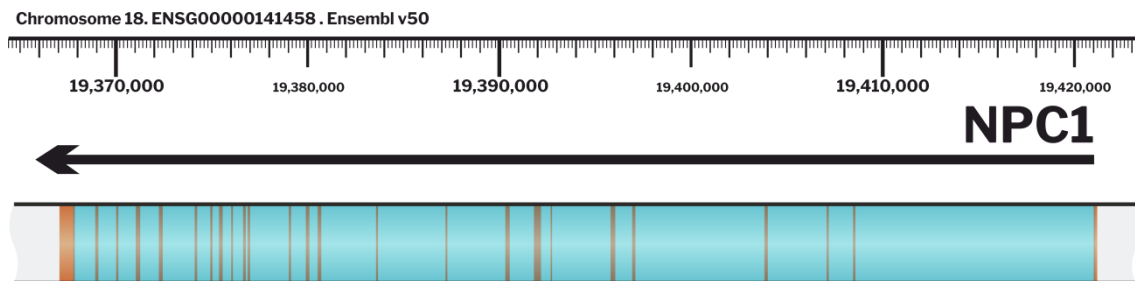
1.3.2.3.2 Gen NPC1

El gen NPC1 (Ensembl ENSG00000141458, RefSeqGene NG_012795.1) codifica el transportador intracelular de colesterol NPC 1.

Está situado en el cromosoma 18 (localización citogenética 18q11.2), tiene 25 exones y se expande 55,1 Kb. Tiene un cDNA de 4827 b, siendo codificantes 3834 b (NM_000271.4) que generan una proteína de 1278 aa que incluye un péptido señal

de 22 aa (NP_000262.2). Las mutaciones en NPC1 suponen el 95% de los casos de pacientes con diagnóstico genético de NPC (Patterson et al. 2014).

La estructura del gen se detalla a continuación



El tamaño y localización de los exones e intrones es el siguiente

NPC1	Inicio	Final	Tamaño
Exón 1	1	178	178 pb
Exón 1 cod	122	178	57 pb
Intrón 1	179	12 612	12 434 pb
Exón 2	12 613	12 735	123 pb
Intrón 2	12 736	14 004	1269 pb
Exón 3	14 005	14 111	107 pb
Intrón 3	14 112	17 181	3070 pb
Exón 4	17 182	17 357	176 pb
Intrón 4	17 358	24 089	6732 pb
Exón 5	24 090	24 257	168 pb
Intrón 5	24 258	25 137	880 pb
Exón 6	25 138	25 387	250 pb
Intrón 6	25 388	28 435	3048 pb
Exón 7	28 436	28 509	74 pb
Intrón 7	28 510	29 012	503 pb
Exón 8	29 013	29 383	371 pb
Intrón 8	29 384	30 646	1263 pb
Exón 9	30 647	30 873	227 pb
Intrón 9	30 874	33 896	3023 pb
Exón 10	33 897	33 997	101 pb
Intrón 10	33 998	37 515	3518 pb
Exón 11	37 516	37 618	103 pb
Intrón 11	37 619	40 474	2856 pb
Exón 12	40 475	40 664	190 pb
Intrón 12	40 665	41 097	433 pb
Exón 13	41 098	41 280	183 pb

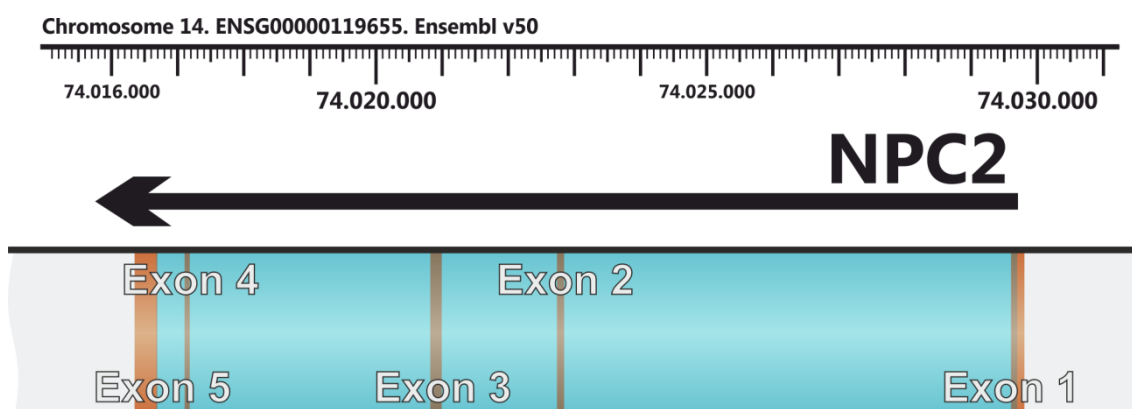
NPC1	Inicio	Final	Tamaño
Intrón 13	41 281	42 053	773 pb
Exón 14	42 054	42 168	115 pb
Intrón 14	42 169	44 187	2019 pb
Exón 15	44 188	44 315	128 pb
Intrón 15	44 316	44 412	97 pb
Exón 16	44 413	44 553	141 pb
Intrón 16	44 554	45 083	530 pb
Exón 17	45 084	45 173	90 pb
Intrón 17	45 174	45 618	445 pb
Exón 18	45 619	45 809	191 pb
Intrón 18	45 810	46 149	340 pb
Exón 19	46 150	46 265	116 pb
Intrón 19	46 266	46 948	683 pb
Exón 20	46 949	47 078	130 pb
Intrón 20	47 079	48 743	1665 pb
Exón 21	48 744	48 947	204 pb
Intrón 21	48 948	49 919	972 pb
Exón 22	49 920	50 151	232 pb
Intrón 22	50 152	51 060	909 pb
Exón 23	51 061	51 174	114 pb
Intrón 23	51 175	52 101	927 pb
Exón 24	52 102	52 264	163 pb
Intrón 24	52 265	53 334	1070 pb
Exón 25 cod	53 335	53 417	83 pb
Exón 25	53 335	54 130	796 pb

1.3.2.3.3 Gen NPC2

El gen NPC2 (Ensembl ENSG00000119655, RefSeqGene NG_007117.1) codifica el transportador intracelular de colesterol NPC 2.

Está situado en el cromosoma 14 (localización citogenética 14q24.3), tiene 5 exones y se expande 13,58 Kb. Tiene un cDNA de 1033 b, siendo codificantes 453 b (NM_006432.4) que generan una proteína de 151 aa que incluye un péptido señal de 19 aa (NP_006423.1). Las mutaciones en NPC2 suponen el 5% de los casos de pacientes con diagnóstico genético de NPC (Patterson et al. 2014).

La estructura del gen se detalla a continuación



El tamaño y localización de los exones e intrones es el siguiente

NPC2	Inicio	Final	Tamaño
Exón 1 completo	1	320	320 pb
Exón 1 codificante	239	320	82 pb
Intrón 1	321	7076	6756 pb
Exón 2	7077	7184	108 pb
Intrón 2	7185	8925	1741 pb
Exón 3	8926	9098	173 pb
Intrón 3	9099	12 733	3635 pb
Exón 4	12 734	12 811	78 pb
Intrón 4	12 812	13 224	413 pb
Exón 5 codificante	13 225	13 239	15 pb
Exón 5 completo	13 225	13 580	356 pb

1.4 Detalle de técnicas empleadas para el análisis de DNA

1.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

1.4.1.1 Introducción

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular que, mediante la acción de la DNA polimerasa y dos cebadores específicos, permite amplificar en varios órdenes de magnitud el número de copias de una secuencia determinada de DNA. Es una técnica tan potente y versátil –a la vez que razonablemente sencilla y barata– que su creación supuso un punto de inflexión en la biología molecular. Es la técnica de biología molecular más usada y una técnica básica para el manejo de DNA. Es muy versátil, con un gran número de variantes y técnicas derivadas, lo que hace que existan una enorme cantidad de aplicaciones diferentes (White 1993; Mullis et al. 1994; Bartlett y Stirling 2003; Lo 2006; Park 2011; Theophilus y Rapley 2011; Domingues 2017).

1.4.1.2 Historia

Durante la década de 1960, H. Gobind Khorana fue el pionero de la síntesis química de oligonucleótidos (Khorana 1968). En 1970, teniendo en cuenta las limitaciones en la longitud de los oligonucleótidos que podía obtenerse por síntesis química, desarrolló en su laboratorio un método para sintetizar artificialmente un gen completo juntando técnicas químicas y enzimáticas (Agarwal et al. 1970). Con el objetivo de tener suficientes copias del gen sintético para la realización de estudios posteriores, sugirieron la posibilidad de obtenerlas mediante el uso de DNA polimerasa y los oligonucleótidos cebadores adecuados. En uno de los artículos de la serie sobre la metodología empleada en todo el proceso de síntesis, se documentó por primera vez –definiéndolo como *réplica de reparación*– el uso de un oligonucleótido cebador y DNA polimerasa sobre un DNA de cadena sencilla sintético para obtener la doble cadena completa (Kleppe et al. 1971). En este artículo se sugirió la base teórica de la PCR, en el que la desnaturalización de un DNA de doble cadena en presencia de una cantidad en exceso de los oligonucleótidos cebadores adecuados produciría, al ser tratado con DNA polimerasa, la *réplica de reparación* descrita en cada una de las hebras y duplicando así la cantidad de DNA de doble cadena. La repetición cíclica de este proceso daría lugar a la obtención de múltiples copias del gen.

Sin embargo, la invención de la PCR se le atribuye a Kary B. Mullis que, además del concepto teórico, en 1983 fue el primero en poner a punto la metodología de la

reacción y en realizar las primeras pruebas experimentales al trabajar en un método de diagnóstico genético para analizar la mutación causante de la anemia de células falciformes (Mullis et al. 1994). Dicho método de diagnóstico fue publicado poco después (Saiki et al. 1985). Originalmente la reacción era llevada a cabo usando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli* (Klenow et al. 1971) que se degradaba en cada paso de desnaturalización requiriendo ser adicionado nuevamente al principio de cada ciclo (Mullis et al. 1986; Mullis y Faloona 1987). Para solventar este problema se propuso el uso de una DNA polimerasa termoestable (Taq polimerasa) que había sido descubierta anteriormente en la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* (Chien et al. 1976). Dicha enzima fue clonada en *E. coli* (Lawyer et al. 1989) y posteriormente modificada para retirar la actividad 5'-3' exonucleasa (fragmento Stoffel) (Lawyer et al. 1993). El uso de la Taq polimerasa termoestable permitió definir ya un procedimiento instrumentalmente automatizable (Saiki et al. 1988) y demostrar que podía ser empleado para preparar el DNA deseado para la secuenciación por el método de Sanger (Innis et al. 1988).

Kary B. Mullis recibió en 1993 el premio Nobel de Química por este descubrimiento.

1.4.1.3 Fundamento técnico general

La PCR está fundamentada en la actividad transferasa específica de la DNA polimerasa que, una vez asociada a un DNA de doble hebra correctamente hibridado y en caso de existir un grupo hidroxilo libre en posición 3' de la desoxirribosa y una base desapareada en 5' de la hebra complementaria, cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre el grupo hidroxilo y el grupo α -fosfato de un desoxinucleótido trifosfato (dNTP) presente en el medio y complementario a la base desapareada (siguiendo el emparejamiento descrito por Watson-Crick (Watson y Crick 1953a)). Una vez incorporado el dNTP, la polimerasa se desplaza para seguir catalizando la incorporación de nuevos dNTP mientras existan grupos hidroxilo libres en 3', bases desapareadas en 5' en la hebra complementaria y dNTP en el medio.

Considerando este proceso enzimático, mediante el uso de un oligonucleótido cebador que hibride específicamente con un DNA molde, puede sintetizarse una hebra de secuencia complementaria a éste a partir del punto en donde ocurre la hibridación. Realizando este proceso con una pareja de cebadores y un DNA de doble cadena como molde, se obtienen las dos hebras complementarias con un extremo definido cada una de ellas. Empleando estas hebras generadas como

molde para la extensión de los cebadores en un siguiente paso, se generan las correspondientes hebras complementarias que, esta vez, tienen ambos extremos ya definidos. La repetición cíclica de este proceso genera copias de la región de DNA de doble cadena delimitada por la pareja de cebadores escogidos que, debido a que los productos actúan como molde de manera simultánea, se produce de manera exponencial.

1.4.1.3.1 Componentes básicos de la reacción

La técnica de amplificación por PCR es muy versátil y se han desarrollado múltiples variantes de la misma. A pesar de las modificaciones particulares que pueda tener cada variante, los componentes básicos de la reacción son:

- Una DNA polimerasa termoestable que catalice la síntesis dependiente del molde de DNA.
- Un par de oligonucleótidos que actúen como cebadores de la DNA polimerasa para la hebra directa y reversa.
- Desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) que se incorporan en la extensión de los cebadores.
- Cationes divalentes, normalmente Mg^{2+} en forma de cloruro ($MgCl_2$) o sulfato ($MgSO_4$), que actúan como cofactor de la DNA polimerasa para la formación del enlace fosfodiéster (Brautigam y Steitz 1998) y dan estabilidad estructural al DNA (Sissoëff et al. 1978).
- Cationes monovalentes, normalmente K^+ y Na^+ en forma de cloruro (KCl, NaCl), que neutralizan la carga negativa de las cadenas de DNA minimizando la repulsión entre ellas y por tanto favoreciendo la hibridación.
- Una disolución tampón de pH ajustado al funcionamiento óptimo de la polimerasa, normalmente de tris-HCl con un pH entre 8,3 y 9,2, ya que en la reacción se libera un protón por cada dNTP incorporado en la extensión.
- El DNA molde que contiene la secuencia que se quiere amplificar.

Aunque todos los reactivos son fundamentales y necesarios para la reacción, son las propiedades de la DNA polimerasa empleada las que determinan el tipo de amplificación que puede llevarse a cabo. Existen una gran cantidad de DNA polimerasas aisladas de diferentes organismos termófilos y que presentan características distintas (Terpe 2013). Estas características, como por ejemplo la temperatura óptima de extensión, velocidad de extensión, procesividad, fidelidad,

actividad exonucleasa o estabilidad térmica, deben ser tenidas en cuenta para su elección.

1.4.1.3.2 Aditivos y potenciadores

Además de los reactivos básicos de una reacción de PCR, se han propuesto una serie de cosolventes y aditivos que actúan como potenciadores de la eficiencia, especificidad o rendimiento de la reacción. El modo de actuación puede ser mediante la estabilización o protección de la DNA polimerasa, la estabilización de las hibridaciones específicas, la desestabilización de las hibridaciones inespecíficas, la eliminación de estructuras secundarias, la desestabilización de la doble hélice del DNA molde o una combinación de las anteriores.

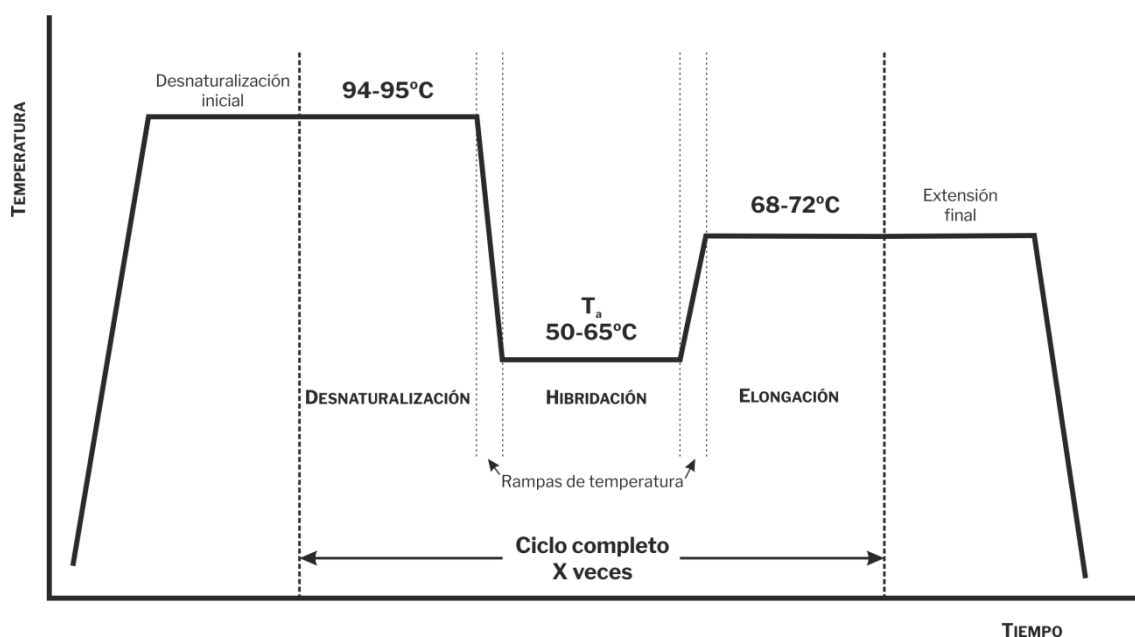
Aditivo	Concentración	Efecto
Detergentes no iónicos (Triton X-100, Tween 20, Nonidet P-40)	0,1-1% v/v	Previenen la agregación de la polimerasa, aumentando el rendimiento. Neutralizan la inhibición de la reacción por detergentes iónicos (como SDS). Pueden incrementar hibridaciones no específicas (Bachmann et al. 1990)
Polietilenglicol PEG 6000	5-15 % v/v	Estabiliza la DNA polimerasa
Glicerol	5-15 % v/v	Estabiliza térmicamente la DNA polimerasa y además disminuye la temperatura de separación de las hebras (Sarkar et al. 1990; Cheng et al. 1994)
Gelatina	0,01-0,10% p/v	Estabiliza la DNA polimerasa
Albúmina sérica bovina (BSA)	0,01-0,1 µg/µL	Estabiliza la DNA polimerasa. Neutraliza inhibidores de PCR que puedan existir en la muestra (Pääbo et al. 1988; Kreader 1996)
Proteínas ligantes de DNA de cadena sencilla (single-stranded DNA binding proteins SSBP)	0,5-10 nM	Incrementan la estabilidad de las hibridaciones específicas e inhiben la extensión de las hibridaciones inespecíficas. Aumentan la especificidad y rendimiento de la reacción. (Chou 1992; Kreader 1996)
Sulfato amónico	5-30 mM	Estabiliza las cargas negativas de la cadena de DNA facilitando la separación de las hebras (Olive et al. 1989)
Espermidina	0,4-1mM	Estabiliza las cargas negativas de la cadena de DNA. Disminuye hibridaciones no específicas con el DNA molde. Ayuda a neutralizar la acción de inhibidores presentes en la muestra (Wan y Wilkins 1993)

Aditivo	Concentración	Efecto
Dimetilsulfóxido (DMSO)	2-10% v/v	Reduce la formación de estructuras secundarias y facilita la separación de hebras. Indicada para la amplificación de zonas con alto contenido GC. (Winship 1989; Cheng et al. 1994). Disminuye la actividad de la DNA polimerasa pero simultáneamente aumenta su procesividad (Montgomery y Wittwer 2014)
Dimetilformamida (DMF)	<10% v/v	Disminuye la estabilidad del DNA molde de doble cadena para potenciar la hibridación (Chakrabarti y Schutt 2001)
Betaína (trimetilglicina)	0,1-3.5M	Disminuye la estabilidad del DNA molde de doble cadena para potenciar la hibridación. Reduce la contribución termodinámica de los pares GC respecto a los AT. Tiene un efecto osmoprotector sobre la DNA polimerasa. Indicada para la amplificación de zonas con alto contenido GC. (Rees et al. 1993; Hengen 1997; Henke et al. 1997)
Formamida	1,25-5% v/v	Se une a los surcos del DNA, desestabilizando la doble cadena y reduciendo la formación de estructuras secundarias. Reduce las hibridaciones inespecíficas. Estabiliza la DNA polimerasa. Indicada para la amplificación de zonas con alto contenido GC (Sarkar et al. 1990)
Cloruro de tetrametilamonio (TMAC)	15-100mM	Incrementa la especificidad de la hibridación y aumenta su T_m . Estabiliza los pares AT, igualando su contribución termodinámica a los pares GC (Melchior y Hippel 1973; Honoé y Madsen 1997)

Adicionalmente al uso de los cosolventes y aditivos, también se ha propuesto el uso de los nucleótidos análogos 7-deaza-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato (7-deaza-dGTP) o desoxiinosina 5'-trifosfato (dITP) como sustitutos totales o parciales de desoxiguanosina 5'-trifosfato (en proporción 3:1 análogo:dGTP) para reducir la estabilidad de la hibridación y permitir la amplificación de regiones con alto contenido GC (Fernandez-Rachubinski et al. 1990; Turner y Jenkins 1995).

1.4.1.3.3 Esquema de la reacción

La reacción de PCR básica es una repetición cíclica de un proceso térmico que consta de tres etapas: la desnaturalización del molde, la hibridación de los cebadores y la extensión de los mismos por la DNA polimerasa.



La etapa de desnaturalización se lleva a cabo a una temperatura de 94-95°C, y en ella se produce la desnaturalización térmica del DNA molde y del resto de DNA presentes en el medio de reacción.

En la siguiente etapa –la etapa de hibridación– los oligonucleótidos cebadores se unen específicamente al DNA molde y discurre en la temperatura de hibridación T_a (del inglés *annealing temperature*). Esta temperatura es variable y, como se verá más adelante, depende de los oligonucleótidos cebadores y del fragmento amplificado, aunque suele estar en el rango de temperatura de 50-65°C.

La última etapa del ciclo consiste en la extensión del cebador por parte de la DNA polimerasa, la cual se realiza a una temperatura de 68-72°C en función de la polimerasa y el protocolo empleado.

Estas tres etapas constituyen un ciclo en la reacción. El número de veces que se repite este ciclo es variable en función de las condiciones y el tipo de amplificación pero, de manera genérica, 25-30 veces puede ser suficiente para obtener un rendimiento máximo de la amplificación deseada y ausencia de amplificaciones inespecíficas no deseadas.

Al inicio de la reacción puede existir opcionalmente una etapa previa única de desnaturalización para favorecer la separación de hebras del DNA molde, que resulta obligatoria en el caso de emplear DNA polimerasas que requieran activación térmica (Sharkey et al. 1994; Chen et al. 1997).

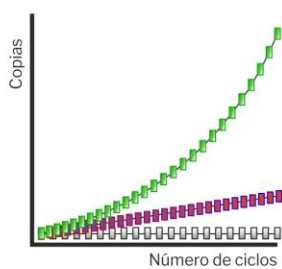
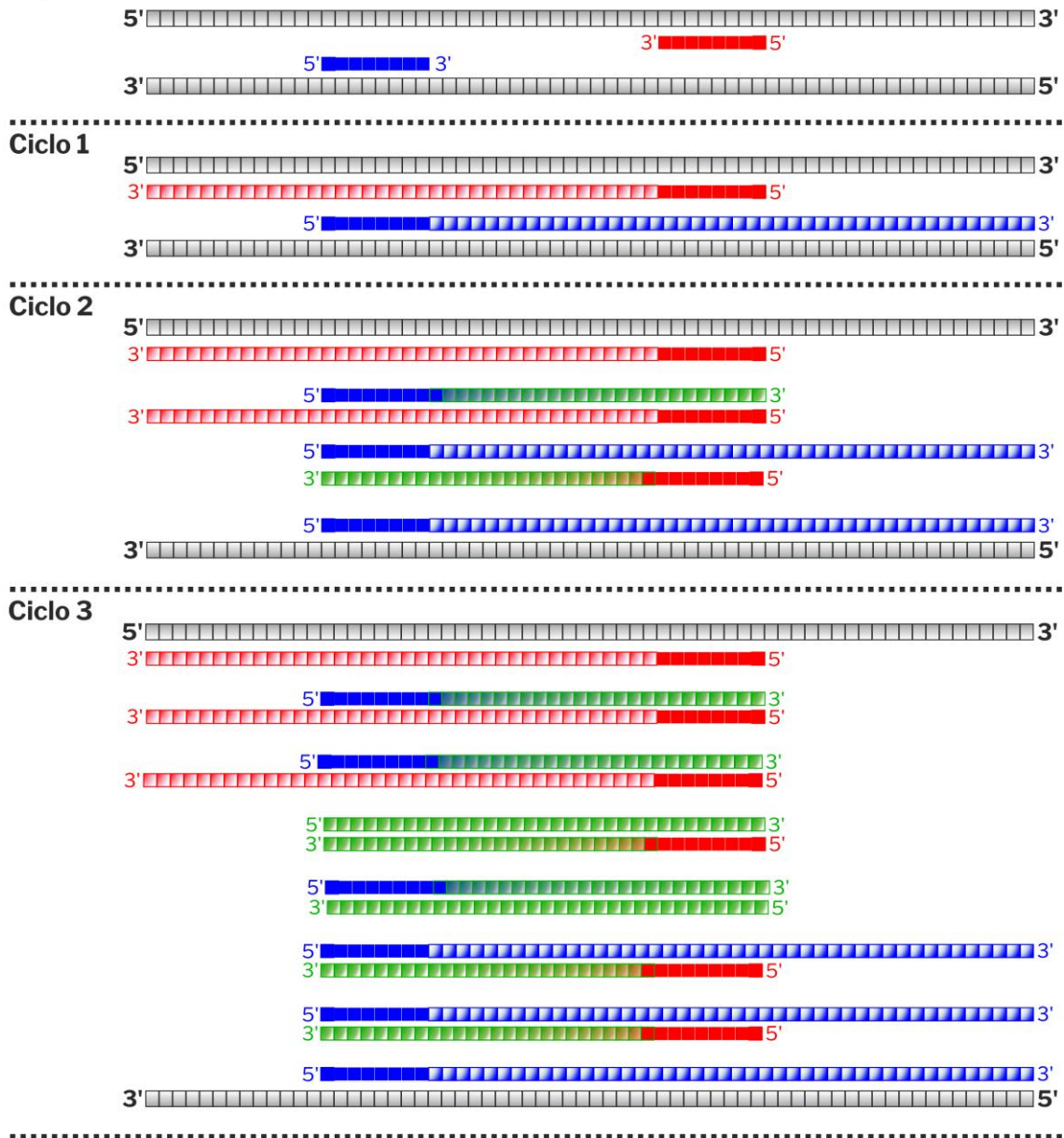
Adicionalmente, también puede existir una etapa única final de extensión para favorecer la finalización completa de los productos amplificados.

En el proceso térmico de la reacción de PCR no sólo resulta fundamental la temperatura y la duración de cada etapa sino que también es muy importante la velocidad y precisión en la que se realiza el cambio de temperatura (Saunders et al. 2001; Ho Kim et al. 2008). El uso de termocicladores automáticos con un termobloque que, mediante el efecto Peltier (Peltier 1834), permite controlar el calentamiento y enfriamiento rápido y preciso de la mezcla facilitando la reacción.

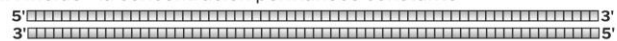
1.4.1.3.4 Etapas de la amplificación

En el primer ciclo de la reacción de PCR la única diana de hibridación para los oligonucleótidos añadidos es el DNA molde añadido. Una vez hibridados los cebadores, la DNA polimerasa los extiende sin límite (salvo el impuesto por la procesividad de la polimerasa y la disponibilidad de secuencia molde) hasta la siguiente etapa de desnaturalización, generando una población de moléculas de diversos tamaños que comparten una zona 5' común limitada por la secuencia del cebador. En el segundo ciclo, las dianas para la hibridación de los cebadores son tanto el DNA molde añadido como las hebras de longitud indefinida generadas en el ciclo anterior. Cuando el cebador hibrida en el DNA molde se siguen generando las mismas moléculas de longitud indefinida y que se van a seguir generando de manera lineal a lo largo de la reacción. Sin embargo, cuando el cebador hibrida con estas hebras de longitud indefinida, la extensión catalizada por la DNA polimerasa genera ya las primeras hebras de longitud definida correspondientes a la amplificación deseada. En los ciclos subsiguientes, tanto las hebras de longitud indefinida como la amplificación deseada actúan de molde para la extensión de los cebadores y permitiendo la amplificación exponencial del fragmento deseado. Cabe destacar que el DNA añadido a la reacción no es el molde para la amplificación exponencial sino que esta función la tiene el producto generado a partir de los cebadores. Por tanto esto hace que posibles modificaciones en la secuencia de los cebadores queden incorporadas en el producto final obtenido.

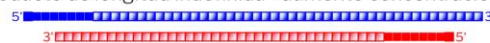
Esquema PCR



DNA Molde - la concentración permanece constante



Producto de longitud indefinida - aumento concentración lineal

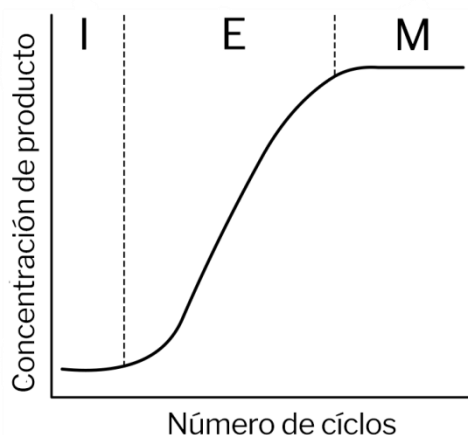


Producto deseado de doble hebra - aumento concentración exponencial



1.4.1.3.5 Aspectos termodinámicos y cinéticos de la reacción

La amplificación de un fragmento mediante la reacción de PCR tiene tres fases diferenciadas: la fase inicial, la fase exponencial y la fase de meseta.



En la fase inicial, la concentración de los cebadores está en franco exceso en relación a la concentración de DNA diana. Los cebadores actúan de manera análoga a sondas de hibridación, interaccionando con el DNA hasta que encuentran una hibridación estable, en las condiciones químicas y térmicas establecidas, que permite su elongación por la DNA polimerasa. En esta fase se van formando las primeras copias que se van acumulando hasta alcanzar una concentración que permite pasar a la siguiente fase de la reacción.

En la fase exponencial, la relación de concentración entre los cebadores y la cantidad de productos que actúan como molde en la reacción alcanza un punto óptimo. Esto permite que la reacción funcione a pleno rendimiento acercándose al ideal de duplicar el número de copias en cada ciclo de la reacción. La acumulación rápida del producto continúa hasta que comienza a decaer la eficiencia de la amplificación y se alcanza la fase de meseta.

En la fase de meseta, la renaturalización de los propios fragmentos amplificados frente a la hibridación de los cebadores hace que la eficiencia de la amplificación disminuya drásticamente hasta cesar el aumento de concentración del producto deseado incluso aunque continúen los ciclos térmicos de la reacción (Kainz 2000; Carr y Moore 2012).

1.4.1.4 Diseño de un experimento

El diseño estándar de una reacción de amplificación por PCR consta de

1. Determinación de la región de DNA que se quiere amplificar
2. Diseño de los oligonucleótidos que van a actuar como cebadores de la DNA polimerasa
3. Establecimiento de las condiciones químicas de la reacción
4. Establecimiento de las condiciones térmicas de la reacción

1.4.1.4.1 Determinación de la región a amplificar

El primer paso para llevar a cabo una amplificación por PCR es determinar la región del DNA que se quiere amplificar. Debido al empleo de cebadores específicos, es necesario conocer de antemano la secuencia de nucleótidos de, al menos, la zona en donde van a hibridar estos. Para asegurar la especificidad, estas zonas no deben ser ni homopoliméricas ni altamente repetitivas, además de no presentar una homología muy significativa con regiones adyacentes.

Una vez determinada la zona de interés se procede al diseño de una pareja de oligonucleótidos cebadores situados a los laterales de esta, de tal manera que cada uno hibrida en una hebra distinta y además se encuentran orientados para que se produzca la elongación en dirección al otro cebador (el cebador directo hibrida con la hebra reversa y el cebador reverso con la hebra directa).

1.4.1.4.2 Diseño de los cebadores

El diseño de los cebadores es un parámetro crítico para la reacción de PCR. No sólo determina la secuencia que va a ser amplificada sino que además las propiedades termodinámicas de los cebadores son las que determinan en gran parte las condiciones de la reacción.

Por la propia definición de la PCR, el factor más importante de un oligonucleótido cebador es su especificidad. Pese a que la longitud mínima de hibridación que requiere la Taq DNA polimerasa para extender un cebador es de 8 nucleótidos (Zhao y Guan 2010), si consideramos cual es la probabilidad estadística de aparición de la secuencia de un oligonucleótido en la secuencia total del genoma humano (considerando una distribución homogénea de bases), podemos comprobar en la siguiente tabla que se requiere una longitud de al menos 16 nucleótidos para asegurar la especificidad estadística teórica mínima.

Longitud oligonucleótido	Probabilidad aparición	Ocurrencia aleatoria
1	0,25	
2	0,0625	225 562 713,5625
3	0,015625	56 390 678,3906
4	0,00390625	14 097 669,5977
5	0,000976563	3 524 417,3994
6	0,000244141	881 104,3499
7	6,10352E-05	220 276,0875
8	1,52588E-05	55 069,0219
9	3,8147E-06	13 767,2555
10	9,53674E-07	3441,8139
11	2,38419E-07	860,4535
12	5,96046E-08	215,1134
13	1,49012E-08	53,7783
14	3,72529E-09	13,4446
15	9,31323E-10	3,3611
16	2,32831E-10	0,8403
17	5,82077E-11	0,2101
18	1,45519E-11	0,0525
19	3,63798E-12	0,0131
20	9,09495E-13	3,2824E-03
21	2,27374E-13	8,2059E-04
22	5,68434E-14	2,0515E-04
23	1,42109E-14	5,1287E-05
24	3,55271E-15	1,2822E-05
25	8,88178E-16	3,2054E-06

Normalmente, se considera una longitud de 20 nucleótidos como tamaño estándar mínimo para un cebador.

En cuanto a la secuencia de bases del oligonucleótido existen una serie de requerimientos para cada cebador considerado individualmente y otros considerando el conjunto de cebadores de la reacción y el producto formado.

La secuencia de un cebador debe tener una composición de bases equilibrada, no contener homopolímeros o repeticiones que puedan comprometer la hibridación específica, y no contener regiones con hibridaciones termodinámicamente muy estables. Considerando la estabilidad de la hibridación a lo largo de la secuencia, regiones muy estables en 3' pueden comprometer la amplificación y aumentar inespecificidades (Rychlik 1995). Además el oligonucleótido no debe formar estructuras secundarias internas de relevancia o dímeros, especialmente si estos tienen un extremo 3' extensible por la DNA polimerasa.

Considerando el conjunto de cebadores, ambos deben tener una estabilidad termodinámica en la hibridación parecida, no formar estructuras secundarias de

relevancia, no formar dímeros entre sí (especialmente si estos son extensibles por la DNA polimerasa) y su temperatura de fusión no debe ser mucho más baja que la que tenga el fragmento amplificado.

Normalmente se emplean programas informáticos para la búsqueda de los pares de cebadores adecuados para cada amplificación (Rychlik 2007; SantaLucia 2007).

1.4.1.4.3 Condiciones químicas

La determinación de las condiciones químicas de una reacción de PCR supone establecer los reactivos que van a formar parte ella y la concentración final en la mezcla de reacción que van a tener. Para ello hay que determinar el tipo de DNA polimerasa a emplear y su concentración, la concentración de DNA molde, cebadores, dNTP y cationes, y opcionalmente el uso o no de aditivos con su correspondiente concentración.

1.4.1.4.4 Condiciones térmicas

La determinación de las condiciones térmicas de una reacción de PCR supone establecer el número de ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación que se van a realizar, y la duración y la temperatura de cada etapa. La duración y temperatura de desnaturalización pueden depender de la DNA polimerasa empleada y del contenido GC del fragmento que se quiere amplificar. La temperatura de hibridación o T_a depende tanto de la temperatura de fusión de los cebadores como de la del fragmento amplificado por PCR. Esta temperatura debe determinarse experimentalmente, aunque existen fórmulas empíricas para calcular la temperatura óptima y poder emplearla como punto de partida (Rychlik et al. 1990). La duración y temperatura de la fase de elongación depende de la temperatura de funcionamiento óptima de la DNA polimerasa usada y de su procesividad, y del tamaño del fragmento amplificado. Como regla general, se considera adecuado el uso de 1 minuto por cada kb que tenga el fragmento amplificado.

1.4.1.5 Variantes

A partir del concepto de la reacción de PCR estándar (Mullis et al. 1986) se han desarrollado multitud de variantes sobre el protocolo original para permitir mejorar el rendimiento, la especificidad u obtener una nueva funcionalidad.

De ellas, algunas de las más significativas son:

- PCR *Hot Start*: La mezcla de reacción se somete al paso de desnaturalización de 94-95°C antes de la adición de la DNA polimerasa para evitar la amplificación inespecífica en los primeros momentos de la reacción y aumentar la especificidad y el rendimiento (D'Aquila et al. 1991; Green y Sambrook 2018). Varias preparaciones de DNA polimerasa suministradas por casas comerciales proporcionan automáticamente esta técnica al requerir un paso previo de activación térmica antes de tener función enzimática (Sharkey et al. 1994; Dahiya et al. 1995; Chen et al. 1997).
- PCR *Multiplex*: El uso de varios pares de cebadores en la misma reacción permite amplificar de manera simultánea varios fragmentos (Chamberlain et al. 1988).
- MLPA - Amplificación multiplex de sondas dependientes de ligación (*multiplex ligation-dependent probe amplification*): Permite la amplificación y cuantificación relativa de múltiples dianas con el uso de diversas sondas y un único par de cebadores (Schouten et al. 2002).
- LA-PCR (*Long and accurate PCR*): Permite la amplificación precisa de fragmentos de hasta 40 Kb de longitud (Barnes 1994; Cheng et al. 1994).
- PCR alelo específica: Permite amplificar de manera específica un alelo mediante la hibridación de la zona 3' de al menos uno de los cebadores sobre una región polimórfica que sea diferente en ambos alelos (Saiki et al. 1986).
- PCR anidada: Emplea como molde para la reacción el producto de una reacción de PCR anterior, permitiendo amplificar secuencias sin hibridaciones inespecíficas no deseadas al eliminar las secuencias de DNA no deseadas.
- PCR asimétrica: Permite la amplificación preferencial de una de las hebras limitando la concentración de uno de los cebadores. Tras el agotamiento del cebador limitante en la fase exponencial se produce la amplificación lineal de la hebra generada a partir del cebador en exceso, con una disminución de la eficiencia global de la reacción (Gyllensten y Erlich 1988).
- LATE-PCR (*Linear-after-the-exponential PCR*): Es una modificación de la PCR asimétrica en la que el cebador limitante tiene una temperatura de fusión más elevada que el cebador en exceso, equilibrando los parámetros termodinámicos de la reacción con las concentraciones empleadas. De esta manera aumenta la eficiencia de la reacción y la generación de la amplificación preferencial (Sanchez et al. 2004).

1.4.2 Secuenciación por el método de Sanger

1.4.2.1 Introducción

La secuenciación por el método de Sanger es una técnica de biología molecular que, mediante la incorporación selectiva por parte de la DNA polimerasa de didesoxinucleótidos terminadores durante la replicación de DNA *in vitro*, permite determinar con precisión la secuencia de nucleótidos de una molécula de DNA. El método de Sanger puede ser usado para cualquier aplicación que requiera el conocimiento exacto de la secuencia de nucleótidos, como por ejemplo la secuenciación *de novo*, la detección de polimorfismos y mutaciones, validación de resultados de secuenciación de nueva generación, identificaciones biológicas o estudios de expresión génica.

1.4.2.2 Historia

El método de secuenciación mediante el uso de DNA polimerasa y didesoxinucleótidos fue propuesto por Frederick Sanger en 1977 (Sanger et al. 1977) como una alternativa más eficiente al método de secuenciación *más/menos* que había propuesto anteriormente (Sanger y Coulson 1975) y al de ruptura química propuesto por Maxam y Gilbert (Maxam y Gilbert 1977). Basándose en la actividad inhibitoria sobre la DNA polimerasa que tenía la dideoxitimidina trifosfato (ddTTP) que, al carecer de grupo hidroxilo en 3', impedía la extensión de la cadena al incorporarse en lugar de la deoxitimidina trifosfato (dTTP) (Atkinson et al. 1969), Sanger ideó un sistema por el cual la incubación de un DNA molde con un oligonucleótido cebador y DNA polimerasa en presencia de los cuatro desoxiribonucleótidos trifosfato y ddTTP produciría una mezcla de fragmentos de diferentes tamaños con una zona 5' común y terminados en 3' en dideoxitimidina. Al separar esta mezcla por electroforesis en geles de acrilamida, el patrón de bandas mostraría la distribución de timidina a lo largo del DNA sintetizado. Al realizar la reacción análoga con los otros tres nucleótidos y realizar la electroforesis en paralelo, el patrón de bandas permitiría deducir la secuencia del DNA molde.

Este primer protocolo establecido por Sanger era realizado en cuatro reacciones independientes (una por nucleótido), con un solo proceso de incubación y empleando [α -³²P]dATP para la detección de bandas por autorradiografiado.

Posteriormente se desarrollaron diferentes modificaciones orientadas a facilitar el procedimiento y permitir su automatización para aumentar la capacidad, el rendimiento y la precisión de la técnica. Se desarrolló un método de marcaje fluorescente de los oligonucleótidos cebadores (Smith et al. 1985) que permitió

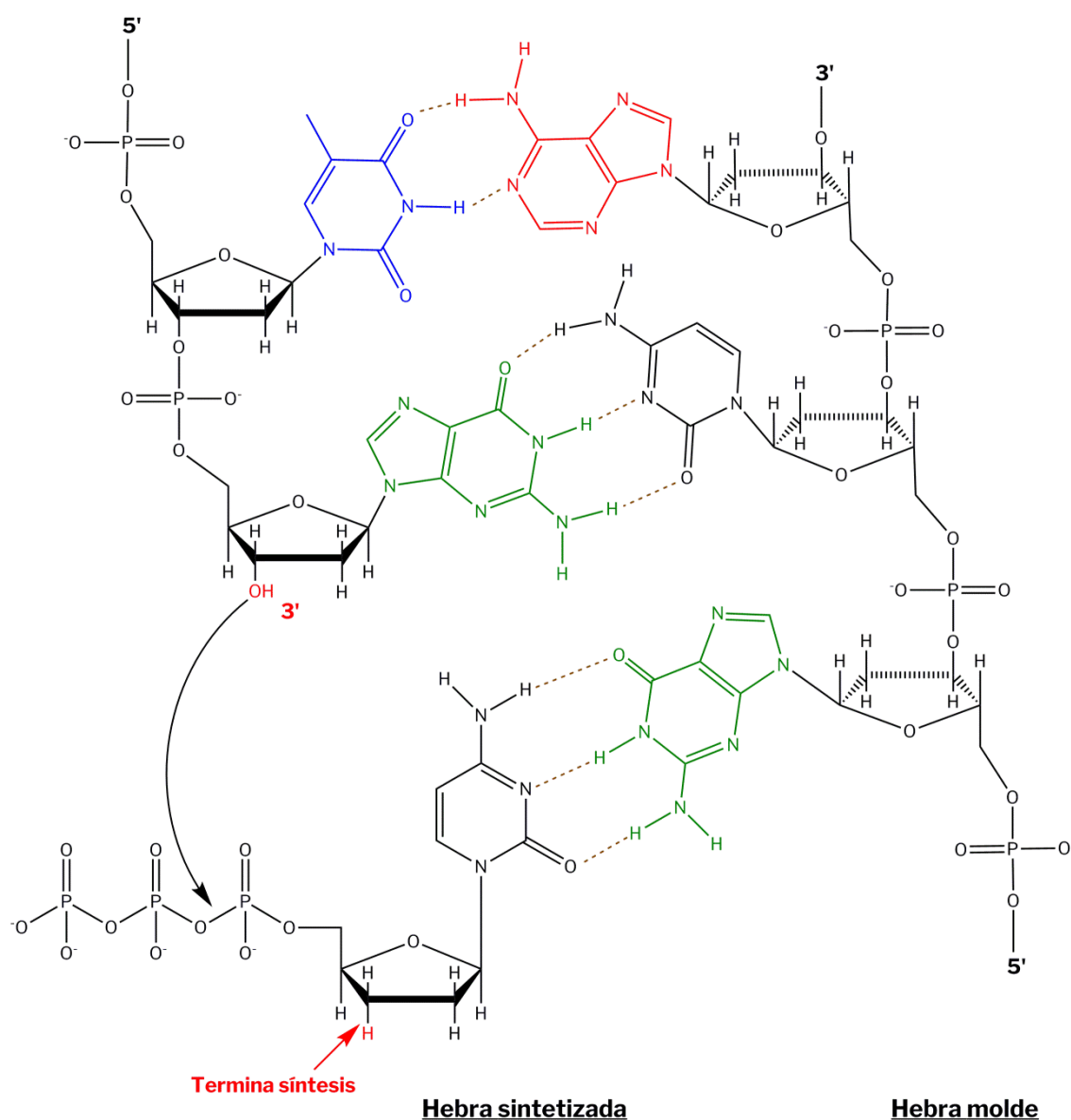
sustituir la radioactividad por fluorescencia como método de detección y comenzar el proceso de automatización (Ansorge et al. 1986; Smith et al. 1986). El empleo de terminadores marcados con diferentes fluoróforos permitió la realización de las cuatro reacciones de terminación de manera simultánea en el mismo recipiente (Prober et al. 1987). Se desarrolló una DNA polimerasa específica para la reacción (DNA polimerasa del fago T7 modificada químicamente – Secuenasa) con una procesividad muy elevada y una incorporación más eficiente de los terminadores que permitía un marcaje mucho más eficaz y homogéneo (Tabor y Richardson 1987). La aplicación de la entonces recién desarrollada técnica de PCR para obtener el DNA molde para la reacción de secuenciación (Innis et al. 1988) junto al procedimiento de secuenciación cíclica (Murray 1989; Craxton 1991) permitieron reducir en varios órdenes de magnitud la cantidad de DNA necesaria para el análisis. El uso de la electroforesis capilar permitió aumentar la velocidad, resolución y eficacia de la separación del producto de la reacción secuenciación (Drossman et al. 1990; Luckey et al. 1990; Swerdlow y Gesteland 1990). El desarrollo de la electroforesis con los capilares en grupo (*array*) (Huang et al. 1992) permitió la aparición de máquinas comerciales de secuenciación de alta capacidad y rendimiento. Por último, el desarrollo del algoritmo de identificación de bases y análisis de la calidad de la identificación Phred (Ewing et al. 1998; Ewing y Green 1998) a partir de la señal de fluorescencia obtenida (cromatograma) permitió automatizar la interpretación de la información obtenida y facilitar el análisis informático posterior.

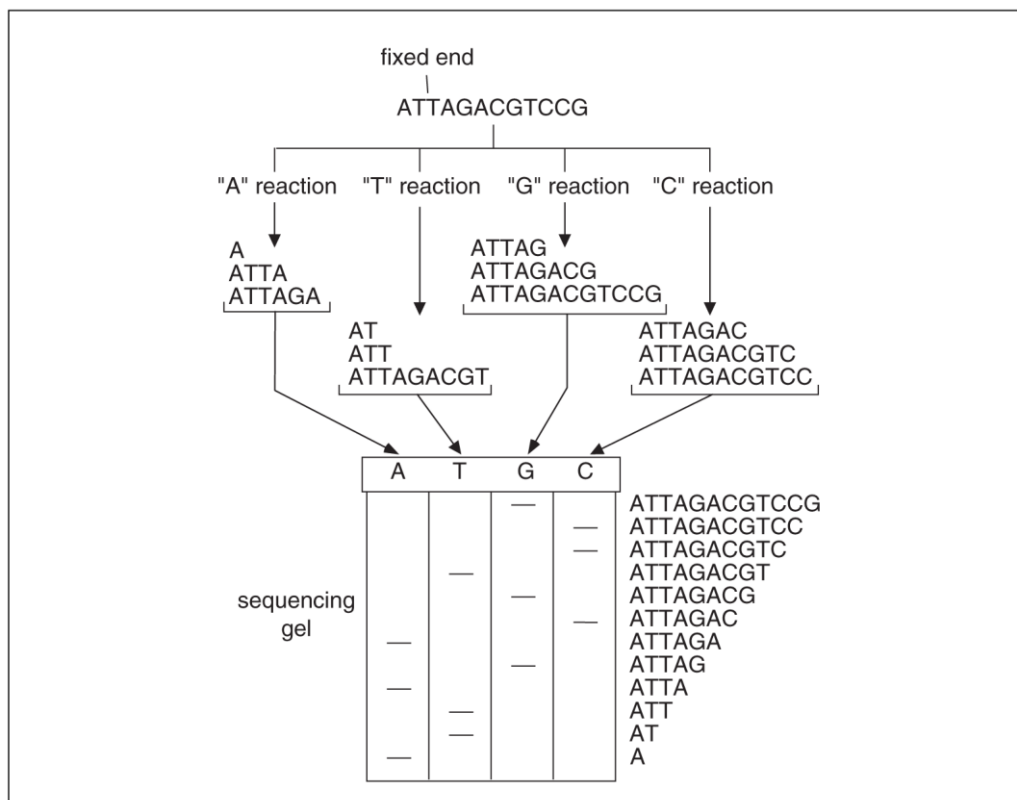
Frederick Sanger recibió en 1980 su segundo premio Nobel de Química por este descubrimiento.

1.4.2.3 Fundamento técnico general

La secuenciación de DNA por el método de Sanger está fundamentada en la actividad catalítica de la DNA polimerasa. Cuando un oligonucleótido cebador se hibrida con una hebra sencilla de DNA, la DNA polimerasa forma un complejo con este conjunto y, si encuentra libre un grupo hidroxilo en la posición 3' de la desoxirribosa terminal del cebador, comienza a catalizar la incorporación de desoxinucleótidos presentes en el medio mediante la formación de un enlace fosfodiéster entre el grupo hidroxilo en 3' y el grupo fosfato en posición 5' del desoxinucleótido que se incorpora. En este proceso de incorporación la hebra sencilla de DNA actúa como molde, de tal manera que la DNA polimerasa sólo incorpora el nucleótido complementario a la base correspondiente siguiendo el emparejamiento descrito por Watson-Crick. La incorporación al medio de reacción de 2',3'-didesoxinucleótidos –que pueden incorporarse a la cadena

sintetizada pero no permiten su elongación al carecer del grupo hidroxilo en 3'-provoca que la extensión de la cadena se detenga en el punto concreto en el que se ha añadido el didesoxinucleótido. De esta manera se genera una población de productos de la extensión del cebador de diferente tamaño complementarios al molde y los cuales, para cada tamaño definido, comparten la secuencia de su región 5' (correspondiente al cebador) y la identidad de la base terminadora en 3'. Mediante la separación electroforética de las diferentes poblaciones (en acrilamida desnaturalizante de alta resolución, con poder de resolución de 1 base) y un marcaje específico que permita detectar o identificar el terminador, es posible reconstruir la secuencia específica de los nucleótidos y, por su reverso complementario, determinar la secuencia de nucleótidos de la cadena de DNA que ha actuado como molde.





1.4.2.4 Secuenciación automática capilar

Partiendo del protocolo básico propuesto por Sanger, y siguiendo el fundamento teórico del método, se desarrollaron diferentes variantes del proceso con distintos métodos de marcaje, terminación y detección de las moléculas generadas.

Como se ha visto anteriormente, la variante más avanzada y considerada estándar por su rapidez, facilidad de automatización, versatilidad, consistencia, coste y poca cantidad de muestra requerida, es la secuenciación cíclica con terminadores marcados mediante fluoróforos y separación mediante electroforesis capilar. De manera genérica, esta variante se conoce como *secuenciación automática capilar* y existen varias plataformas comerciales que permiten llevarla a cabo.

1.4.2.4.1 Componentes de la reacción

Los componentes básicos de la reacción son:

- la hebra de DNA de la cual se quiere obtener la secuencia y que actúa como molde para la incorporación de nucleótidos por parte de la DNA polimerasa
- un oligonucleótido que actúa como cebador de la DNA polimerasa y que determina el comienzo de la región secuenciada
- desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) que se incorporan en la extensión del cebador

- didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTP), marcados con fluoróforos, que detienen la extensión de la cadena
- DNA polimerasa, que lleva a cabo la incorporación de los dNTP y ddNTP
- tampón de reacción, con el pH, concentración de sales y cofactores requeridos por la DNA polimerasa
- agua libre de DNAsas e inhibidores

Existen diferentes tipos de marcaje fluorescente para los ddNTP (Lee et al. 1992, 1997; Mujumdar et al. 1993; Rosenblum et al. 1997) y diferentes DNA polimerasas (Tabor y Richardson 1987, 1995; Reeve y Fuller 1995; Parker et al. 1996) que presentan propiedades distintas. Cada plataforma comercial de secuenciación suministra los terminadores marcados con fluorescencia correspondientes a los sistemas de detección de su secuenciador y la polimerasa adecuada para ellos.

Hay dos parámetros que resultan determinantes para el proceso de secuenciación y que son la relación de concentración entre el cebador y el DNA molde y la relación de concentración entre los dNTP y los ddNTP. Estas relaciones dependen entre sí y también del tipo de química y polimerasa empleada, por lo que cada fabricante ofrece sus recomendaciones ajustadas a las características de sus reactivos e instrumental.

Se requiere que la disolución que contiene el DNA molde, especialmente si proviene de una reacción de PCR, no contenga una concentración significativa de dNTP o cebadores que pueda alterar estas relaciones de concentración o que genere productos de extensión inespecíficos. Partiendo de un PCR como fuente del DNA molde, hay que llevar a cabo un paso de purificación previo a la reacción de secuenciación para eliminar estas y otras sustancias que puedan interferir en una correcta reacción de secuenciación.

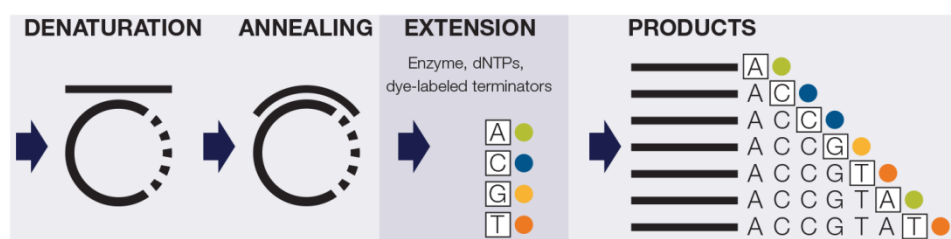
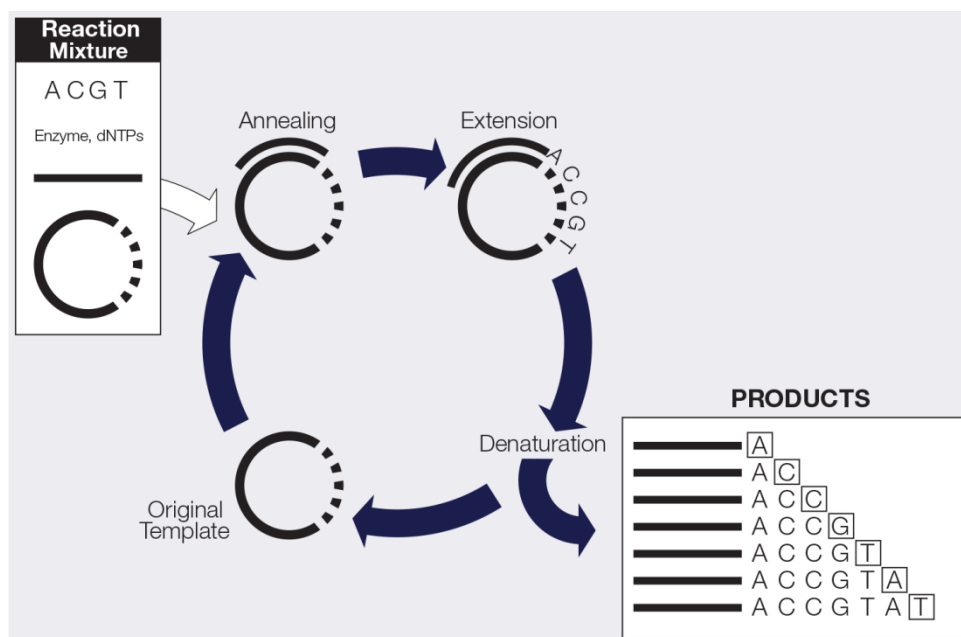
1.4.2.4.2 Esquema de la reacción

La secuenciación cíclica sigue un esquema similar al de la reacción de PCR, con una serie de ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión llevados a cabo en un termociclador (Slatko et al. 2011). Respecto a la reacción de PCR existen dos diferencias fundamentales: el empleo de un solo cebador hace se amplifique únicamente una cadena de manera lineal (no exponencial) y el uso de terminadores hace que se generen productos de extensión de diferentes longitudes y no copias de la misma longitud de la cadena molde.

En cada uno de los ciclos se produce una etapa de desnaturalización para eliminar las estructuras secundarias que pueda tener el DNA molde (incluyendo la separación de las hebras en caso del uso de un DNA bicatenario como molde) y

separar del molde los productos de extensión hibridados generados en el ciclo precedente. Posteriormente se lleva a cabo una etapa de hibridación/elongación, en la que el cebador se une al DNA molde y la DNA polimerasa cataliza su extensión hasta que, de manera aleatoria, se incorpora un ddNTP marcado en lugar de un dNTP provocando la terminación de la elongación de la cadena.

La repetición cíclica de este proceso durante 25-30 ocasiones genera la población de moléculas de diferentes tamaños que tienen su base terminal en 3' marcada.



1.4.2.4.3 Electroforesis capilar

La mezcla de los productos de extensión de distintos tamaños generados en la reacción de secuenciación se separa mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático. El empleo de capilares, que tienen un diámetro de 50-100 μM , permite disipar de manera más eficiente el calor generado en la electroforesis por el efecto Joule y, en consecuencia, pueden emplearse voltajes más elevados que a su vez permiten aumentar la velocidad de separación de los productos (Dovichi y Zhang 2001).

Este proceso tiene dos fases diferenciadas, que son la inyección electrocinética de la muestra en el capilar y la separación electroforética.

En la inyección electrocinética, la aplicación de un alto voltaje a los capilares sumergidos en el tampón que contiene los productos de extensión fuerza a que los fragmentos que están cargados negativamente entren dentro del capilar. La cantidad de DNA que entra dentro del capilar es proporcional al voltaje aplicado, al tiempo de inyección, a la concentración del DNA en el tampón e inversamente proporcional a la conductividad de la disolución.

$$\text{Masa DNA} \propto V \cdot \Delta t \cdot \frac{\text{Concentración DNA}}{\kappa \text{ muestra}}$$

La cantidad y duración del voltaje aplicado es el parámetro clave para el éxito en la posterior separación y detección de los productos. Debido a que todas las especies cargadas negativamente compiten con el DNA marcado para entrar en el capilar durante la inyección electrocinética, para que esta sea eficiente es necesario que la conductividad de la disolución sea lo más baja posible. Por ello, es necesario introducir un paso de purificación entre la reacción de secuenciación y la inyección, en el que se eliminen sales, proteínas, terminadores no incorporados y el resto de moléculas que pueden interferir en la inyección o en la separación electroforética. El producto purificado obtenido debe colocarse posteriormente en un tampón de baja fuerza iónica.

La inyección electrocinética favorece la entrada de moléculas más pequeñas frente a las más grandes, por lo que es necesario ajustar los parámetros para obtener una señal adecuada en todos los rangos de tamaño.

La separación electroforética se lleva a cabo sobre matrices de poliacrilamida reemplazables que permiten la separación de los productos por tamaño en función de su carga total (Ruiz-Martinez et al. 1993). La movilidad electroforética de la muestra depende de las condiciones en las que se realiza la electroforesis (tipo de tampón empleado, tipo de matriz, cantidad de muestra inyectada, pH, temperatura y cantidad de voltaje aplicado). El voltaje aplicado es el principal factor que determina la velocidad de separación de los productos (a mayor voltaje mayor velocidad), pero simultáneamente el aumento de velocidad conlleva un descenso en la resolución de la secuencia y la longitud de lectura (Dovich 1997). En función del tamaño de los fragmentos a secuenciar, pueden ajustarse los parámetros de la electroforesis para alcanzar el equilibrio entre la velocidad y la longitud de lectura deseada.

Poco antes de alcanzar el electrodo positivo, los fragmentos de DNA –marcados con los distintos fluoróforos y ya separados por su tamaño– son irradiados por un haz de láser que excita los fluoróforos haciendo que emitan fluorescencia. Cada fluoróforo emite luz a una longitud de onda distinta, que es detectada y registrada por el secuenciador. Una vez procesada y analizada la señal se genera el cromatograma que refleja la secuencia obtenida en el proceso.

1.4.2.4.4 Diseño estándar de un experimento

El diseño estándar de una reacción de secuenciación consta de

1. Amplificación del material genético mediante PCR
2. Diseño del oligonucleótido que va a actuar como cebador
3. Establecimiento de las condiciones químicas de la reacción cíclica
4. Establecimiento de las condiciones de la electroforesis capilar

1.4.2.4.4.1 Amplificación del material genético

El primer paso consiste en la obtención de una cantidad suficiente del DNA del que se quiere determinar la secuencia. De forma habitual, para el diagnóstico genético, se emplea la técnica de PCR para amplificar la región génica a estudiar. Por la capacidad de análisis que tiene la secuenciación automática capilar, los tamaños de amplificación para este método se encuentran de manera rutinaria en un rango 250-700 pb, pudiendo extenderse al entorno de las 1000 pb con las modificaciones oportunas. Debido a las limitaciones de la electroforesis, en un protocolo estándar no se pueden determinar las primeras bases de la secuencia, por lo que el fragmento amplificado debe contener la región que se quiere estudiar más un espacio adicional de al menos 30-50 pb a ambos lados.

1.4.2.4.4.2 Diseño del oligonucleótido cebador

De manera habitual, partiendo de un producto de PCR como fuente del DNA molde, se emplean los mismos cebadores usados en la reacción de amplificación para realizar las reacciones de secuenciación de ambas hebras. En el caso de querer emplear otro cebador para la reacción de secuenciación, los criterios de diseño del oligonucleótido son esencialmente los mismos que se emplean para una reacción de PCR con dos matices. El primero es que la exigencia de especificidad en la hibridación se restringe sólo a la secuencia amplificada y no a otras regiones génicas y el segundo es que, al ser un cebador único en la reacción, sólo hay que considerar la formación de estructuras internas y no otro tipo de interacciones.

Ciertas regiones, como homopolímeros o diversas repeticiones, pueden resultar de difícil secuenciación y terminar prematuramente la lectura de la secuencia. En

estos casos, el diseño de un cebador situado sobre la secuencia conflictiva puede permitir la lectura de la secuencia localizada con posterioridad.

1.4.2.4.4.3 Condiciones de la reacción cíclica

Las condiciones de la reacción cíclica se refieren tanto a los parámetros químicos como a los térmicos a los que se lleva a cabo.

Los parámetros químicos fundamentales son la relación entre la concentración del molde y el cebador, y la concentración usada en la premezcla de reacción que contiene dNTP, ddNTP marcados y polimerasa.

Los parámetros térmicos son el número de ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación aplicados, y el tiempo y temperatura que requiere cada etapa.

En condiciones normales, ambos tipos de parámetros suelen tener unos valores estándar. Ciertos tipos de fragmentos, especialmente los que son especialmente estables o con estructuras secundarias de importancia pueden requerir condiciones especiales o incluso el uso de aditivos similares a los empleados en la reacción de PCR.

1.4.2.4.4.4 Condiciones de la electroforesis

Las condiciones de la electroforesis se refieren al voltaje y tiempo aplicado en la inyección electrocinética, y al voltaje, temperatura y tiempo en el que se desarrolla la separación electroforética.

Cada aparato de secuenciación tiene unas condiciones estándar de inyección electrocinética y electroforesis capilar que están equilibradas para un experimento habitual.

1.4.2.4.5 Protocolo básico

El protocolo básico de un experimento de secuenciación para determinar la secuencia de nucleótidos de una región génica, sobre el que se pueden desarrollar modificaciones, consta de:

- La amplificación por PCR de la secuencia a estudiar.
- La comprobación y cuantificación del producto de reacción
- La purificación del producto de reacción.
- La reacción de secuenciación mediante secuenciación cíclica para cada una de las hebras
- La purificación de los productos de extensión marcados generados en la reacción de secuenciación.
- La electroforesis capilar
- La lectura del cromatograma y de la secuencia obtenida

1.4.3 Pirosecuenciación

1.4.3.1 Introducción

La pirosecuenciación es una técnica de secuenciación de DNA que usa varias reacciones enzimáticas acopladas y bioluminiscencia para monitorizar en tiempo real la liberación del pirofosfato originado en la incorporación catalizada por la DNA polimerasa de desoxinucleótidos a una hebra de DNA recién sintetizada (Ronaghi et al. 1998).

El principio en el que se basa de detección del pirofosfato permite que la información obtenida sea no solamente cualitativa sino también cuantitativa (Nyrén y Lundin 1985). Esta característica permite que además de las aplicaciones que se basan puramente en la determinación de la secuencia (secuenciación *de novo*, resecuenciación, detección de SNP, tipaje viral y bacteriano, p.ej.) pueda emplearse para aquellas que requieren cuantificación, como estados de metilación, pérdidas de heterocigosidad, frecuencias alélicas en acervos de DNA o variación en el número de copias (Lehmann y Tost 2015).

1.4.3.2 Historia

La pirosecuenciación está basada en el concepto de secuenciación por síntesis. Este concepto teórico fue propuesto en forma de patente en 1985 (Malamede 1985) como alternativa automatizable a las técnicas existentes de secuenciación de ruptura química (Maxam y Gilbert 1977) y didesoxinucleótidos terminadores (Sanger et al. 1977). Este concepto consideraba la detección de la no incorporación de dNTP adicionados secuencialmente en una mezcla del DNA molde con un oligonucleótido cebador y DNA polimerasa, pero técnicamente era poco viable. De manera independiente, en 1987 Pål Nyrén también propuso la monitorización de la actividad de la DNA polimerasa como método de secuenciación (Nyrén 1987, 2015) pero empleando para ello un sistema de detección enzimático del pirofosfato liberado que había desarrollado previamente (Nyrén y Lundin 1985). Poco después se propuso el modelo conceptual de la secuenciación fundamentado en el procedimiento de Nyrén (Hyman 1988), aunque nuevamente técnicamente poco viable. La primera prueba de concepto que demostró la viabilidad técnica, aunque con ciertas limitaciones, se basó en el empleo de la técnica de fase sólida inmovilizando el DNA y algunas enzimas del proceso (Nyrén et al. 1993). Con el empleo de apirasa para eliminar la necesidad del lavado en cada ronda de inyección de dNTP (Nyrén 1994) y la sustitución del dATP por el derivado desoxiadenosin- α -tiotriofosfato para mejorar la calidad de la señal (Ronaghi et al. 1996) se presentó ya el protocolo funcional del proceso en fase líquida (Ronaghi

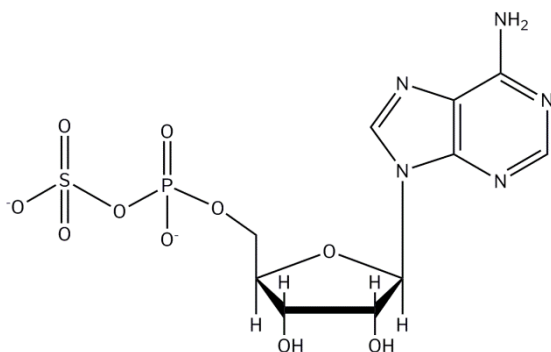
et al. 1998). Dicho protocolo, salvo algunas mejoras en determinadas aplicaciones (Ronaghi 2000; Gharizadeh et al. 2002, 2004; Eriksson et al. 2004), ha sido el definitivo del sistema. En 1997 se fundó la empresa Pyrosequencing AB (posteriormente Biotage) y en 1999 comenzaron a distribuir los primeros equipos comerciales. Cabe destacar que basado en la tecnología de pirosecuenciación se desarrolló la plataforma 454 iniciando la segunda generación de secuenciadores y la secuenciación masiva (Margulies et al. 2005). Esta plataforma permitió obtener el primer genoma de un individuo (del Dr. James D. Watson, codescubridor de la estructura del DNA (Watson y Crick 1953b)) en una plataforma de nueva generación en tan solo dos meses (Wheeler et al. 2008).

1.4.3.3 Fundamento técnico

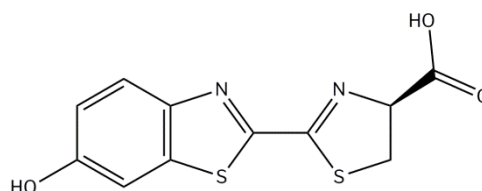
1.4.3.3.1 Reacción enzimática

La pirosecuenciación está basada en la monitorización a tiempo real de la actividad de la DNA polimerasa mediante la conversión en luz, a través de varias reacciones enzimáticas acopladas, del pirofosfato liberado en la incorporación de un desoxinucleótido a una hebra naciente de DNA (Nyrén 1987). Aunque la reacción se lleva a cabo de forma isoterma en el mismo recipiente, se puede estructurar en diferentes pasos.

El primer paso es el establecimiento del sistema que consta de cuatro enzimas y cuatro sustratos. Las enzimas son el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *Escherichia coli* (EC 2.7.7.7) (Klenow et al. 1971), ATP sulfurilasa de *Saccharomyces cerevisiae* (EC 2.7.7.4) (Segel et al. 1987), luciferasa de *Photinus pyralis* (EC 1.13.12.7) (Deluca 1976) y apirasa (tipo Pimpernel) de *Solanum tuberosum* (EC 3.6.1.5) (Komoszynski y Wojtczak 1996). Los sustratos son adenosín-5'-fosfosulfato (APS), D-luciferina (D-LH₂), el DNA de cadena sencilla que actúa de molde y un oligonucleótido cebador.

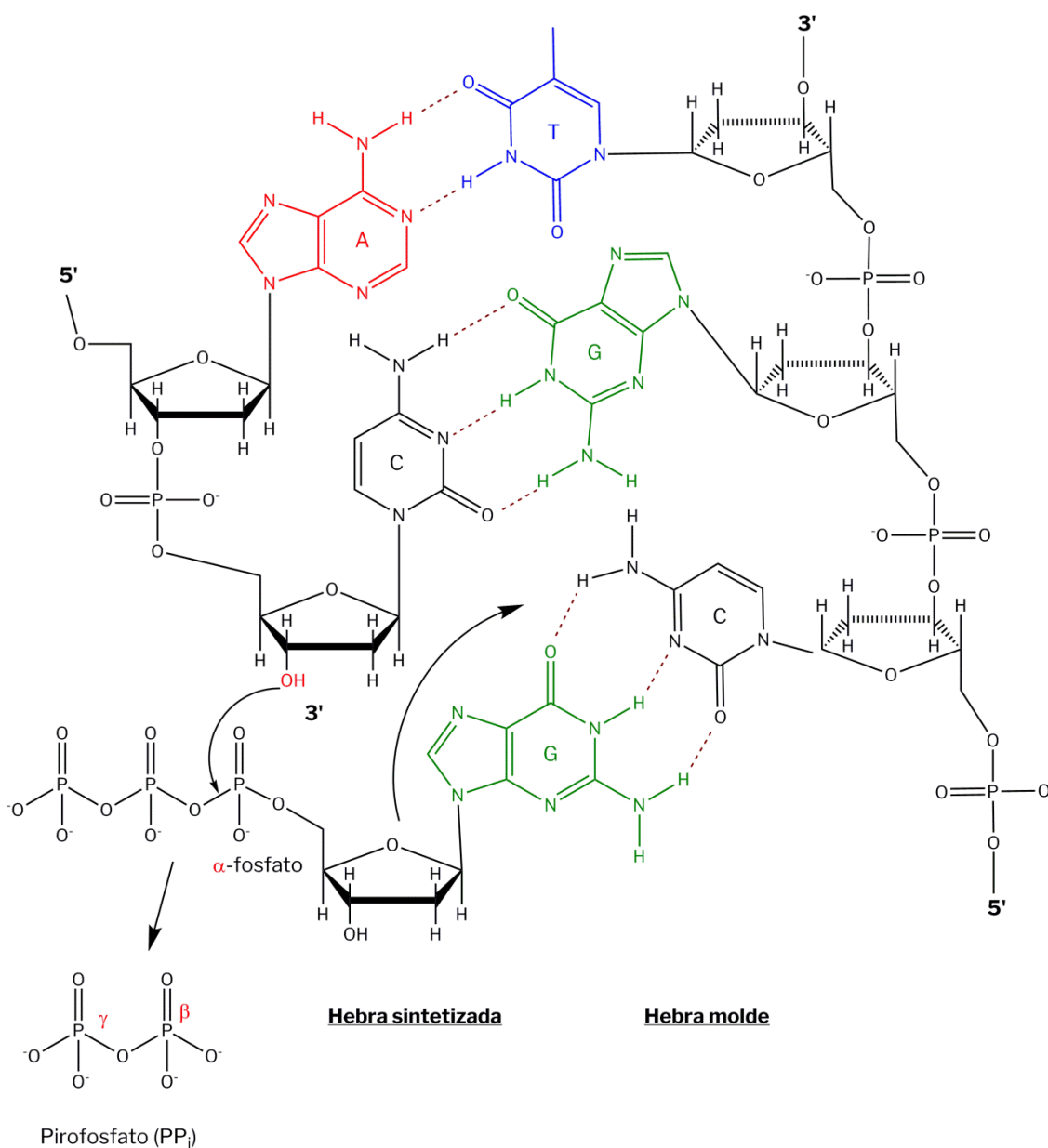
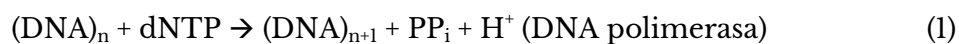


adenosin 5'-fosfosulfato (APS)

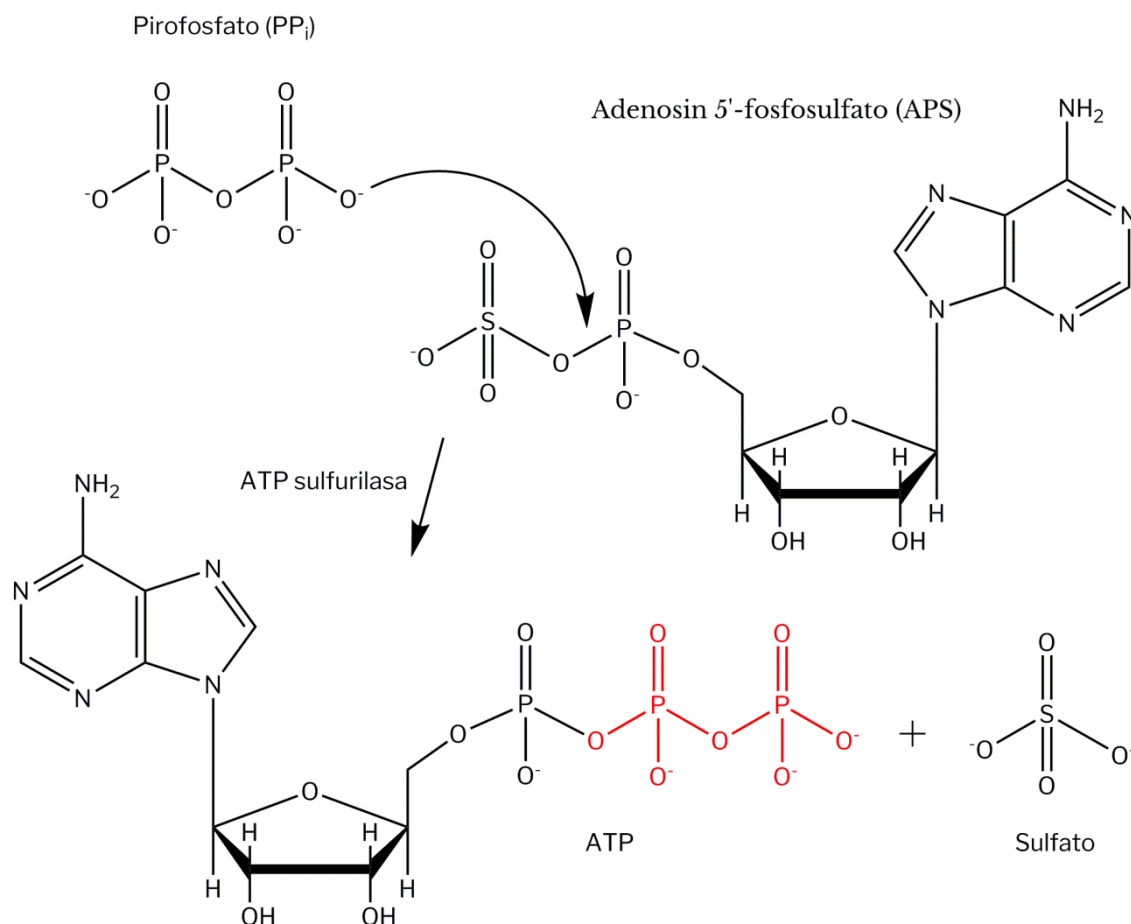
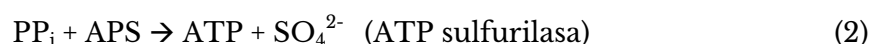


D-luciferina (D-LH₂)

En el siguiente paso se produce la adición de un determinado dNTP. Cuando el cebador se hibrida a la hebra molde de DNA, la DNA polimerasa se une y sintetiza DNA a partir del extremo 3' del cebador si el dNTP añadido es complementario al de la secuencia molde. Como producto de la reacción de condensación (ecuación 1) se obtiene la secuencia elongada y una cantidad equimolar a la cantidad del dNTP incorporado de pirofosfato (PP_i) y protones.

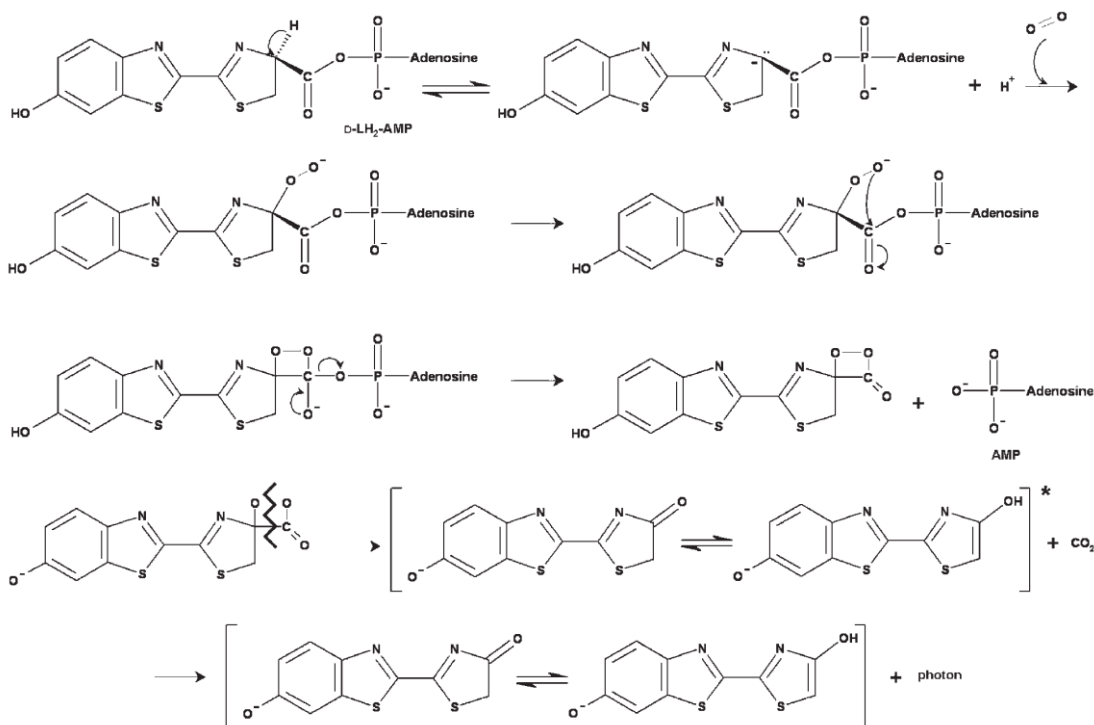
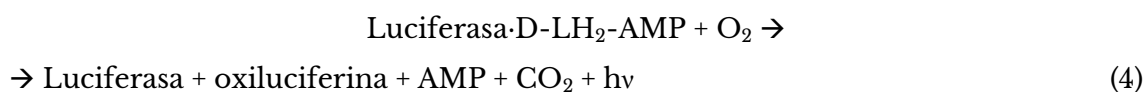
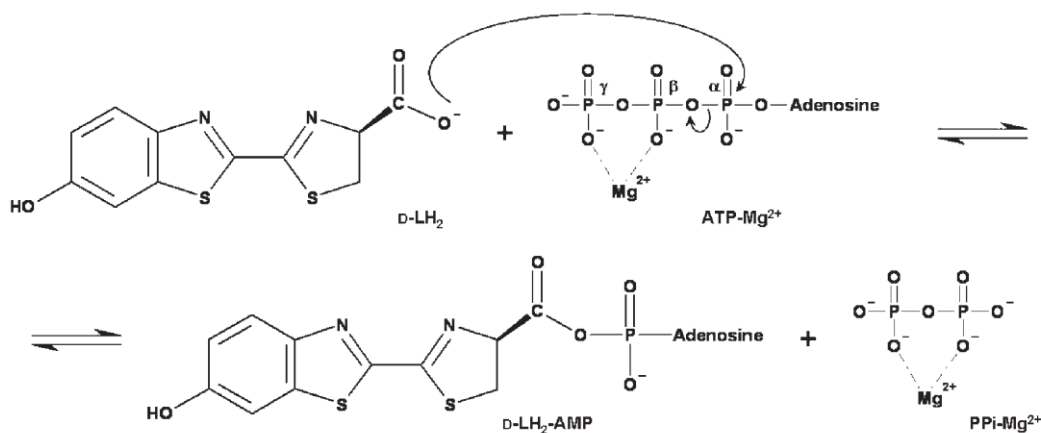


Seguidamente, la ATP sulfurilasa convierte de manera cuantitativa el PP_i generado junto con el APS añadido como sustrato en adenosín trifosfato (ATP)



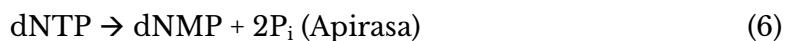
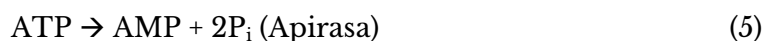
El ATP generado permite la conversión catalizada por la luciferasa de D-LH₂ a oxiluciferina, lo cual libera fotones –con el máximo de emisión a una longitud de onda de 562 nm– que pueden ser detectados fácilmente por un fotodiodo o una cámara con sensor CCD (siglas en inglés de *charge-coupled device*) quedando registrados en forma de pico en el pirograma.





En un primer paso se produce la adenilación de la D-LH₂ –en presencia de iones Mg²⁺– que conduce a la formación de un complejo de este intermediario con la enzima luciferasa y la liberación de adenosín monofosfato (AMP) y PP_i (ecuación 3). Seguidamente la descarboxilación oxidativa de este adenilato resulta en oxiluciferina y la emisión de un fotón (ecuación 4) (Marques y Esteves da Silva 2009). Como puede apreciarse, la emisión de luz es proporcional a la cantidad de PP_i producido y a su vez es directamente proporcional a la cantidad de dNTP incorporados por la DNA polimerasa.

La apirasa hidroliza continuamente el exceso de ATP y los dNTP no incorporados, eliminando la emisión de luz y regenerando el medio de reacción.

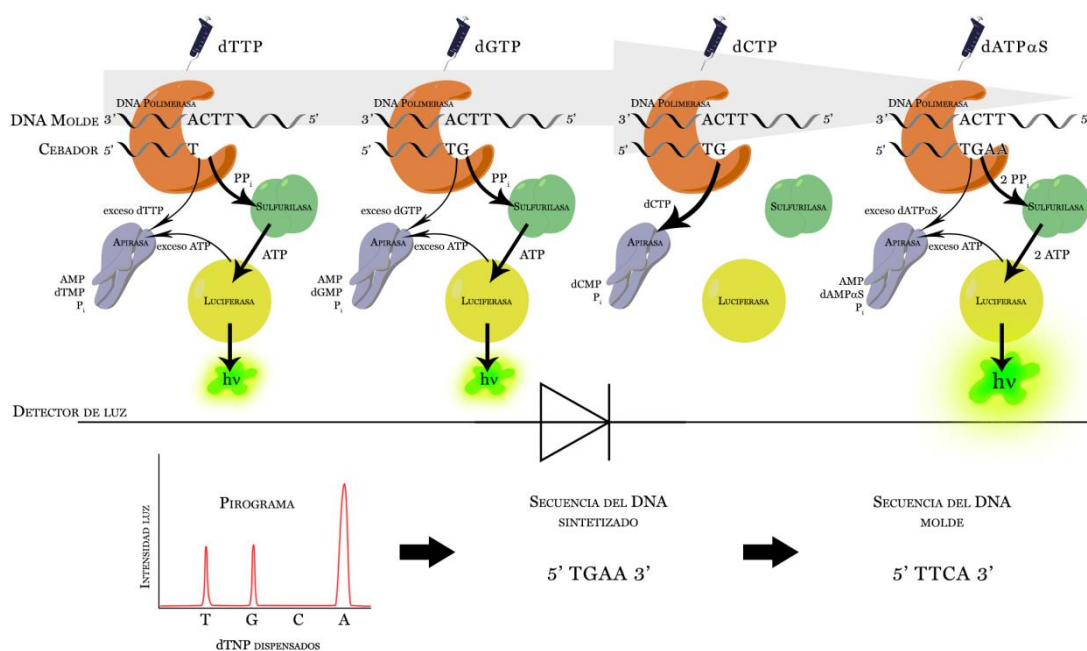


Por último, se continúa cíclicamente este proceso con la adición de los diferentes dNTP (uno por cada inyección). Debido a que el desoxiadenosín trifosfato (dATP) es sustrato de la luciferasa para emitir luz, se emplea el análogo desoxiadenosin- α -tiotrifosfato (dATP α S) que es usado eficientemente por la DNA polimerasa para incorporar en la hebra naciente de DNA pero no es reconocido por la luciferasa.

1.4.3.3.2 Determinación de la secuencia

El mecanismo enzimático descrito tiene dos características principales que permiten su uso para la determinación de la secuencia de DNA. La primera es que la presencia o ausencia de señal lumínica (pico en el pirograma) después de la inyección de un determinado dNTP indica la incorporación o no de este a la hebra de DNA naciente y, por tanto, la identidad de la base complementaria en el molde. La segunda es que la intensidad de la señal (altura del pico en el pirograma) es proporcional al número de nucleótidos incorporados.

De tal manera mediante el control del orden de dispensación de los dNTP es posible ir deduciendo la secuencia de la hebra molde en función de la señal obtenida en el pirograma.



1.4.3.4 Diseño estándar de un experimento

El diseño de un experimento de pirosecuenciación, independientemente de las variaciones que puedan requerir las diferentes aplicaciones existentes, consta principalmente de 4 puntos

1. Amplificación del material genético a analizar
2. Diseño de la sonda que va a actuar como cebador
3. Orden de dispensación de los nucleótidos
4. Análisis e interpretación de los resultados

1.4.3.4.1 Amplificación material genético

El primer paso consiste en generar una cantidad de copias representativa y suficiente de la muestra de DNA que se quiere analizar. En la aplicación clínica de detección de mutaciones y polimorfismos se realiza mediante la amplificación por PCR y captura de la monohebra correspondiente a la región génica estudiada. Debido a la temperatura a la que tiene lugar la reacción de pirosecuenciación y a la longitud de lectura limitada, el tamaño del fragmento amplificado debe ser lo suficientemente largo como para contener y permitir analizar la región estudiada pero a su vez no tener una longitud excesiva que pudiera propiciar la formación de estructuras secundarias que comprometan la reacción de pirosecuenciación.

Debido a que la reacción de pirosecuenciación requiere DNA monohebra como molde, uno de los cebadores empleados se marca con biotina en 5' para que el producto pueda ser purificado posteriormente mediante captura con estreptavidina.

Aunque como norma general todas las amplificaciones por PCR tienen que ser altamente específicas, en el caso de la pirosecuenciación debe prestarse una especial atención a la ausencia de hibridaciones competitivas (especialmente del cebador marcado con biotina), ya que debido a la alta sensibilidad de la detección la validez del resultado obtenido podría verse comprometida.

1.4.3.4.2 Diseño de las sondas cebadoras

La sonda empleada como cebador de la DNA polimerasa actúa como inicio de la elongación catalizada por la misma y debe tener una hibridación específica con el DNA molde de cadena sencilla. Debe tener una longitud suficiente para resultar en una hibridación específica –siendo como mínimo de 15 bases para poder ser reconocido eficientemente por la DNA polimerasa– pero evitando tamaños largos que puedan propiciar cualquier tipo de estructura secundaria interna estable que comprometa su eficiencia.

Para la detección de mutaciones y polimorfismos, la posición en la que se produce la hibridación es muy importante, ya que es la que determinará la secuencia de nucleótidos a dispensar.

En experimentos que empleen más de una sonda es muy importante que, además de la ausencia de estructuras secundarias internas, no se produzca ningún tipo de interacción de relevancia entre las sondas. La formación de cualquier tipo de estructura estable que presente una zona 3' extensible por la polimerasa compromete totalmente los resultados del experimento.

1.4.3.4.3 Orden de dispensación de los nucleótidos

La dispensación de nucleótidos y la señal obtenida tras su inyección es el fundamento base de la pirosecuenciación. Por tanto, el orden de dispensación es un parámetro muy importante de la reacción. Existen dos posibilidades para el orden de dispensación: una dispensación cíclica de los 4 nucleótidos o una dispensación diseñada adaptada a la secuencia. Cuando se lleva a cabo la secuenciación de regiones de secuencia desconocida evidentemente es necesario recurrir a la dispensación cíclica. Sin embargo, al analizar mutaciones y polimorfismos de secuencia conocida, la dispensación diseñada es mucho más rápida y eficiente para detectar las variantes.

Al diseñar una dispensación personalizada, es necesario que dicha dispensación no enmascare las variantes. Para ello es necesario que el pirograma resultante sea diferente en caso de la presencia o ausencia de la variante. Otro factor importante es la fase, que se define como la posición relativa de la DNA polimerasa entre las dos hebras molde (la que tiene la variante y la que no). Si la DNA polimerasa se encuentra en la misma base en ambas secuencias se encuentra en fase, pero si a lo largo de las dispensaciones pierde la alineación pasa a estar fuera de fase. La interpretación del pirograma fuera de fase puede resultar muy compleja, por lo que la dispensación debe mantener la secuenciación en fase lo máximo posible.

1.4.3.4.4 Análisis e interpretación de los resultados

Como se ha visto, con las señales obtenidas en el pirograma tras la dispensación de los nucleótidos puede deducirse la secuencia del molde. Para la detección de mutaciones y polimorfismos con un orden de dispensación personalizado, si éste ha sido diseñado adecuadamente, la determinación de la presencia o ausencia de la variante resulta evidente. En el caso de dispensaciones no óptimas, la interpretación de los resultados puede ser muy compleja e incluso impedir la detección de las variantes.

1.4.3.5 Protocolo básico

El protocolo básico de un experimento de pirosecuenciación para la determinación de un polimorfismo o mutación, sobre el que se pueden desarrollar modificaciones, consta de:

- La amplificación por PCR de la secuencia que contiene la variante.
- La purificación de una de las hebras para usarla como molde.
- La incubación de la hebra purificada con la sonda de secuenciación.
- La dispensación de nucleótidos prediseñada.
- La interpretación del pirograma obtenido.

1.5 Justificación del trabajo realizado

Considerando el aporte a la práctica clínica que supone tener un procedimiento de diagnóstico genético eficaz para diversos trastornos del metabolismo lipídico, resulta de un gran interés el desarrollo y optimización de técnicas y estrategias que faciliten dicho diagnóstico.

2. HIPÓTESIS

El conocimiento avanzado de los fundamentos de las técnicas de biología molecular disponibles para el análisis de ácidos nucleicos, junto con el de las bases moleculares de la enfermedad estudiada (considerando los genes involucrados, tipo y frecuencia de mutaciones, y la frecuencia en la población) y el aprovechamiento máximo de los recursos disponibles, permite desarrollar y optimizar métodos de diagnóstico genético de dichas enfermedades.

3. OBJETIVOS

3.1 Principales

1. Utilizar y optimizar las técnicas de biología molecular disponibles para desarrollar las estrategias de análisis más adecuadas para el diagnóstico genético de trastornos del metabolismo lipídico considerando sus características y sus bases moleculares.
2. Desarrollar y optimizar métodos para el diagnóstico para las hipercolesterolemias autosómicas dominantes relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (genes LDLR, APOB, APOE, PCSK9).
3. Desarrollar y optimizar métodos para el diagnóstico de las siguientes lipidosis: enfermedad de Gaucher (gen GBA) y enfermedad de Niemann-Pick (genes SMPD1, NPC1 y NPC2).

3.2 Secundarios

1. Determinar toda la base teórica, química y termodinámica de las técnicas empleadas, para así aumentar la eficiencia en el diseño, facilitar la resolución de problemas y permitir integrar en el proceso las novedades técnicas que puedan desarrollarse.
2. Analizar las bases moleculares de los trastornos y enfermedades estudiados, para avanzar en la comprensión de la relación genotipo-fenotipo y de esta manera ayudar a la interpretación de los resultados de los análisis genéticos.
3. Obtener un conocimiento basado en la experiencia que permita desarrollar protocolos y estrategias para otras enfermedades o trastornos de una manera rápida y eficaz

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Preparación de reactivos

4.1.1 Disoluciones tampón de pH

4.1.1.1 TE 100X

Se mezclaron 121,1 gr de Tris base (Trizma base – Sigma-Aldrich) y 33,6 gr de EDTA (Sigma-Aldrich) con agua desionizada hasta un litro. Se ajustó el pH a 8 con ácido clorhídrico (Carlo Erba). Se esterilizó por autoclavado, tras lo cual se almacenó a 4°C.

4.1.1.2 TAE 50X

Se mezclaron 242 gr de Tris base (Trizma base – Sigma-Aldrich), 57,1 mL de ácido acético glacial (Carlo Erba) y 18,6 gr de EDTA (Sigma-Aldrich) con agua desionizada y autoclavada hasta un litro. Se comprobó que el pH estaba en la zona de pH 8, tras lo que se almacenó a temperatura ambiente.

4.1.2 Tampones de carga para electroforesis

4.1.2.1 Colorante azul 10X

Se añadieron 10 gr de Ficoll PM 400 (Amersham Biosciences), 0,1 gr de xilenocianol (Sigma-Aldrich) y 40 mL de agua desionizada en un tubo Falcon (Brand) de 50 mL. Se mezcló por agitación orbital durante 24 horas, tras lo que se almacenó a 4°C.

4.1.2.2 Colorante marrón 10X

Se añadieron 10 gr de Ficoll PM 400 (Amersham Biosciences), 0,1 gr de azul de bromofenol (Sigma-Aldrich) y 40 mL de agua desionizada en un tubo Falcon (Brand) de 50 mL. Se mezcló por agitación orbital durante 24 horas, tras lo que se almacenó a 4°C.

4.1.2.3 Colorante marrón diluido 10X

Se mezclaron 250 µL de colorante marrón 10X con 1000 µL de TAE 1X y se almacenó a 4°C.

4.1.3 Matrices para electroforesis

4.1.3.1 Gel de agarosa estándar 0,5%

Se añadieron 0,5 gr de agarosa de media resolución AG-0620 (Ecogen) por cada 100 mL de TAE 1X. Mediante calentamiento en microondas con agitación periódica se llevó a ebullición hasta la fusión de la agarosa añadida. Se dejó enfriar hasta 65°C en un baño termostático calefactado y se añadió como tinte de marcaje 100 µL de bromuro de etidio 1000X o alternativamente 10 µL de SybrSafe 10 000X (Invitrogen) por cada 100 mL de agarosa. Se almacenó hasta su uso en baño termostático a 65°C.

4.1.3.2 Gel de agarosa estándar 2%

Se añadieron 2 gr de agarosa de media resolución AG-0620 (Ecogen) por cada 100 mL de TAE 1X. Mediante calentamiento en microondas con agitación periódica se llevó a ebullición hasta la fusión de la agarosa añadida. Se dejó enfriar hasta 65°C en un baño termostático calefactado y se añadió como tinte de marcaje 100 µL de bromuro de etidio 1000X o alternativamente 10 µL de SybrSafe 10 000X (Invitrogen) por cada 100 mL de agarosa. Se almacenó hasta su uso en baño termostático a 65°C.

4.1.3.3 Gel de agarosa NuSieve 3%

Se añadieron 3 gr de agarosa de bajo punto de fusión NuSieve GTG (Lonza) por cada 100 mL de TAE 1X. Mediante calentamiento en microondas con agitación periódica se fundió la agarosa añadida. Se dejó enfriar durante dos minutos a temperatura ambiente y se añadió como tinte de marcaje 100 µL de bromuro de etidio 1000X o alternativamente 10 µL de SybrSafe 10 000X (Invitrogen) por cada 100 mL de agarosa. Se almacenó hasta su uso en baño termostático a 65°C.

4.1.4 Tampones para pirosecuenciación

4.1.4.1 Tampón de unión

(Tris-HCl 10mM; NaCl 2 M; EDTA 1 mM; Tween 20 0,1% v/v; pH 7,6)

Se añadieron 1,21 gr de Tris base (Trizma base – Sigma-Aldrich), 117 gr de cloruro sódico (Panreac) y 0,292 gr de EDTA (Sigma-Aldrich) en 900 mL de agua Milli-Q (Millipore). Se ajustó el pH a 7,6 con ácido clorhídrico 1 M (Carlo Erba) y se filtró con un filtro de 0,22 µm Millex GP (Millipore). Por último se añadió 1 mL de

Tween 20 (Sigma-Aldrich) y se enrasó con agua Milli-Q hasta 1 L, tras lo que se almacenó a 4°C.

4.1.4.2 Tampón de hibridación

(Tris-acetato 20 mM; Acetato magnésico 2 mM; pH 7,6)

Se añadieron 2,42 gr de Tris-base (Trizma – Sigma-Aldrich) y 0,43 gr de acetato magnésico tetrahidratado (Sigma-Aldrich) en 900 mL de agua Milli-Q (Millipore). Se ajustó el pH a 7,6 con ácido acético glacial (Carlo Erba) y se enrasó a 1 L., tras lo que se almacenó a 4°C.

4.1.4.3 Tampón de lavado

(Tris-acetato 10 mM; pH 7,6)

Se añadieron 1,21 gr de Tris-base (Trizma – Sigma-Aldrich) a 900 mL de agua Milli-Q (Millipore), se ajustó el pH a 7,6 con ácido acético glacial (Carlo Erba) y se enrasó a 1 L.

4.1.5 Disoluciones y reactivos químicos

4.1.5.1 Acetato amónico 10M

Se disolvieron poco a poco 77 gr de acetato amónico (Carlo Erba) en 70 mL de agua desionizada. Una vez disuelto se enrasó a 100 mL y se filtró con un filtro de 0,22 µm Millex GP (Millipore), tras lo que se almacenó a 4°C.

4.1.5.2 Acetato sódico 3M

Se disolvieron 408,1 gr de acetato sódico trihidratado (Panreac) en 800 mL de agua desionizada. Se ajustó el pH con ácido acético glacial (Carlo Erba) a pH 5,2. Se enrasó a un litro, se esterilizó por autoclavado y se almacenó a temperatura ambiente.

4.1.5.3 Bromuro de etidio 1000X – 0,5 mg/mL

Se mezclaron 50 mg de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) y 100 mL de agua desionizada. Se cubrió con papel de aluminio y se mezcló con agitación magnética durante 30 minutos. Se almacenó en una botella opaca cubierta con papel de aluminio a 4°C.

4.1.5.4 EDTA 0,5 M pH 8

Se añadieron 186,1 gr de EDTA disódico (Panreac) a 800 mL de agua desionizada. Se mezcló por agitación magnética junto con la adición de aproximadamente 20 gr de lentejas de NaOH (Panreac) hasta su disolución a pH 8. Se enraso hasta un litro y se esterilizó mediante autoclavado, tras lo que se almacenó a 4°C.

4.1.5.5 Suero salino 0,9%

Se añadieron 4,50 gr de NaCl (Panreac) a 500 mL de agua desionizada y autoclavada. Se filtró con un filtro de 0,22 µm Millex GP (Millipore) y se conservó a 4°C.

4.1.6 Reactivos para PCR

4.1.6.1 dNTP 2mM (con dITP/dGTP 75:25)

Se pesaron 5 mg de 2'-desoxiinosina trifosfato trisódica (Sigma-Aldrich) y se diluyeron en 89,6 µL de agua ultrapura (Gibco) para obtener una concentración 100 mM. En un tubo Falcon (Brand) de 15 mL se añadieron 50 µL de dATP, 50 µL de dTTP, 50 µL de dCTP, 12,5 µL de dGTP (100 mM – Invitrogen), 37,5 µL de la disolución de dITP y 9,8 mL de agua ultrapura. Se mezcló bien, se hicieron alícuotas de 500 µL en tubos Eppendorf de 1,5 mL y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

4.2 Procedimientos generales

4.2.1 Obtención material genético

4.2.1.2 Criterios de selección de muestras

Para la puesta a punto de las diferentes técnicas se empleó DNA genómico de donantes de los proyectos FIS Ref. 00/0546, PGE/FEDER SAF 2001-2466, FIS G03/181 y FIS G03/054.

Las muestras de los diferentes análisis fueron obtenidas de pacientes y familiares, seleccionadas en cada caso por diferentes criterios clínicos, firmando un consentimiento informado para la autorización de los análisis genéticos y con la autorización del Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA)

4.2.1.2 Obtención de la muestra

Se extrajeron aproximadamente 10 mL de sangre periférica por punción venosa en tubo Vacutainer con el anticoagulante EDTA (Beckton Dickinson).

Se centrifugó la sangre a 3500 rpm (2850 x g) y 4°C en una centrífuga Allegra X-15R con rotor SX4750A (Beckman Coulter) durante 15 minutos para separar el plasma sanguíneo de los elementos formes. Se retiró y alicuotó el plasma, conservándolo en ultracongelación a -80°C para otros análisis posteriores. Se resuspendió la fracción celular con suero fisiológico hasta alcanzar el volumen original y se almacenó a 4°C hasta la obtención de DNA genómico durante un máximo de tres días.

Alternativamente, se obtuvieron células epiteliales mediante frotis bucal del interior de la mejilla con el hisopo del kit BuccalAmp DNA Extraction Kit (Epicentre). Tras el frotis, los hisopos se dejaron secar al aire durante 10 minutos y se almacenaron hasta la posterior extracción del material genético.

4.2.1.3 Obtención de DNA genómico

4.2.1.3.1 A partir de sangre

Se aisló DNA genómico a partir de la sangre periférica recogida con anterioridad utilizando el producto comercial Nucleon BACC Genomic DNA (GE Healthcare) con el siguiente protocolo:

En un tubo Falcon (Brand) de 50 mL se añadió la sangre recogida y 4 volúmenes del reactivo A en condiciones de esterilidad. El reactivo A tenía en su composición

una concentración elevada de sacarosa para romper los eritrocitos por choque osmótico. Tras mezclar por agitación durante 5 minutos se centrifugó a 2550 rpm (1500 x g) durante 10 minutos en una centrífuga Allegra X-15R con rotor SX4750A (Beckman Coulter). Se descartó el sobrenadante y se añadieron 2 mL de reactivo B para resuspender el pellet celular obtenido mediante agitación vorticial. El reactivo B estaba formulado para lisar leucocitos. Una vez resuspendido, se transfirió todo el volumen a un tubo Falcon de 15 mL y se añadieron 500 µL de perclorato sódico 5M, mezclando por inversión varias veces, para favorecer la precipitación de proteínas. Se añadieron 2 mL de cloroformo (Carlo Erba) y se mezcló por inversión varias veces, dejando en reposo hasta la formación de dos fases. Sin alterar las fases, se añadió 300 µL de resina Nucleon (que se unía covalentemente a las proteínas de manera específica) y se centrifugó a 2550 rpm (1500 x g) durante 5 minutos. Se transfirió la fase superior a otro tubo Falcon de 15 mL, sin alterar la capa formada en la interfase por la resina, y se añadieron dos volúmenes de etanol absoluto frío mezclando por inversión hasta la formación del precipitado de DNA. Se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos para formar un pellet y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 2 mL de etanol 70% v/v y se mezcló por inversión varias veces. Se volvió a centrifugar y se descartó el sobrenadante. Tras dejar secar el pellet a temperatura ambiente durante 10 minutos (hasta que se evaporó el resto de etanol) se resuspendió en 300 µL de tampón TE 1X mediante 24 horas de agitación orbital. Una vez resuspendido se almacenó a 4°C.

4.2.1.3.2 A partir de células bucales

Se aisló DNA genómico a partir de las células epiteliales recogidas previamente con hisopo mediante el kit BuccalAmp DNA Extraction Kit (Epicentre). Brevemente, se introdujo la cabeza del hisopo en un tubo Eppendorf de 1,5 mL conteniendo 1 mL de QuickExtract DNA Extraction Solution (Epicentre) rotando el cepillo contra las paredes para facilitar el desprendimiento de las células epiteliales. Se agitó mediante vórtex durante 20 segundos y se incubó a 65°C durante 5 minutos. Posteriormente se volvió a agitar mediante vórtex 20 segundos y se incubó a 98°C durante 2 minutos, para finalmente almacenar a 4°C. Este procedimiento emplea un tratamiento térmico para lisar las células epiteliales y para degradar térmicamente los compuestos que degradan el DNA o inhiben la PCR (Ruano et al. 1992).

4.2.1.4 Determinación concentración y pureza del DNA extraído

4.2.1.4.1 Cuantificación del DNA por espectrofotometría

Se determinó la concentración del DNA genómico obtenido mediante espectrofotometría midiendo la absorbancia ultravioleta a 260 nm, pico de absorción de las bases nitrogenadas que forman parte de los ácidos nucleicos. Para ello se introdujeron 2 μL de muestra y 400 μL de tampón TE 1X en una cubeta de cuarzo (Hellma 108 QS) de 10 mm de paso de luz en el espectrofotómetro GeneQuant (Amersham Biosciences). Aplicando la ley de Beer-Lambert y con el coeficiente de absorción a 260 nm para el DNA de doble cadena se calculó la concentración de la muestra, teniendo en cuenta que con la longitud que tenía la cubeta una unidad de absorbancia correspondía a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se determinó la pureza del DNA genómico obtenido midiendo adicionalmente la absorbancia ultravioleta a 280 nm, pico de absorción de los aminoácidos aromáticos y por tanto indicativos de la presencia de proteínas. Empleando el cociente entre la absorbancia a 260 nm y a 280 nm, se consideró que la muestra era pura si los valores del cociente estaban comprendidos entre 1,8 y 2.

4.2.1.4.2 Cuantificación del DNA por fluorimetría

Para determinar la concentración de DNA genómico en los casos que requerían una cuantificación más precisa se utilizó un procedimiento fluorimétrico. Para ello se empleó el fluorímetro Qubit (Invitrogen) y el kit comercial Quan-iT dsDNA HS (Invitrogen) que contenía un fluoróforo específico para el DNA de doble cadena. Brevemente, se añadió 1 μL de muestra a 199 μL del tampón que contenía el fluoróforo y se dejó incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se realizó la recta de calibrado en el aparato con dos controles de concentración incluidos en el kit. Finalmente se midió la fluorescencia y con la calibración previa se determinó la concentración obtenida.

4.2.1.5 Purificación de DNA con fenol-cloroformo

Las muestras cuyo cociente de absorbancias a 260 nm y 280 nm no estaba comprendido entre 1,8 y 2 fueron purificadas mediante extracción con disolventes orgánicos.

En un tubo Eppendorf de 1,5 mL se añadieron 250 μL del DNA impuro y 250 μL de fenol equilibrado con Tris-HCl 10 mM a pH 8 (Sigma-Aldrich). Se mezcló por inversión y se centrifugó durante 10 minutos a 12 000 rpm (11 750 x g) en una

microcentrífuga 5415C (Eppendorf). Tras la separación de fases, se transfirió la fase acuosa superior a otro tubo y se añadieron 250 μ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 saturado con Tris 10 mM a pH 8 (Sigma-Aldrich). Se mezcló por inversión y se centrifugó en las mismas condiciones que en el paso anterior. Nuevamente la fase superior se transfirió a otro tubo y se añadieron 250 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (Sigma-Aldrich). Se mezcló por inversión y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Por último, se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se añadió un tercio del volumen de acetato amónico 10M y dos volúmenes de etanol absoluto frío que hicieron precipitar el DNA. El DNA precipitado se aisló por adhesión a la punta de una pipeta Pasteur, se lavó con etanol al 70% v/v frío y se resuspendió en 250 μ L de tampón TE 1X mediante agitación suave a temperatura ambiente.

4.2.1.6 Amplificación del DNA genómico total

En los casos en los que no se disponía de suficiente cantidad de DNA para llevar a cabo los análisis previstos se llevó a cabo la amplificación enzimática del genoma completo.

Para ello se usó el producto comercial GenomiPhi DNA Amplification (GE Healthcare) basado en la amplificación isoterma de la enzima DNA polimerasa Phi29.

Brevemente, 1 μ L del DNA molde se añadió a 9 μ L del tampón de muestra (que contenía oligonucleótidos hexámeros de secuencia aleatoria) y se calentó a 95°C durante 3 minutos para desnaturalizar el DNA molde. Tras su enfriamiento, se mezcló con 9 μ L del tampón de reacción (que contenía dNTPs, sales y el pH para el funcionamiento óptimo de la enzima) y 1 μ L de enzima y se incubó a 30°C durante 18 horas. Posteriormente se incubó a 65°C durante 10 minutos para inactivar la enzima.

4.2.2 Diseño protocolo y experimentos

4.2.2.1 Obtención de las secuencias genéticas

Se obtuvieron las secuencias de referencia del DNA de los genes a estudiar de los repositorios de secuencias Ensembl (Zerbino et al. 2018) y RefSeq (O'Leary et al. 2016). En el caso de genes con más de un transcrito reportado se empleó como referencia la isoforma más frecuente. Las referencias empleadas se indican a continuación

	Gen Ensembl	Transcrito Ensembl	Gen RefSeq	mRNA RefSeq
APOB	ENSG00000084674	ENST00000233242.5	NG_011793.1	NM_000384.2
APOE	ENSG00000130203	ENST00000252486.8	NG_007084.2	NM_000041.3
LDLR	ENSG00000130164	ENST00000558518.5	NG_009060.1	NM_000527.4
PCSK9	ENSG00000169174	ENST00000302118.5	NG_009061.1	NM_174936.3
GBA	ENSG00000177628	ENST00000368373.7	NG_009783.1	NM_000157.3
SMPD1	ENSG00000166311	ENST00000342245.8	NG_011780.1	NM_000543.4
NPC1	ENSG00000141458	ENST00000269228.9	NG_012795.1	NM_000271.4
NPC2	ENSG00000119655	ENST00000555619.5	NG_007117.1	NM_006432.3

4.2.2.2 Obtención de las variantes descritas asociadas a cada gen

Se obtuvieron las variantes y mutaciones descritas con anterioridad para cada uno de los genes mediante consulta en bibliografía y bases de datos en línea.

La consulta bibliográfica se realizó mediante la búsqueda de artículos publicados indexados en la base de datos del NCBI PubMed (<http://pubmed.gov>) (NCBI Resource Coordinators 2017) y en el libro *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver et al. 2001).

Las principales bases de datos de mutaciones en línea consultadas fueron:

- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (<https://omim.org/>)
- The Human Gene Mutation Database, HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>)
- Leiden Open Variation Database, LOVD (<https://databases.lovd.nl/shared/genes>)

Adicionalmente se consultó para los genes estudiados bases de datos específicas listadas en Locus Specific Database list (http://grenada.lumc.nl/LSDB_list/lstdbs) del Proyecto Varioma Humano (<http://www.humanvariomeproject.org/>).

4.2.2.3 Amplificación por PCR de las regiones génicas a estudiar

4.2.2.3.1 Diseño de oligonucleótidos cebadores

Se diseñaron los oligonucleótidos cebadores correspondientes a la amplificación por PCR de la región genómica que se deseaba estudiar usando los programas informáticos Oligo6, Oligo7 (Molecular Biology Insights) y VisualOMP (DNA Software). Se siguió el criterio de diseño explicado anteriormente (cf. apartado 1.4.1.4.2) de manera general, adaptándolo a las necesidades y peculiaridades de cada experimento.

4.2.2.3.1 Síntesis oligonucleótidos y diluciones

Se solicitó la síntesis de oligonucleótidos cebadores por el método de la fosforamidita en fase sólida, con una escala de síntesis de 50 nmol y purificación por desalado a un proveedor comercial (Invitrogen). Para la reacción de amplificación para pirosecuenciación se solicitó el oligonucleótido cebador reverso modificado con biotina en 5' y purificado por HPLC (Isogen Life Sciences).

Los oligonucleótidos se recibieron liofilizados, por lo que se procedió a su resuspensión con agua ultrapura (Gibco) a una concentración de almacenaje de 100 μ M y se conservaron a -20°C hasta su empleo.

4.2.2.3.3 Puesta a punto de la amplificación por PCR

4.2.2.3.3.1 Parámetros químicos

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en tubos de 0,2 mL o placas de 96 pocillos de pared fina de grado PCR (Abgene) y con un volumen total de reacción de 20 μ L como máximo. Se empleó como punto de partida las concentraciones de reactivos recomendadas por el fabricante del kit de la DNA polimerasa empleada. En función del resultado obtenido y de la estrategia de amplificación, cuando fue necesario se modificó alguna concentración con el criterio que se explica en el apartado 6.3.1.4.

4.2.2.3.3.2 Parámetros térmicos

Se empleó como punto de partida un protocolo térmico estándar, consistente en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C seguidos de 35 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 55°C y 1 minuto por Kb a 72°C. Por último se realizó un paso final de elongación durante 5 minutos a 72°C seguidos de un enfriamiento a 4°C. En función del resultado obtenido y de la estrategia de amplificación se realizaron los cambios pertinentes con el criterio explicado en el apartado 6.3.1.5.

4.2.2.3.3.3 Determinación experimental de la temperatura de hibridación (T_a) óptima

Se determinó la T_a mediante diferentes reacciones de PCR en gradiente de temperatura. Se realizaron 8 reacciones de PCR simultáneas en un termociclador T100 (Bio-Rad) en la columna de una placa de 96 pocillos, con las mismas concentraciones de reactivos pero en las que se estableció un gradiente en la

temperatura de hibridación entre el pocillo superior e inferior. Partiendo de la T_a obtenida por una fórmula empírica (Rychlik et al. 1990) se estableció una temperatura 5°C superior en el pocillo A y 5°C inferior en el pocillo H, quedando los pocillos intermedios con temperaturas intermedias. Se comprobó la temperatura, o rango de temperaturas, en las que se obtenía mejor amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa como se describe más adelante.

4.2.2.3.3.4 Uso de aditivos químicos

En los casos en los que no fue posible optimizar la amplificación simplemente por modificaciones térmicas o de concentraciones de los componentes estándar de la reacción se procedió al uso de distintos aditivos potenciadores de la reacción de diferentes propiedades.

Se empleó glicerol (Sigma-Aldrich), en un porcentaje 15-20% v/v, debido a que incrementaba la estabilidad térmica de la polimerasa y disminuía la temperatura de fusión entre 2,5 y 3°C por cada 10% (Cheng et al. 1994).

Se empleó dimetilsulfóxido (DMSO)(Sigma-Aldrich), en un porcentaje 1-10% v/v, debido a que aceleraba la renaturalización, le otorgaba al DNA estabilidad térmica frente a la depurinación, disminuía la temperatura de fusión 5,5-6°C por cada 10% a pesar de disminuir la estabilidad térmica de la polimerasa (Winship 1989).

Se empleó formamida (Sigma-Aldrich), en un porcentaje 1,25-10%, debido a que aumentaba la especificidad de la amplificación en fragmentos cortos con alto contenido en G+C (Sarkar et al. 1990).

Se empleó betaína (Sigma-Aldrich), en una concentración final 0,8-1,6M, debido a que reducía la dependencia de la temperatura de fusión con la composición de bases, siendo equivalente el par A:T al G:C a una concentración 5M (Rees et al. 1993)

4.2.2.3.3.5 Enzimas termoestables utilizadas

Se emplearon diferentes tipos de DNA polimerasa en función de sus propiedades y de los requerimientos específicos de la aplicación realizada.

Como DNA polimerasa general, para amplificaciones normales de un tamaño inferior a 3 Kb, se empleó EcoTaq (Ecogen) y Platinum Taq (Invitrogen). La actividad polimerasa de Platinum Taq estaba inhibida mediante la unión de un anticuerpo específico hasta la desnaturalización térmica, permitiendo realizar de manera automática la técnica de PCR con arranque en caliente (*hot start*).

Para amplificaciones normales de un tamaño superior, se empleó Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen) para tamaños de hasta 10 Kb y Expand Long Template (Roche) para tamaños de hasta 25 Kb.

Para amplificaciones especiales, como ciertas PCR multiplex, se empleó AccuPrime Taq (Invitrogen) –que, además de permitir automatizar la técnica *hot start*, empleaba ciertas proteínas termoestables como potenciadores de la hibridación específica de los cebadores– y AmpliTaq Gold (Invitrogen).

Por último, para amplificaciones de regiones complicadas con alto contenido G+C y formación de estructuras secundarias, se empleó AccuPrime GC-Rich DNA polimerasa (Invitrogen) y AmpliTaq Gold 360 (Invitrogen).

4.2.2.3.3.6 Rediseño de oligonucleótidos cebadores

Cuando no fue posible optimizar la reacción de PCR bajo ningún parámetro químico, enzimático ni térmico se procedió al rediseño de los cebadores.

4.2.2.3.3.6 Comprobación de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa.

Se comprobó el resultado de la amplificación por electroforesis en gel de agarosa. Brevemente, se preparó los geles en portageles de 6 cm x 10 cm o 15 cm x 10 cm (BioRad) con la agarosa correspondiente al tamaño del fragmento a comprobar. Rutinariamente se empleó agarosa convencional al 2%, reservando la agarosa 0,5% para fragmentos de tamaño superior a las 5 Kb y la agarosa NuSieve GTG 3% para resolver con precisión fragmentos inferiores a las 400 b. Se cargó a los pocillos 2 µL del producto de PCR mezclado con 2 µL del tampón de carga adecuado para evitar la interferencia del colorante con la visualización del producto. Para ello consideró que, en agarosa convencional, el xilenocianol migraba de manera equivalente a un fragmento de 4000-5000 b y que el azul de bromofenol lo hacía como un fragmento de 400-500 b (Guilliatt 2002). Adicionalmente, para verificar el tamaño y cantidad de producto amplificado, se añadió a uno de los pocillos un marcador de tamaño o masa.

Nombre marcador	Rango de tamaño	Uso principal
Low DNA Mass Ladder (Invitrogen)	100-2000b	Tamaño y cuantificación
High DNA Mass Ladder (Invitrogen)	1000-10 000b	Tamaño y cuantificación (grandes fragmentos)
100 bp Ladder (Biotools)	100-1000b	Tamaño (pequeños fragmentos)
1 Kb DNA Extension Ladder (Invitrogen)	500-40 000b	Tamaño (grandes fragmentos)

La electroforesis se llevó a cabo en cubetas rellenas con TAE 1X con la fuente de alimentación PowerPac 300 (BioRad) en el rango de 94-100 V durante un periodo variable entre 20 y 60 minutos en función del grado de separación requerido.

La visualización de los productos de la PCR separados se realizó en un transluminador Gel Doc 2000 (BioRad) mediante la captura de la fluorescencia emitida por el tinte de marcaje de DNA tras su excitación con luz ultravioleta. Para estimar la concentración del producto obtenido se empleó el programa de análisis MultiAnalyst 1.1 (BioRad) para cuantificar por densitometría su intensidad emitida empleando como referencia el marcador de tamaño y masa.

Adicionalmente, cuando se trabajó con placas de 96 pocillos enteras se usaron geles prefabricados de agarosa al 2% con el sistema Ready-To-Run (Amersham Biosciences) y el sistema E-Gel (Invitrogen) para comprobar todas las muestras simultáneamente.

4.2.2.4 Determinación de la secuencia de DNA

4.2.2.4.1 Secuenciación automática capilar

Para determinar la secuencia de nucleótidos del fragmento de DNA amplificado se empleó la técnica de Sanger mediante secuenciación automática capilar con terminadores marcados por fluorescencia y partiendo del producto de PCR obtenido previamente. Por cada producto de PCR se generaron dos reacciones de secuenciación, una para cada hebra. Para ello se utilizaron los secuenciadores CEQ 8000 Genetic Analysis System y GenomeLab GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter) de 8 capilares y el secuenciador MegaBACE 500 DNA Analysis System (GE Healthcare) de 48 capilares.

4.2.2.4.1.1 Purificación de la reacción de PCR

Con el objeto de eliminar los oligonucleótidos cebadores y dNTP no incorporados en la reacción de PCR y que podían alterar la reacción de secuenciación se llevó a cabo la purificación enzimática del producto obtenido en la PCR (Hanke y Wink 1994; Werle et al. 1994).

Para ello se empleó el producto comercial ExoSAP-IT (Amersham Biosciences), consistente en una mezcla de exonucleasa I de *Escherichia Coli* y fosfatasa alcalina de *Pandalus borealis* (la exonucleasa I degradaba el DNA de cadena sencilla en sentido 3' → 5' mientras que la fosfatasa eliminaba los grupos 5' fosfato). Brevemente, se añadió 5 µL del producto de PCR y 2 µL de ExoSAP-IT y se incubó durante 30 minutos a 37°C, seguido de una incubación a 80°C durante 15 minutos

para desactivar las enzimas térmicamente para acabar enfriando a 4°C, todo ello en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems).

De manera alternativa, para la secuenciación de productos que habitualmente presentaron resultados robustos y consistentes se sustituyó la purificación enzimática por la simple dilución con agua ultrapura (Gibco)

4.2.2.4.1.2 Reacción de secuenciación

4.2.2.4.1.2.1 Sistema CEQ/GeXP

Para la reacción de secuenciación realizada para los secuenciadores CEQ 8000 y GenomeLab GeXP se empleó el kit comercial GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing Quick Start (Beckman Coulter). Para ello, como protocolo estándar, en una placa de 96 pocillos (AbGene), depositada en hielo, se añadió en cada pocillo entre 40 y 80 femtomoles del producto de PCR purificado, 5 picomoles del oligonucleótido cebador correspondiente, 4 µL del DTCS Master Mix (mezcla del tampón de reacción, dNTP, ddNTP marcados con fluoróforos, polimerasa secuenasa) y agua ultrapura (Gibco) hasta completar 10 µL de volumen total de reacción. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de secuenciación en un termociclador GeneAmp 2700 (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones térmicas:

$$35 \times [96^{\circ}\text{C } 20 \text{ s} - 60^{\circ}\text{C } 90 \text{ s}] - 4^{\circ}\text{C } \infty$$

4.2.2.4.1.2.2 Sistema MegaBACE

Para la reacción de secuenciación realizada para el secuenciador MegaBACE 500 se empleó el kit comercial DYEnamic ET Dye Terminator Sequencing Kit (GE Healthcare). Para ello, como protocolo estándar, en una placa de 96 pocillos (AbGene), depositada en hielo, se añadió en cada pocillo entre 50 y 100 femtomoles del producto de PCR purificado, 5 picomoles del oligonucleótido cebador correspondiente, 4 µL del Sequencing Reagent Premix (mezcla del tampón de reacción, dNTP, ddNTP marcados con fluoróforos del tipo FRET y polimerasa termosecuenasa II) y agua ultrapura (Gibco) hasta completar 10 µL de volumen total de reacción. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de secuenciación en un termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones térmicas:

$$35 \times [95^{\circ}\text{C } 20 \text{ s} - 60^{\circ}\text{C } 60 \text{ s}] - 4^{\circ}\text{C } \infty$$

4.2.2.4.1.2.3 Optimización de la reacción

Se optimizaron las condiciones de reacción para cada uno de los fragmentos secuenciados mediante el análisis de la calidad de las secuencias obtenidas y el análisis de los datos crudos de la electroforesis capilar. El parámetro químico que se optimizó principalmente fue la relación de concentración entre el cebador y el molde. Adicionalmente, desde el punto de vista de ahorro de costes, se ajustó al máximo la cantidad empleada de mezcla de reacción procediendo a la dilución de la concentración final de la misma respecto a las recomendaciones del fabricante.

4.2.2.4.1.3 Purificación de la reacción de secuenciación

4.2.2.4.1.3.1 Sistema CEQ/GeXP

Para eliminar los nucleótidos terminadores marcados y otros restos de la reacción que pudieran afectar a la secuenciación se realizó la purificación del producto de reacción por precipitación etanólica. Brevemente, se centrifugó la placa de 96 pocillos a 700 rpm (90 x g) en la centrífuga Allegra 25R con rotor S5700 (Beckman Coulter) para llevar todo el contenido al fondo de los pocillos. Partiendo del volumen de reacción de secuenciación de 10 µL, se añadió a cada pocillo 2,5 µL de la disolución de parada (consistente en 1 µL de acetato sódico 3M a pH 5,2, 1 µL de EDTA 100 mM a pH 8 y 0,5 µL de glucógeno 20 mg/mL (Roche)), y 28,5 µL de etanol absoluto frío (Carlo Erba). Se cubrió bien la placa con una lámina de aluminio (ABgene) y se mezcló varias veces por inversión. Se centrifugó durante 5 minutos a 5700 rpm (6130 x g) y 4°C. Con cuidado se retiró la lámina de aluminio y se dio la vuelta a la placa sobre hojas de papel absorbente. Sin girar la placa de nuevo, se colocó sobre papel absorbente en el soporte de las placas en el rotor y se centrifugó a 200 rpm (8 x g) durante un minuto. Posteriormente se añadió a cada pocillo 200 µL de etanol al 70% v/v (Carlo Erba) frío para lavar el pellet. Se centrifugó durante 3 minutos a 5700 rpm (6130 x g) y 4°C. Se volvió a invertir la placa sobre papel absorbente y a centrifugar a 200 rpm (8 x g) durante un minuto sobre papel absorbente en el soporte de las placas. En los casos en los que se empleó DMSO en la reacción de secuenciación se repitió este paso de lavado. Tras esto, se dejó evaporar los restos de etanol en la placa a temperatura ambiente durante cinco minutos. Se añadió a cada pocillo 40 µL de solución de carga SLS (Beckman Coulter), se tapó con la lámina de aluminio y se agitó vigorosamente en el vórtex de placas MicroPlate Genie (Scientific Industries) durante dos minutos para resuspender completamente el pellet. Se centrifugó durante un minuto a

700 rpm (90 x g) para llevar todo el contenido al fondo del pocillo, se añadió una gota de aceite mineral a cada pocillo y se almacenó a 4°C hasta la secuenciación.

4.2.2.4.1.3.2 Sistema MegaBACE

Para eliminar los nucleótidos terminadores marcados y otros restos de la reacción que pudieran afectar a la secuenciación se realizó la purificación del producto de reacción por precipitación etanólica. Brevemente, se centrifugó la placa de 96 pocillos a 700 rpm (90 x g) en la centrífuga Allegra 25R con rotor S5700 (Beckman Coulter) para llevar todo el contenido al fondo de los pocillos. Partiendo del volumen de reacción de secuenciación de 10 µL, se añadió a cada pocillo 1 µL de acetato amónico 7,5M y 27,5 µL de etanol absoluto frío (Carlo Erba). Se cubrió bien la placa con una lámina de aluminio (ABgene) y se mezcló varias veces por inversión. Se centrifugó durante 12 minutos a 5700 rpm (6130 x g) y 4°C. Con cuidado se retiró la lámina de aluminio y se dio la vuelta a la placa sobre hojas de papel absorbente. Sin girar la placa de nuevo, se colocó sobre papel absorbente en el soporte de las placas en el rotor y se centrifugó a 200 rpm (8 x g) durante un minuto. Posteriormente se añadió a cada pocillo 100 µL de etanol al 70% v/v (Carlo Erba) frío para lavar el pellet. Se centrifugó durante 3 minutos a 5700 rpm (6130 x g) y 4°C. Se volvió a invertir la placa sobre papel absorbente y a centrifugar a 200 rpm (8 x g) durante un minuto sobre papel absorbente en el soporte de las placas. Tras esto, se dejó evaporar los restos de etanol en la placa a temperatura ambiente durante cinco minutos. Se añadió a cada pocillo 10 µL de solución de carga LS (70% formamida desionizada, 1 mM EDTA), se tapó con la lámina de aluminio y se dejó reposar durante cinco minutos. Se agitó vigorosamente en el vórtex de placas MicroPlate Genie (Scientific Industries) durante dos minutos para resuspender completamente el pellet. Por último, se centrifugó durante un minuto a 700 rpm (90 x g) para llevar todo el contenido al fondo del pocillo y se almacenó a 4°C hasta la secuenciación.

4.2.2.4.1.4 Electroforesis capilar

4.2.2.4.1.4.1 Sistema CEQ/GeXP

Se llevó a cabo la electroforesis capilar en los secuenciadores CEQ 8000 Genetic Analysis System y GenomeLab GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter). De manera estándar las muestras se inyectaron a 2 kV durante 15 segundos, se desnaturalizó a 90°C durante 2 minutos y la separación electroforética se realizó a

4.2 kV durante 85 minutos. En función de la longitud del fragmento a secuenciar se ajustó la separación, quedando en 4 kV y 110 minutos para secuencias superiores a 700 b y 7,4 kV y 45 minutos para secuencias inferiores a 300 b.

4.2.2.4.1.4.2 Sistema MegaBACE

Se llevó a cabo la electroforesis capilar en el secuenciador MegaBACE 500 DNA Analysis System (GE Healthcare). De manera estándar las muestras se inyectaron a 3 kV durante 75 segundos y la separación electroforética se realizó a 9 kV durante 100 minutos. Para fragmentos superiores a 700 b se ajustó la separación a 6 kV durante 200 minutos.

4.2.2.4.1.5 Lectura de cromatogramas

Los dos cromatogramas obtenidos en la electroforesis capilar, correspondientes a la secuenciación de la hebra directa y de la hebra reversa de cada producto de PCR, fueron alineados entre sí y frente a la secuencia referencia de la amplificación mediante el programa informático Sequence Investigator (Beckman Coulter). Mediante inspección visual se comprobó la existencia de variaciones entre los cromatogramas y la referencia.

4.2.2.4.1.6 Detección de variantes

En el caso de la localización de variantes no polimórficas, se realizó de nuevo el proceso completo partiendo del DNA genómico para verificar el resultado.

4.2.2.4.2 Pirosecuenciación

4.2.2.4.2.1 Diseño del experimento

Se diseñó la sonda de secuenciación y el orden de dispensación de los nucleótidos empleando una herramienta de desarrollo propio –*Simulador de pirogramas* (cf. apartado 5.1.6)– y siguiendo los criterios expuestos anteriormente.

4.2.2.4.2.2 Modificaciones en el protocolo de PCR para pirosecuenciación

Con objeto de obtener fácilmente una hebra sencilla de producto para su posterior análisis por pirosecuenciación, se modificó el oligonucleótido cebador reverso con biotina en 5'. Para aumentar la cantidad del producto marcado se usó la técnica LATE-PCR, descrita anteriormente (cf. apartado 1.4.1.5), para aumentar la amplificación preferencial de la hebra marcada.

4.2.2.4.2.3 Obtención de la hebra sencilla e hibridación con sonda

Para obtener la hebra sencilla requerida para la reacción de pirosecuenciación se capturó con estreptavidina la hebra marcada con biotina. Brevemente, en la placa de 96 pocillos de la reacción de PCR se añadió agua ultrapura (Gibco) en cada pocillo hasta 40 μL . Se añadió 40 μL de mezcla de unión (37 μL de tampón de unión y 3 μL de estreptavidina sefarosa de alto rendimiento (Amersham Biosciences)), se tapó con una lámina de aluminio (ABgene) y se agitó durante 5 minutos en el vórtex de placas MicroPlate Genie (Scientific Industries). Mediante la estación de trabajo de preparación por vacío (Vacuum Prep Workstation – Biotage AB) –consistente en un soporte con 96 tubos de filtración a vacío adaptados al tamaño y disposición de una placa y 4 contenedores del tamaño del soporte para las disoluciones necesarias para el proceso– se realizó la captura y lavado de la hebra sencilla biotinizada. Para ello se aspiró sobre la placa para capturar las bolas de sefarosa que contenían el producto inmovilizado, que quedaron depositadas en los filtros. Moviendo el soporte, se aspiró durante 5 segundos sobre un contenedor con etanol 70% v/v, otros 5 segundos sobre una disolución de hidróxido sódico 0,2M para desnaturalizar el DNA y 5 segundos sobre el tampón de lavado. Tras verificar la eliminación completa de los restos líquidos en los tubos de filtración, se cesó la aspiración y se colocó el soporte sobre una placa PSQ96 (Biotage AB) que había sido rellena previamente con 40 μL del tampón de hibridación y una concentración 0,4 μM de la sonda empleada para cebar la pirosecuenciación. Tras agitar el soporte para liberar el producto inmovilizado en la placa se procedió a la limpieza de los filtros por agitación y aspirado de agua Milli-Q (Millipore). Seguidamente la placa se cubrió y se calentó a 80°C durante 3 minutos, para seguidamente dejar enfriar a temperatura ambiente.

4.2.2.4.2.4 Reacción de pirosecuenciación

Se llevó la reacción de pirosecuenciación en el instrumento PSQ96MA (Biotage AB). Para ello se depositó la placa en el interior del aparato y se ejecutó el programa de dispensación de desoxinucleótidos diseñado con anterioridad.

4.2.2.4.2.5 Lectura e interpretación de los pirogramas

Se comprobó mediante inspección visual que el aspecto general de los picos del pirograma correspondía al previsto según el diseño del experimento. En caso afirmativo, se analizaron los picos de las inyecciones que, según el diseño, tenían

una señal diferente en la secuencia silvestre y en la mutada o polimórfica para adjudicar el genotipo.

Adicionalmente, para ciertos experimentos se empleó una herramienta de desarrollo propio –*Analizador de pirogramas* (cf. apartado 5.1.7)– para analizar e interpretar automáticamente la información de la señal obtenida en la pirosecuenciación.

4.2.2.5 Interpretación de los resultados

4.2.2.5.1 Nomenclatura de variantes

Las variantes localizadas se nombraron siguiendo las últimas recomendaciones de la HGVS (Human Genome Variation Society) (Dunnen et al. 2016). La numeración de los nucleótidos se basó en la secuencia de cDNA, siendo la posición +1 la A del codón de iniciación de la traducción ATG. En la numeración de los aminoácidos se consideró como posición +1 a la metionina iniciadora de la traducción.

En algunos casos se usó además la nomenclatura clásica en el cambio de aminoácidos (que consideraba la posición +1 como el primer aminoácido del péptido maduro) para aumentar la compatibilidad con la bibliografía previa publicada.

Las referencias para la nomenclatura empleadas fueron las siguientes

	mRNA RefSeq	Proteína RefSeq
APOB	NM_000384.2	NP_000375.2
APOE	NM_000041.3	NP_000032.1
LDLR	NM_000527.4	NP_000518.1
PCSK9	NM_174936.3	NP_777596.2
GBA	NM_000157.3	NP_000148.2
SMPD1	NM_000543.4	NP_000534.3
NPC1	NM_000271.4	NP_000262.2
NPC2	NM_006432.3	NP_006423.1

4.2.2.5.2 Determinación de la funcionalidad de las variantes

Se comprobó si la variante localizada estaba descrita previamente o no mediante consulta en las bases de datos indicadas anteriormente. Adicionalmente también se comprobó si se encontraba listada en la base de datos de variantes genéticas cortas dbSNP (Sherry et al. 2001).

En el caso de estar la variante descrita con anterioridad, se buscó información en las bases de datos y en bibliografía para determinar la funcionalidad asociada a dicha variante.

4.2.2.5.3 Variantes con la funcionalidad no determinada

Para las variantes que no habían sido descritas previamente, o lo habían sido pero sin ser analizada su funcionalidad, se llevó a cabo estudios para determinar su efecto.

En los casos en los que se dispuso de material genético e información clínica de los familiares del caso índice se procedió al estudio de segregación de la variante con las características clínicas.

En caso contrario se emplearon técnicas bioinformáticas para predecir la funcionalidad esperada.

4.2.2.5.3.1 Predicción bioinformática del efecto de mutaciones de cambio de aminoácido

Se predijo el efecto de las variantes que implicaban el cambio de aminoácido mediante el consenso del resultado de tres análisis. El primer análisis consistió en determinar si el residuo afectado formaba parte de algún motivo estructural importante de la proteína (muy especialmente cisteínas implicadas en la formación de puentes disulfuro). El segundo análisis consistió en determinar el grado de conservación del residuo afectado a lo largo de diferentes especies. Para ello se obtuvieron las secuencias de la proteína para diferentes especies en el repositorio Ensembl (Zerbino et al. 2018) y se alinearon usando el algoritmo Clustal W (Thompson et al. 1994; Larkin et al. 2007). Se valoró tanto el grado de conservación del residuo afectado como el de la región de la proteína en el que se encontraba. El tercer análisis consistió en el uso de herramientas bioinformáticas disponibles en línea que empleaban diferentes estrategias para valorar el efecto del cambio de aminoácido. Las principales herramientas empleadas fueron:

- PantherPSEC (<http://www.pantherdb.org/tools/csnpscoreForm.jsp>)
- SNPs3D (<http://www.snps3d.org>)
- PMut (<http://mmb.irbbarcelona.org/PMut/>)
- SIFT (<http://sift.jcvi.org>)
- Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>)

Con el consenso de los análisis y las predicciones se estimó el efecto esperado sobre la proteína.

4.2.2.5.3.2 Predicción bioinformática del efecto de mutaciones de ajuste o “splicing”

Para las variantes localizadas en los nexos exón-intrón, y también en las mutaciones silentes (Cartegni et al. 2002), se aplicaron diversas herramientas bioinformáticas disponibles en línea para predecir la alteración del proceso normal de ajuste o *splicing* durante la transcripción (Jian et al. 2014). Las principales herramientas empleadas fueron:

- NNSplice (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)
- MaxEntScan
(http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html)
- NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>)
- Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF3/>)

Con el consenso de las predicciones, se estimó el efecto esperado considerando la variante como *benigna* o *perjudicial*.

4.3 Procedimientos detallados por genes

4.3.1 Gen LDLR

4.3.1.1 Mutaciones y pequeños reordenamientos

4.3.1.1.1 Preparación de muestras y reactivos

Se realizó todo el proceso en placas de 96 pocillos (ABgene) minimizando el número de pipeteos al emplear pipetas dispensadoras multicanal Finnpipette de 8 canales (Thermo Labsystems). Para ello se adaptaron las alícuotas de muestras y reactivos a columnas de placa de 96 pocillos. Para la reacción de PCR se alicuotaron los distintos cebadores según el esquema siguiente

Cebadores	Mezcla (2,5 μ M cada uno)	Individuales (5 μ M)			
A	01 y 03	03 dir	03 rev	01 dir	01 rev
B	04 y 05	04 dir	04 rev	05 dir	05 rev
C	06 y 11	06 dir	06 rev	11 dir	11 rev
D	02 y 07	07 dir	07 rev	02 dir	02 rev
E	08 y 13	08 dir	08 rev	13 dir	13 rev
F	09 y 16	09 dir	09 rev	16 dir	16 rev
G	10 y 15	10 dir	10 rev	15 dir	15 rev
H	12 y 14	12 dir	12 rev	14 dir	14 rev

Las muestras a analizar también se alicuotaron en placas de 96. Para las reacciones de purificación enzimática y secuenciación, se alicuotó distribuido en columnas la mezcla de ExoSAP-it, la mezcla de secuenciación y el agua. El resto de reactivos se alicuotaron en tubos Eppendorf de 1,5 mL.

4.3.1.1.2 Amplificación por PCR

Se amplificaron simultáneamente mediante 8 reacciones de PCR multiplex las 16 amplificaciones que comprendían todos los exones codificantes, zona promotora y nexos exón-intrón del gen con los cebadores detallados en el apartado 5.2.1.1.1.

Para ello se preparó una premezcla de reactivos para todas las reacciones consistente en 0,05 U/ μ L de EcoTaq (Ecogen), 200 μ M de dNTP (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, tampón de reacción IX y agua ultrapura (Gibco) hasta completar un volumen de reacción individual de 8,2 μ L.

Se añadió 8,2 μL de esta premezcla a cada pocillo de una columna y posteriormente con la pipeta multicanal se añadió 0,8 μL de la mezcla de cebadores (200 nM de cada cebador) y 1 μL del DNA molde correspondiente (50 ng).

Alicuotas	Concentración
Tampón de reacción	10X
dNTP	2 mM
MgCl ₂	50 mM
Mezcla cebadores	2,5 μM cada uno
EcoTaq	5 U/ μL
DNA genómico	50 ng/ μL

	Concentración final	Volumen unitario (10 μL total)	Premezcla de reacción por columna (x8,5)
Agua		5,8 μL	49,3 μL
Tampón de reacción	1 X	1 μL	8,5 μL
dNTP	200 μM	1 μL	8,5 μL
MgCl ₂	1,5 mM	0,3 μL	2,55 μL
Mezcla de cebadores	200 nM cada uno	0,8 μL	-
EcoTaq	0,05 U/ μL	0,1 μL (0,5 U)	0,85 μL
DNA molde	5 ng/ μL	1 μL (50 ng)	-

Se amplificó por PCR en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) mediante las siguientes condiciones térmicas.

94°C 1'; 35 x [94°C 20" – 63°C 20" – 72°C 20"]; 72°C 5'; 4°C ∞

Se comprobó el resultado de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, como se ha descrito previamente, de 2 μL de producto con 2 μL de marrón diluido a 94 V durante 25 minutos. En caso de haber amplificado 1 placa entera, se empleó el sistema de electroforesis E-gel 2% SybrSafe (Invitrogen) o Ready-To-Run 2% (Amersham Biosciences) para comprobar las 96 reacciones simultáneamente.

4.3.1.1.3 Secuenciación

Se purificó el resto de volumen del producto de la reacción de PCR de manera enzimática tal y como se ha descrito con anterioridad añadiendo 2 μL de ExoSAP-

IT (Amersham Biosciences) a cada pocillo de la columna. Posteriormente se procedió a la preparación de la reacción de secuenciación para el sistema MegaBACE 500 (GE Healthcare). Para ello, con una pipeta multicanal se añadió 3 µL de Sequencing Reagent Premix y 4,5 µL de agua ultrapura (Gibco) por pocillo a 4 columnas de una placa. Posteriormente, y también con la pipeta multicanal, se añadió 1,5 µL del producto de PCR purificado a cada pocillo de las 4 columnas y 1 µL del cebador alicuotado individualmente correspondiente con el esquema antes indicado.

	Cantidad final	Volumen unitario (10 µL total)
Agua		4,5 µL
Premezcla de reacción	0,75 X	3 µL
Cebador	5 pmol	1 µL
PCR purificado	50-100 fmol	1,5 µL

Se llevó a cabo la reacción de secuenciación en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) mediante las condiciones térmicas estándar descritas anteriormente.

De esta manera se prepararon las 32 reacciones de secuenciación para determinar la secuencia de los exones codificantes, zona promotora y nexos exón-intrón del gen en cada muestra. La distribución de cada secuencia en la placa correspondió a la del esquema indicado del alicuotado de los cebadores individuales.

Por último se llevó a cabo la electroforesis capilar en el secuenciador MegaBACE 500 en las condiciones estándar descritas (cf. apartado 4.2.2.4.1.4.2).

4.3.2 Gen APOB

4.3.2.1 Amplificación por PCR

Se amplificó, mediante dos reacciones de PCR, dos fragmentos de los exones 26 y 29 usando los cebadores detallados en el apartado 5.2.1.1.2.

Para ello, para cada una de las amplificaciones, se añadió 50 ng de DNA a una mezcla que contenía 0,5 U de EcoTaq (Ecogen), 200 µM de dNTP (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 200 nM de cada cebador, tampón de reacción 1X y agua ultrapura (Gibco) hasta un volumen total de 10 µL.

Alícuotas	Concentración
Tampón de reacción	10X
dNTP	2 mM
MgCl ₂	50 mM
Cebador directo	10 μM
Cebador reverso	10 μM
EcoTaq	5 U/μL
DNA	50 ng/μL

	Concentración final	Volumen unitario (10 μL total)
Agua		6,2 μL
Tampón de reacción	1 X	1 μL
dNTP	200 μM	1 μL
MgCl ₂	1,5 mM	0,3 μL
Cebador directo	200 nM	0,2 μL
Cebador reverso	200 nM	0,2 μL
EcoTaq	0,05 U/μL	0,1 μL (0,5U)
DNA	5 ng/μL	1 μL (50ng)

Se amplificó de manera simultánea por PCR en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) mediante las siguientes condiciones térmicas.

94°C 2'; 35 x [94°C 20" – 50°C 20" – 72°C 30"]; 72°C 5'; 4°C ∞

Se comprobó el resultado de las amplificaciones mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, como se ha descrito previamente, empleando 1 μL de producto con 2 μL de marrón diluido a 94 V durante 20 minutos.

4.3.2.2 Secuenciación

Se secuenciaron las hebras directa y reversa de ambos productos en el secuenciador CEQ8000 siguiendo el protocolo estándar descrito anteriormente (cf. apartado 4.2.2.4.1).

4.3.3 Gen APOE

4.3.3.1 Mediante secuenciación automática capilar

4.3.3.1.1 Amplificación por PCR

Se amplificó mediante PCR un fragmento del exón 4 empleando los cebadores detallados en el apartado 5.2.1.1.3.1.

Para ello se añadió 50 ng de DNA a una mezcla que contenía 0,5 U de EcoTaq (Ecogen), 200 μ M de dNTP (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 200 nM de cada cebador, 8% de DMSO (Sigma-Aldrich), tampón de reacción 1X y agua ultrapura (Gibco) hasta un volumen total de 10 μ L.

Alicuotas	Concentración
Tampón de reacción	10X
dNTP	2 mM
MgCl ₂	50 mM
Cebador directo	10 μ M
Cebador reverso	10 μ M
DMSO	100%
EcoTaq	5 U/ μ L
DNA	50 ng/ μ L

	Concentración final	Volumen unitario (10 μL total)
Agua		5,4 μ L
Tampón de reacción	1X	1 μ L
dNTP	200 μ M	1 μ L
MgCl ₂	1,5 mM	0,3 μ L
Cebador directo	200 nM	0,2 μ L
Cebador reverso	200 nM	0,2 μ L
DMSO	8%	0,8 μ L
EcoTaq	0,05 U/ μ L	0,1 μ L (0,5U)
DNA	5 ng/ μ L	1 μ L (50ng)

Se amplificó por PCR en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) mediante las siguientes condiciones térmicas.

94°C 2'; 35 x [94°C 20" – 61°C 20" – 72°C 40"]; 72°C 5'; 4°C ∞

Se comprobó el resultado de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, como se ha descrito previamente, empleando 1 μL de producto con 2 μL de marrón diluido a 94 V durante 25 minutos.

4.3.3.1.2 Secuenciación

Se secuenciaron las hebras directa y reversa del producto en el secuenciador MegaBACE 500 siguiendo el protocolo estándar descrito anteriormente, empleando las siguientes cantidades en la reacción de secuenciación.

	Cantidad final	Volumen unitario (10 μL total)
Agua		5 μL
Premezcla de reacción	0,75 X	3 μL
Cebador	5 pmol	0,5 μL
PCR purificado	50-100 fmol	1,5 μL

Alternativamente, se empleó el secuenciador CEQ 8000, siguiendo el protocolo estándar descrito anteriormente con las siguientes cantidades en la reacción de secuenciación.

	Cantidad final	Volumen unitario (10 μL total)
Agua		4 μL
Premezcla de reacción	1 X	4 μL
Cebador	5 pmol	0,5 μL
DMSO	5%	0,5 μL
PCR purificado	40-80 fmol	1 μL

4.3.3.2 Mediante pirosecuenciación

4.3.3.2.1 Amplificación por PCR

Se amplificó mediante PCR un fragmento del exón 4, con un tamaño menor al obtenido para la secuenciación y adaptado a los requerimientos de la pirosecuenciación, empleando los cebadores detallados en el apartado 5.2.1.1.3.2.

Para ello se añadió 25 ng de DNA a una mezcla que contenía 0,25 U de EcoTaq (Ecogen), 200 μM de dNTP con dITP (dITP/dGTP 75:25) (Invitrogen), 1,5 mM de

MgCl₂, 200 nM de cada cebador, 5% de DMSO (Sigma-Aldrich), tampón de reacción 1X y agua ultrapura (Gibco) hasta un volumen total de 10 µL.

Alícuotas	Concentración
Tampón de reacción	10X
dNTP con dITP/dGTP 75:25	2 mM
MgCl ₂	50 mM
Cebador directo	10 µM
Cebador reverso	10 µM
DMSO	100%
EcoTaq	5 U/µL
DNA	50 ng/µL

	Concentración final	Volumen unitario (10 µL total)
Agua		6,25 µL
Tampón de reacción	1X	1 µL
dNTP con dITP	200 µM	1 µL
MgCl ₂	1,5 mM	0,3 µL
Cebador directo	200 nM	0,2 µL
Cebador reverso	200 nM	0,2 µL
DMSO	5%	0,5 µL
EcoTaq	0,025 U/µL (0,25 U)	0,05 µL
DNA	2,5 ng/µL (25 ng)	0,5 µL

Se amplificó por PCR en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) mediante las siguientes condiciones térmicas.

95°C 2'30"; 50 x [95°C 25" – 58°C 25" – 72° 25"]; 72°C 5'; 4°C ∞

Se comprobó y cuantificó el resultado de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa NuSieve al 3%, como se ha descrito previamente, empleando 1 µL de producto con 2 µL de marrón diluido a 94 V durante 30 minutos.

4.3.3.2.2 Enriquecimiento de la hebra reversa

Cuando fue necesario incrementar la señal y la relación señal/ruido obtenida en la pirosecuenciación para poder realizar un mayor número de dispensaciones por experimento o para analizar muestras de DNA parcialmente degradado, se

procedió a realizar un procedimiento de enriquecimiento de la hebra reversa marcada con biotina basado en la elongación y amplificación lineal del cebador reverso usando el producto de PCR como molde.

Para ello se añadió 9 μL del producto de PCR anterior a una mezcla que contenía 0,25 U de EcoTaq (Ecogen), 100 μM de dNTP con dITP (dITP/dGTP 75:25) (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl_2 , 20 picomoles del cebador reverso, 5% de DMSO (Sigma-Aldrich), tampón de reacción 1X y agua ultrapura (Gibco) hasta un volumen total de 20 μL .

	Concentración final	Volumen unitario (20 μL total)
Agua		4,35 μL
Tampón de reacción	1X	2 μL
dNTP con dITP	100 μM	1 μL
MgCl_2	1,5 mM	0,6 μL
Cebador reverso	1000 nM	2 μL
DMSO	5%	1 μL
EcoTaq	0,0125 U/ μL (0,25 U)	0,05 μL
PCR anterior		9 μL

Se llevó a cabo la reacción de enriquecimiento en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) mediante las siguientes condiciones térmicas.

95°C 2'; 40 x [95°C 20" – 58°C 20" – 72° 25"]; 72°C 5'; 4°C ∞

4.3.3.2.3 Pirosecuenciación

Se purificó la hebra reversa por el procedimiento indicado anteriormente y se resuspendió en 40 μL del tampón de hibridación con una concentración 0,4 μM (16 pmol) de cada una de las sondas empleadas en la determinación. Se realizó la reacción de pirosecuenciación en instrumento PSQ96MA (Biotage AB), empleando el orden de dispensación diseñado previamente para cada determinación.

Se detallan las secuencias de las sondas, las sondas añadidas y el orden de dispensación de nucleótidos para cada determinación en el apartado 5.2.1.1.3.2.

4.3.4 Gen PCSK9

4.3.4.1 Amplificación por PCR

Se amplificaron los 12 exones codificantes y los nexos exón-intrón en 12 reacciones de PCR simultáneas empleando los cebadores detallados en el apartado 5.2.1.1.4.

Para ello se preparó una premezcla de reactivos para todas las reacciones correspondientes a una muestra, consistente en 0,025 U/ μL de Platinum Taq (Invitrogen), 1 ng/ μL de DNA genómico, 100 μM de dNTP (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl_2 , tampón de reacción 1X y agua ultrapura (Gibco) hasta completar un volumen de reacción individual de 9,8 μL .

Se añadieron 9,8 μL de la premezcla de reactivos a 12 pocillos de una placa y 0,2 μL de la mezcla correspondiente de cebador directo y reverso (50 nM de cada cebador)

Alícuotas	Concentración
Tampón de reacción	10X
dNTP	2 mM
MgCl_2	50 mM
Cebador directo + reverso	5 μM (cada uno)
DMSO	100%
Platinum Taq	5 U/ μL
DNA	50 ng/ μL

	Concentración final	Volumen unitario (10 μL total)	Premezcla de reacción por muestra (X13)
Agua		7,75 μL	100,75 μL
Tampón de reacción	1X	1 μL	13 μL
dNTP	100 μM	0,5 μL	6,5 μL
MgCl_2	1,5 mM	0,3 μL	3,9 μL
Cebador directo + reverso	50 nM (cada uno)	0,2 μL	-
Platinum Taq	0,025 U/ μL	0,05 μL (0,25 U)	0,65 μL
DNA	1 ng/ μL	0,2 μL (10ng)	2,6 μL

Adicionalmente se añadió 0,5 μL de DMSO en las amplificaciones 01, 03, 06 y 08, mezclando con la pipeta hasta obtener una mezcla homogénea.

Se amplificó por PCR en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) mediante las siguientes condiciones térmicas.

$$94^{\circ}\text{C } 2'; 35 \times [94^{\circ}\text{C } 20'' - 60^{\circ}\text{C } 20'' - 72^{\circ}\text{C } 30'']; 4^{\circ}\text{C } \infty$$

Se comprobó el resultado de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, como se ha descrito previamente, empleando 1 μL de producto con 2 μL de marrón diluido a 94 V durante 30 minutos.

Se almacenó a -20°C durante al menos 2h hasta realizar la siguiente reacción de unión.

4.3.4.2 Reacción de unión

Se procedió a realizar la reacción de unión de los fragmentos amplificados en 4 moléculas recombinantes empleando el esquema y los cebadores universales detallados en el apartado 5.2.1.1.4.

Para ello se añadió 1 μL de cada uno de los productos de PCR correspondientes a una mezcla de 0,4 U de Accuprime GC-Rich DNA polimerasa (Invitrogen), 200 nM del cebador universal directo y 200 nM del cebador universal reverso, 1X del tampón de reacción A y agua ultrapura (Gibco) hasta 10 μL .

Alícuotas	Concentración
Tampón de reacción A	5X
Cebador universal directo	10 μM
Cebador universal reverso	10 μM
Accuprime GC-Rich DNA polimerasa	2 U/ μL

Tampón de reacción A: 300 mM Tris-HCl (pH 9,2), 10 mM MgSO_4 , 150 mM NaCl, 1 mM dGTP, 1 mM dATP, 1 mM dTTP, 1 mM dCTP mas otros estabilizantes y potenciadores.

	Concentración final	Volumen unitario (10 μL total)
Agua		4,4 μL
Tampón de reacción A	1X	2 μL
dNTP	200 μM	-
MgSO_4	2 mM	-
Cebador universal directo	200 nM	0,2 μL
Cebador universal reverso	200 nM	0,2 μL
Accuprime GC-Rich DNA polimerasa	0,04 U/ μL	0,2 μL (0,4 U)
PCR	-	1 μL de cada

Se llevó a cabo la reacción de unión de los fragmentos y de amplificación exponencial del DNA recombinante resultante por PCR en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) mediante las siguientes condiciones térmicas.

95°C 5'; 30 x [95°C 30" – 60°C 30" – 72°C 60"]; 72°C 10'; 4°C ∞

Se comprobó el resultado de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, como se ha descrito previamente, empleando 1 µL de producto con 2 µL de marrón diluido a 94 V durante 35 minutos.

4.3.5 Gen GBA

4.3.5.1 Amplificación por PCR larga

4.3.5.1.1 PCR específica 6Kb

Se amplificó mediante PCR, de forma totalmente específica, un fragmento de la agrupación GBA-MTX1P1 que contenía los exones 8 a 11 del gen GBA y la totalidad del pseudogen MTX1P1 empleando los cebadores detallados en el apartado 5.3.1.1.1. Para ello se añadió 50 ng de DNA a una mezcla que contenía 1 U de Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen), 200 µM de dNTP (Invitrogen), 2 mM de MgSO₄, 200 nM de cada cebador, tampón de reacción 1X y agua ultrapura (Gibco) hasta un volumen total de 10 µL.

Alícuotas	Concentración
Tampón de reacción	10X
dNTP	2 mM
MgSO ₄	50 mM
Cebador directo	10 µM
Cebador reverso	10 µM
Platinum Taq High Fidelity	5 U/µL
DNA	50 ng/µL

	Concentración final	Volumen unitario (10 µL total)
Agua		6 µL
Tampón de reacción	1X	1 µL
dNTP	200 µM	1 µL
MgSO ₄	2 mM	0,4 µL
Cebador directo	200 nM	0,2 µL
Cebador reverso	200 nM	0,2 µL
Platinum Taq High Fidelity	0,1 U/µL	0,2 µL (1 U)
DNA	5 ng/µL	1 µL (50 ng)

Se amplificó por PCR en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) mediante las siguientes condiciones térmicas.

94°C 1'; 35 x [94°C 20" – 60°C 20" – 68°C 6']; 68°C 5'; 4°C ∞

Se comprobó el resultado de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, como se ha descrito previamente, empleando 1 µL de producto con 2 µL de marrón diluido a 90 V durante 45 minutos.

4.3.5.1.2 PCR 2Kb

Se amplificó mediante PCR un fragmento del gen GBA que contenía los exones 8 a 11 (zona codificante) empleando los cebadores detallados en el apartado 5.3.1.1.1.

Para ello se añadió 12,5 ng de DNA a una mezcla que contenía 0,25 U de EcoTaq (Ecogen), 200 µM de dNTP (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 200 nM de cada cebador, tampón de reacción 1X y agua ultrapura (Gibco) hasta un volumen total de 5 µL.

Alícuotas	Concentración
Tampón de reacción	10X
dNTP	2 mM
MgCl ₂	50 mM
Cebador directo	10 µM
Cebador reverso	10 µM
EcoTaq	5 U/µL
DNA	50 ng/µL

	Concentración final	Volumen unitario (5 µL total)
Agua		3,35 µL
Tampón de reacción	1X	0,5 µL
dNTP	200 µM	0,5 µL
MgCl ₂	1,5 mM	0,15 µL
Cebador directo	200 nM	0,1 µL
Cebador reverso	200 nM	0,1 µL
EcoTaq	0,05 U/µL	0,05 µL (0,25 U)
DNA	2,5 ng/µL	0,25 µL (12,5 ng)

Se amplificó por PCR en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) mediante las siguientes condiciones térmicas.

94°C 2'; 35 x [94°C 20" – 60°C 20" – 72°C 2']; 72°C 5'; 4°C ∞

Se comprobó el resultado de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, como se ha descrito previamente, empleando 1 µL de producto con 2 µL de marrón diluido a 94 V durante 30 minutos.

4.3.5.2 LATE-PCR multiplex

Se amplificó mediante la técnica de LATE-PCR multiplex los exones 9 y 10 de GBA partiendo del producto de PCR previo de 2 Kb y empleando los cebadores detallados en el apartado 5.3.1.1.2. Para ello, inicialmente se tomó 1 µL del producto de PCR y se añadió 99 µL de agua ultrapura (Gibco). De este producto diluido se tomó 1 µL y se añadió a una mezcla de 0,5 U de EcoTaq (Ecogen), 100 µM de dNTP (Invitrogen), 3 mM de MgCl₂, 50 nM de cada cebador directo, 500 nM de cada cebador reverso, tampón de reacción 1X y agua ultrapura (Gibco) hasta un volumen total de 20 µL.

Alícuotas	Concentración
Tampón de reacción	10X
dNTP	2 mM
MgCl ₂	50 mM
Cebador 09 directo	10 µM
Cebador 09 reverso	10 µM
Cebador 10 directo	10 µM
Cebador 10 reverso	10 µM
EcoTaq	5 U/µL

	Concentración final	Volumen unitario (20 µL total)
Agua		12,5 µL
Tampón de reacción	1X	2 µL
dNTP	100 µM	1 µL
MgCl ₂	3 mM	1,2 µL
Cebador 09 directo	50 nM	0,1 µL (1 pmol)
Cebador 09 reverso	500 nM	1 µL (10 pmol)
Cebador 10 directo	50 nM	0,1 µL (1 pmol)
Cebador 10 reverso	500 nM	1 µL (10 pmol)
EcoTaq	0,025 U/µL	0,1 µL (0,5 U)
Producto PCR diluido	-	1 µL

Se amplificó mediante la técnica LATE-PCR en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) mediante las siguientes condiciones térmicas.

94°C 4'; 60 x [94°C 10" – 60°C 10" – 72°C 15"]; 72°C 2'; 4°C ∞

Se comprobó el resultado de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, como se ha descrito previamente, empleando 1 µL de producto con 2 µL de marrón diluido a 90 V durante 50 minutos.

4.3.5.3 Pirosecuenciación

Se purificó la hebra reversa por el procedimiento indicado anteriormente y se resuspendió en 40 µL del tampón de hibridación con una concentración 0,4 µM (16 pmol) de cada una de las sondas empleadas en la determinación. Se realizó la reacción de pirosecuenciación en instrumento PSQ96MA (Biotage AB), empleando el orden de dispensación diseñado previamente para cada determinación.

Se detallan las secuencias de las sondas, las sondas añadidas y el orden de dispensación de nucleótidos para cada determinación en el apartado 5.3.1.1.2.

4.3.6 Gen SMPD1

4.3.6.1 Amplificación por PCR

Se amplificó, mediante 7 reacciones de PCR, la totalidad del gen a excepción del intrón 2 empleando los cebadores detallados en el apartado 5.3.2.1.1.

Para ello, para cada reacción se añadió 50 ng de DNA a una mezcla que contenía 0,5 U de EcoTaq (Ecogen), 200 µM de dNTP (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 200 nM de cada cebador, tampón de reacción y agua ultrapura (Gibco) hasta un volumen total de 20 µL. Adicionalmente, se añadió 2 µL (10%) de DMSO en las amplificaciones 1 y 2.

Alicuotas	Concentración
Tampón de reacción	10X
dNTP	2 mM
MgCl ₂	50 mM
Cebador directo	10 µM
Cebador reverso	10 µM
DMSO	100%
EcoTaq	5 U/µL
DNA	50 ng/µL

	Concentración final	Volumen unitario (20 µL total)
Agua		13,5 µL
Tampón de reacción	1,0 X	2,0 µL
dNTP	200 µM	2,0 µL
MgCl ₂	1,5 mM	0,6 µL
Cebador directo	200 nM	0,4 µL
Cebador reverso	200 nM	0,4 µL
DMSO (sólo en 1 y 2)	10%	2 µL (sólo en 1 y 2)
EcoTaq	0,025 U/µL	0,1 µL (0,5 U)
DNA	2,5 ng/µL	1,0 µL (50 ng)

Los fragmentos 1, 2, 3 y 4 se amplificaron por PCR en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) mediante las siguientes condiciones térmicas.

94°C 2'; 35 x [94°C 20" – 55°C 20" – 72°C 40"]; 72°C 5'; 4°C ∞

Los fragmentos 5, 6 y 7 se amplificaron mediante las siguientes condiciones térmicas.

94°C 2'; 35 x [94°C 20" – 65°C 20" – 72°C 40"]; 72°C 5'; 4°C ∞

Se comprobó el resultado de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, como se ha descrito previamente, empleando 1 µL de producto con 2 µL de marrón diluido a 94 V durante 30 minutos.

4.3.6.2 Secuenciación

Se secuenciaron las hebras directa y reversa de cada uno de los productos tanto en el secuenciador CEQ8000 como en el secuenciador MegaBACE 500 siguiendo los protocolos estándar descritos anteriormente, empleando las siguientes cantidades en la reacción de secuenciación.

Sistema MegaBACE 500	Cantidad final	Volumen unitario (10 µL total)
Agua		5,5 µL
Premezcla de reacción	0,75 X	3 µL
Cebador	5 pmol	0,5 µL
PCR purificado	50-100 fmol	1 µL

Sistema CEQ 8000	Cantidad final	Volumen unitario (10 µL total)
Agua		4,5 µL
Premezcla de reacción	1 X	4 µL
Cebador	5 pmol	0,5 µL
PCR purificado	50-100 fmol	1 µL

En los casos en los que se detectó un número de copias distinto en cada alelo del polimorfismo rs3838786 –consistente en un número variable de repeticiones del hexanucleótido CTG GCG que codifica a su vez un péptido señal polimórfico con un número variable de repeticiones Leu-Ala– situado en el exón 1 (amplificación 2), se repitió la reacción de secuenciación de la amplificación empleando otros cebadores de secuenciación especialmente diseñados y que se detallan en el apartado 5.3.2.1.1.

4.3.7 Gen NPC1

4.3.7.1 Preparación de muestras y reactivos

Se adaptó todo el proceso para ser realizado en placas de 96 pocillos (ABgene) minimizando el número de pipeteos al emplear pipetas dispensadoras multicanal Finnpiquette de 8 canales (Thermo Labsystems). Para ello se alicuotaron los diferentes reactivos en columnas. Para la reacción de PCR los distintos cebadores se alicuotaron según el siguiente esquema

Cebadores	Directo + Reverso (2,5 µM cada uno)		
A	Amp 01	Amp 14	Amp 16
B	Amp 02	Amp 12	Amp 20
C	Amp 03	Amp 07	Amp 08
D	Amp 04	Amp 19	Amp 21
E	Amp 05	Amp 09	Amp 22
F	Amp 06	Amp 11	Amp 23
G	Amp 10	Amp 15	Amp 18
H	Amp 13	Amp 17	Amp 24

Para las reacciones de purificación enzimática y secuenciación, se alicuotó distribuido en columnas la mezcla de ExoSAP-it, la mezcla de secuenciación y el agua. El resto de reactivos se alicuotaron en tubos Eppendorf de 1,5 mL.

4.3.7.2 Amplificación por PCR

Se amplificaron simultáneamente los 24 fragmentos que comprendían todos los exones codificantes y nexos exón-intrón del gen con los cebadores detallados en el apartado 5.3.2.1.2.2.

Para ello se preparó una premezcla de reactivos para todas las reacciones consistente en 0,025 U/ μ L de PlatinumTaq (Invitrogen), 1 ng/ μ L de DNA genómico, 100 μ M de dNTP (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, tampón de reacción 1X y agua ultrapura (Gibco) hasta completar un volumen de reacción individual de 9,5 μ L.

Se añadió 9,5 μ L de esta premezcla a cada pocillo de tres columnas de una placa de 96 pocillos y posteriormente con la pipeta multicanal se añadió 0,5 μ L de la mezcla de cebadores (62,5 nM de cada cebador) con la distribución indicada anteriormente en el alicuotado.

Alicuotas	Concentración
Tampón de reacción	10X
dNTP	2 mM
MgCl ₂	50 mM
Cebador directo + reverso	2,5 μ M(cada uno)
DMSO	100%
Platinum Taq	5 U/ μ L
DNA	100 ng/ μ L

	Concentración final	Volumen unitario (10 μL total)	Premezcla de reacción por muestra (X26)
Agua		7,55 μ L	196,3 μ L
Tampón de reacción	1X	1 μ L	26 μ L
dNTP	100 μ M	0,5 μ L	13 μ L
MgCl ₂	1,5 mM	0,3 μ L	7,8 μ L
Cebador directo + reverso	62,5 nM (cada uno)	0,5 μ L	-
Platinum Taq	0,025 U/ μ L	0,05 μ L (0,25U)	1,3 μ L
DNA	1 ng/ μ L	0,1 μ L (10 ng)	2,6 μ L

Adicionalmente se añadió 0,5 µL de DMSO en la amplificación 01, mezclando con la pipeta hasta obtener una mezcla homogénea.

Se amplificó por PCR en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) mediante las siguientes condiciones térmicas.

94°C 2'; 35 x [94°C 20" – 60°C 20" – 72°C 30"]; 4°C ∞

Se almacenó a -20°C durante al menos 2h hasta realizar la siguiente reacción de unión.

4.3.7.3 Unión de fragmentos

Se realizó la reacción de unión de todos los fragmentos amplificados en 8 moléculas recombinantes –una por cada fila– empleando los cebadores universales y la estructura detallada en el apartado 5.3.2.1.2.2.

Para ello, se preparó una premezcla de reacción consistente en 0,05 U/µL de AccuPrime Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 200 nM del cebador universal directo, 200 nM del cebador universal reverso, tampón de reacción número 2 1X y agua ultrapura (Gibco) hasta un volumen de reacción individual de 8,5 µL

Se añadió 8,5 µL de esta premezcla a cada pocillo de una columna y posteriormente, con la pipeta multicanal, se añadió 0,5 µL de cada una de las 3 columnas del producto de PCR anterior

Alicuotas	Concentración
Tampón de reacción 2	10X
Cebador universal directo	10 µM
Cebador universal reverso	10 µM
AccuPrime TaqDNA polimerasa	5 U/µL

El tampón de reacción 2 estaba compuesto por: 200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 2 mM dGTP, 2 mM dATP, 2 mM dTTP, 2 mM dCTP, 10% glicerol y la proteína termoestable AccuPrime)

	Concentración final	Volumen unitario (10 µL total)	Premezcla de reacción por muestra (X9)
Agua		6,85 µL	61,65 µL
Tampón de reacción 2	1 X	1 µL	9 µL
Cebador universal directo	200 nM	0,2 µL	1,8 µL
Cebador universal reverso	200 nM	0,2 µL	1,8 µL
AccuPrime Taq DNA polimerasa	0,05 U/µL	0,25 µL (0,5 U)	2,25 µL
Producto de PCR (3 distintos)	-	0,5 µL de cada uno	-

Adicionalmente se añadió 0,5 µL de DMSO en la unión 1 (primer pocillo), mezclando con la pipeta hasta obtener una mezcla homogénea.

Se llevó a cabo las reacciones de unión de los fragmentos y de amplificación exponencial de los DNA recombinantes resultantes por PCR en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) mediante las siguientes condiciones térmicas.

94°C 2'; 32 x [94°C 20" – 58°C 20" – 68°C 50"]; 68°C 5'; 4°C ∞

Se comprobó el resultado de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, como se ha descrito previamente, empleando 1 µL de producto con 2 µL de marrón diluido a 92 V durante 40 minutos.

4.3.7.4 Secuenciación

Se purificaron los productos de unión de manera enzimática con Exo-Sap como se ha descrito anteriormente y se secuenciaron las hebras directa y reversa del producto en el secuenciador MegaBACE 500 siguiendo el protocolo estándar descrito anteriormente, empleando las siguientes cantidades en la reacción de secuenciación.

	Cantidad final	Volumen unitario (10 µL total)
Agua		4,5 µL
Premezcla de reacción	0,75 X	3 µL
Cebador	5 pmol	0,5 µL
PCR purificado	50-100 fmol	2 µL

4.3.8 Gen NPC2

4.3.8.1 Amplificación multiplex PCR

Se amplificó mediante una reacción de PCR multiplex (5-plex) los 5 exones codificantes y los nexos exón-intrón empleando los cebadores descritos en el apartado 5.3.2.1.2.3.

Para ello se añadió 25 ng de DNA a una mezcla de 0,2 U de Amplitaq Gold 360 DNA Polimerasa (Applied Biosystems), 200 µM de dNTP (Invitrogen), 2 mM de MgCl₂, 25 nM de cada cebador (premezclados previamente los 10 cebadores a una

concentración individual de 500 nM), tampón de reacción 1X y agua ultrapura (Gibco) hasta un volumen de 5 μ L

Alicuotas	Concentración
Tampón de reacción	10X
dNTP	2 mM
MgCl ₂	25 mM
Mezcla de cebadores (10 en total)	500 nM (cada uno)
Amplitaq Gold 360 DNA polimerasa	5 U/ μ L
DNA	50 ng/ μ L

	Concentración final	Volumen unitario (5 μ L total)
Agua		2,81 μ L
Tampón de reacción	1 X	0,5 μ L
dNTP	200 μ M	0,5 μ L
MgCl ₂	2 mM	0,4 μ L
Mezcla de cebadores	25 nM (cada uno)	0,25 μ L
AmpliTaQ Gold 360	0,04 U/ μ L	0,04 μ L (0,2 U)
DNA	5 ng/ μ L	0,5 μ L (25 ng)

Se amplificó por PCR en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) mediante las siguientes condiciones térmicas.

95°C 5'; 10 x [95°C 30" – 60°C 20" – 72°C 30"]; 20 x [95°C 20" – 60°C 40" – 72°C 60"]; 4°C ∞

Se almacenó a -20°C durante al menos 2h hasta realizar la siguiente reacción de unión.

4.3.8.2 Unión de fragmentos

Se procedió a completar la unión de los 5 fragmentos amplificados en una sola molécula recombinante y a la amplificación exponencial de la misma por PCR empleando los cebadores universales detallados en el apartado 5.3.2.1.2.2.

Para ello se añadió 2 μ L del producto de PCR a una mezcla de 0,3 U de Amplitaq Gold 360 DNA Polimerasa (Applied Biosystems), 200 μ M de dNTP (Invitrogen), 2 mM de MgCl₂, 200 nM del cebador universal directo, 200 nM del cebador universal reverso, 1X del tampón de reacción y agua ultrapura (Gibco) hasta 10 μ L

Alicuotas	Concentración
Tampón de reacción	10X
dNTP	2 mM
MgCl ₂	25 mM
Cebador universal directo	10 µM
Cebador universal reverso	10 µM
Amplitaq Gold 360 DNA polimerasa	5 U/µL

	Concentración final	Volumen unitario (10 µL total)
Agua		4,74 µL
Tampón de reacción	1 X	1 µL
dNTP	200 µM	1 µL
MgCl ₂	2 mM	0,8 µL
Cebador universal directo	200 nM	0,2 µL
Cebador universal reverso	200 nM	0,2 µL
AmpliTaQ Gold 360	0,03 U/µL	0,06 µL (0,3 U)
Producto PCR multiplex	-	2 µL

Se llevó a cabo la reacción de unión de los fragmentos y de amplificación exponencial del DNA recombinante resultante por PCR en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) mediante las siguientes condiciones térmicas.

95°C 5'; 32 x [95°C 30" – 65°C 30" – 72°C 60"]; 72°C 10'; 4°C ∞

Se comprobó el resultado de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, como se ha descrito previamente, empleando 1 µL de producto con 2 µL de marrón diluido a 92 V durante 40 minutos.

4.2.8.3 Secuenciación

Para realizar la reacción de secuenciación, se purificó el producto de unión mediante dilución con agua. Para ello se añadió 2 µL del producto de PCR y se añadió 8 µL de agua ultrapura (Gibco).

Se secuenciaron las hebras directa y reversa del producto en el secuenciador MegaBACE 500 siguiendo el protocolo estándar descrito anteriormente,

empleando los cebadores universales y las siguientes cantidades en la reacción de secuenciación.

	Cantidad final	Volumen unitario (10 μL total)
Agua		3,5 μ L
Premezcla de reacción	0,75 X	3 μ L
Cebador	5 pmol	0,5 μ L
PCR purificado	30-60 fmol	2 μ L

Adicionalmente, en algunos casos se repitió la reacción de secuenciación empleando los cebadores interiores correspondientes a la amplificación 3 (amplificación 3 directo y amplificación 3 reverso), descritos en resultados, para mejorar la lectura de doble hebra en los extremos 5' y 3' de la secuencia.

5. RESULTADOS

5.1 Herramientas desarrolladas

Con el objeto de facilitar el diseño, la ejecución y el análisis de los protocolos realizados se diseñaron diversas herramientas basadas en hojas de cálculo (Microsoft Excel). De éstas, se adjuntan como material suplementario y se indican a continuación las más representativas.

5.1.1 Calculador de volúmenes para reacciones de PCR

Esta herramienta permitió calcular los volúmenes de reactivos a emplear en las reacciones de PCR. Estableciendo las concentraciones de las alícuotas de los reactivos empleados, el volumen total de reacción y la concentración o cantidad final de reactivos deseada, se obtuvieron los volúmenes correspondientes de la reacción individual y de la premezcla para varias reacciones. Adicionalmente, considerando las micropipetas dispensadoras empleadas se calcularon automáticamente los errores de redondeo y las concentraciones reales considerando dicho redondeo.

5.1.2 Calculador de volúmenes para reacciones de secuenciación

Esta herramienta permitió calcular los volúmenes de reactivos a emplear en las reacciones de secuenciación. Por una parte, empleando el resultado de la cuantificación del producto en gel de agarosa (cf. apartado 4.2.2.3.3.6) permitió calcular automáticamente la concentración del producto de PCR en $\text{ng}/\mu\text{L}$ y $\text{fmol}/\mu\text{L}$, y la concentración después de la purificación enzimática (cf. apartado 4.2.2.4.1.1). Con la concentración obtenida y el resto de condiciones deseadas se calcularon de manera automática los volúmenes de reactivos para los diferentes sistemas de secuenciación (CEQ y MegaBACE). Adicionalmente, considerando las micropipetas dispensadoras empleadas se calcularon automáticamente los errores de redondeo y las concentraciones reales considerando dicho redondeo.

5.1.3 Calculador de tamaños de amplificación para LDLR

Esta herramienta permitió calcular los tamaños de los fragmentos resultantes de la amplificación por PCR de diferentes pares de cebadores diseñados para el gen LDLR. Introducidos los detalles de un reordenamiento, permitió calcular automáticamente los tamaños generados tanto para el alelo silvestre como para el mutado de diferentes grupos de cebadores, facilitando el diseño para la técnica de detección rápida de reordenamientos (cf. apartado 5.2.1.1.1.2).

5.1.4 Calculador de valores termodinámicos de oligonucleótidos

Esta herramienta permitió calcular los parámetros termodinámicos de la hibridación de un oligonucleótido cebador (entalpía ΔH° , entropía ΔS° , energía libre ΔG° y T_m) mediante el modelo de *vecino más cercano* a una concentración determinada y considerando las concentraciones de cationes en disolución. Adicionalmente permitió calcular la gráfica de desnaturalización en función de la temperatura y la estabilidad interna del cebador.

5.1.5 Calculador de T_m y condiciones para reacciones de LATE-PCR

Esta herramienta permitió calcular los parámetros termodinámicos de los oligonucleótidos cebadores (entalpía ΔH° , entropía ΔS° , energía libre ΔG° y T_m) mediante el modelo de *vecino más cercano* a la concentración de trabajo de una reacción de LATE-PCR y considerando las concentraciones de cationes en disolución para comprobar si cumplían con los requisitos de la reacción. Adicionalmente permitió calcular la gráfica de desnaturalización de ambos cebadores en función de la temperatura.

5.1.6 Simulador de pirogramas

Esta herramienta permitió diseñar los diferentes experimentos de pirosecuenciación (secuencia de las sondas empleadas, orden de dispensación de nucleótidos y generación de la gráfica de interpretación de resultados). Una vez establecida la secuencia de hasta 3 dianas (3 productos de PCR) y de hasta 8 variantes, permitió diseñar hasta 4 sondas y la dispensación necesaria para detectar las variantes mediante la simulación en tiempo real del pirograma correspondiente. Para ello calculó automáticamente la localización gráfica de las diferentes variantes sobre las dianas, la localización de las sondas con respecto a las variantes, el pirograma resultante de cada inyección, la predicción del efecto de la siguiente inyección y el control de la fase entre los diferentes alelos. De manera automática se controló las interacciones entre sondas y variantes, la resolución inadecuada de las variantes, las dispensaciones problemáticas o inespecíficas y las alteraciones en la fase que pudieran comprometer la interpretación de resultados. Se generó de manera automática el pirograma teórico de la inyección, las contribuciones de cada sonda al pirograma, el detalle de las inyecciones diferenciales para las variantes y la gráfica resumen para interpretar el resultado de cada variante.

5.1.7 Analizador de pirogramas

Esta herramienta permitió analizar automáticamente los datos crudos de la señal obtenidos del pirosecuenciador para determinar la identidad de las variantes del experimento. Para la determinación del genotipo de APOE, asignó automáticamente el genotipo comprobando las dos posiciones polimórficas.

5.2 Análisis de dislipemias

5.2.1 Hipercolesterolemias autosómicas dominantes

5.2.1.1 Estrategias de diagnóstico desarrolladas

Para realizar el diagnóstico genético de Hipercolesterolemias Autosómicas Dominantes, se puso a punto una estrategia de diagnóstico basada en el análisis de variantes en los genes LDLR, APOB, APOE y PCSK9.

Partiendo desde la obtención de la muestra se realizó de forma seriada el análisis de los genes por los procedimientos descritos a continuación.

5.2.1.1.1 Gen LDLR

Por las características del gen y las bases moleculares descritas con anterioridad, se decidió analizar la secuencia codificante completa del gen y la existencia de grandes reordenamientos.

5.2.1.1.1.1 Detección de variantes puntuales y pequeños reordenamientos

Para la detección de variantes puntuales y pequeños reordenamientos en el gen LDLR se puso a punto un sistema de determinación de la secuencia génica mediante secuenciación automática capilar de todos los exones, nexos exón-intrón y zona promotora.

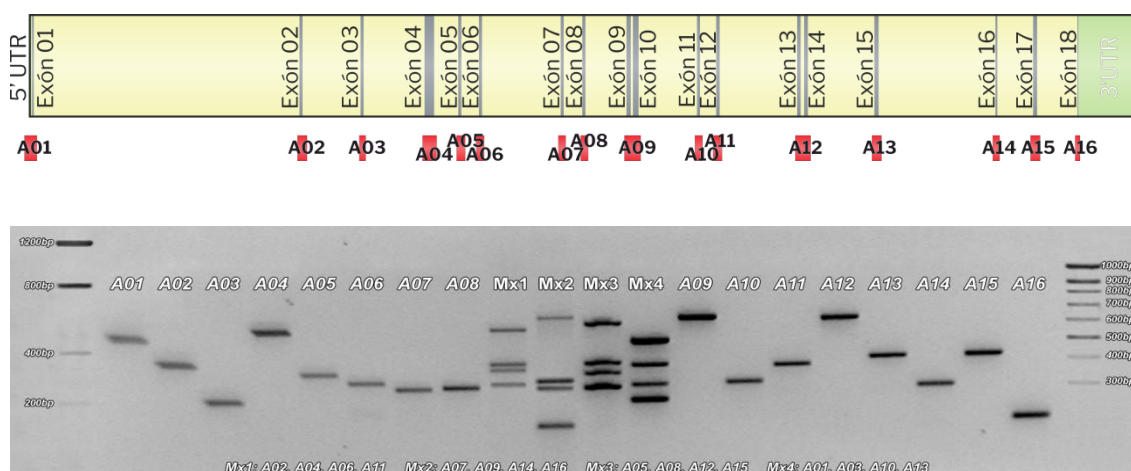
Para ello se diseñó un conjunto de 16 pares de oligonucleótidos cebadores que permitieron amplificar por PCR todas las regiones génicas a analizar. Los cebadores fueron diseñados de tal forma que la amplificación de todos los fragmentos se realizó con las mismas condiciones químicas y térmicas, permitiendo su realización de manera simultánea. Además estos cebadores eran altamente compatibles entre ellos, permitiendo la amplificación por PCR multiplex e incluso la realización de amplificaciones adicionales de mayor tamaño para la caracterización de grandes reordenamientos. El listado de los cebadores y las amplificaciones resultantes se detallan a continuación

Cebadores	Sentido	Secuencia (5' → 3')	Tamaño
Amp. 01	Directo	AGA CCC AAA TAC AAC AAA TCA AGT CGC	27 b
	Reverso	CCC GTG CCA TTA CCC CAC AAG T	22 b
Amp 02	Directo	GCA GGA AAT AGA CAC AGG AAA CGT G	25 b
	Reverso	ATC AAA AAG GGG TTA AGA ATC GTG TCA C	28 b
Amp 03	Directo	CCT CAG TGG GTC TTT CCT TTG AGT	24 b
	Reverso	CGA GCA GGA CCC CGT AGA GA	20 b
Amp 04	Directo	AGC GTC CCC GGC TAT AGA ATG	21 b
	Reverso	GGA AAT CCA CTT CGG CAC CTA AAT	24 b
Amp 05	Directo	GCC CTG CTT CTT TTT CTC TGG TTG TC	26 b
	Reverso	CAA AAG GAA GTG AGG CTC TGA GAA GTC AAG	30 b
Amp 06	Directo	TCC ATT TGC ATG CGT TCT TAT GTG	24 b
	Reverso	CCC AAA ACC CTA CAG CAC TCA TGT	24 b
Amp 07	Directo	CCG GGA GGT GGA GGT TGT AA	20 b
	Reverso	ACT GAG GCA TGA GGG GTT TGG TTG	24 b
Amp 08	Directo	ATC GCT CCG TCT CTA GCC ATT	21 b
	Reverso	CGG TCA GGG GAT ATG AGT CTG T	22 b
Amp 09	Directo	CAC AAG GGG ATG GGG AGG CAC TC	23 b
	Reverso	TGC CCA GCC CAC TAA CCA GTT CCT	24 b
Amp 10	Directo	TTC TTC CAG AAT TCG TTG CAC GCA TTG	27 b
	Reverso	TCA GGG AGC AGC TTG GGC TTG TCC	24 b
Amp 11	Directo	CCA GGT GCT TTT CTG CTA GGT CC	23 b
	Reverso	CAC AAC CAG TTT TCT GCG TTC ATC	24 b
Amp 12	Directo	GGA GAG AGG GTG GCC TGT GTC TCA T	25 b
	Reverso	AGT CCT TAC AAC GAC CTT GAG GTA CCC ATT	30 b
Amp 13	Directo	CAA GGT CAT TTG AGA CTT TCG TCA TT	26 b
	Reverso	AGC AAG GGA GTG AGG ACG ACA C	22 b
Amp 14	Directo	GAG ATG TGC CAG GCG CTT TC	20 b
	Reverso	AAA AAG TGA ACA GGC CCA ACC AG	23 b
Amp 15	Directo	AGG AGT CAA GGT TAT GGT ACG ATG CC	26 b
	Reverso	CAC CTA ATG CTG TCC TCG ATC TGG	24 b
Amp 16	Directo	CAG GCC CAG GAG GTG AGA AGT AGG T	25 b
	Reverso	AAT AAA ACA AGG CCG GCG AGG TCT	24 b

Número de amplificación	Zona amplificada	Tamaño
Amplificación 01	Promotor + exón 01	496 b
Amplificación 02	Exón 02	382 b
Amplificación 03	Exón 03	256 b
Amplificación 04	Exón 04	561 b
Amplificación 05	Exón 05	345 b
Amplificación 06	Exón 06	313 b
Amplificación 07	Exón 07	291 b
Amplificación 08	Exón 08	295 b
Amplificación 09	Exón 09 + exón 10	646 b
Amplificación 10	Exón 11	302 b

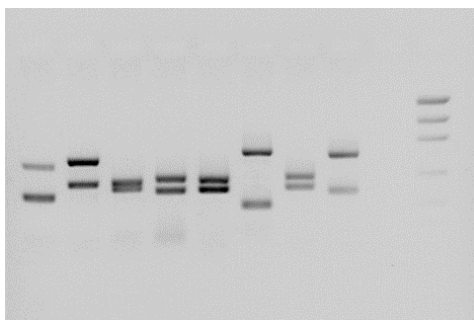
Número de amplificación	Zona amplificada	Tamaño
Amplificación 11	Exón 12	359 b
Amplificación 12	Exón 13 + exón 14	607 b
Amplificación 13	Exón 15	376 b
Amplificación 14	Exón 16	273 b
Amplificación 15	Exón 17	384 b
Amplificación 16	Exón 18 codificante	190 b

El esquema de las 16 amplificaciones y el resultado de la reacción de PCR se muestran a continuación



La secuencia de nucleótidos de cada una de estas amplificaciones se adjunta como material suplementario al final de la memoria.

Debido a que se consideró la necesidad de procesar un elevado número de muestras, se diseñó y adaptó todo el protocolo al uso de placas de 96 pocillos y al empleo de pipetas dispensadoras multicanal de 8 canales para optimizar y facilitar el procedimiento minimizando los errores de manipulación. Para ello, se organizó la amplificación de los 16 fragmentos correspondientes a cada muestra en 8 reacciones de PCR multiplex a lo largo de una columna de la placa. De esta manera, y mediante el procedimiento descrito en *Materiales y Métodos* (cf. apartado 4.3.1.1.2), se pasó a trabajar considerando el manejo de cada muestra por columnas en lugar de por múltiples tubos individuales. Se adaptaron también las alícuotas de reactivos a esta disposición de trabajo para minimizar pipeteos y aumentar así la productividad. El resultado de las 8 reacciones de PCR multiplex simultáneas se muestra a continuación



Al partir de cada reacción de PCR multiplex de dos productos –teniendo en cuenta que se secuenció la hebra directa y reversa de cada producto– se realizaron 4 reacciones de secuenciación diferentes. De esta manera, a partir de 1 columna de PCR correspondiente a 1 muestra se obtuvieron 32 reacciones de secuenciación en 4 columnas.

Con esta organización, en cada placa de 96 pocillos se amplificaron simultáneamente los 16 fragmentos de 12 muestras (una muestra por columna). A partir de cada placa amplificada se obtuvieron 4 placas de secuenciación (384 reacciones de secuenciación diferentes) correspondientes a las 12 muestras analizadas.

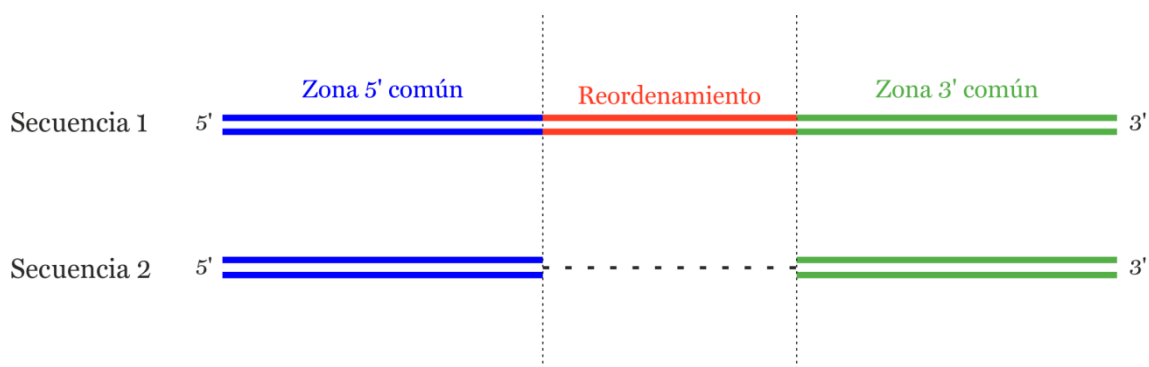
5.2.1.1.1.2 Detección rápida de grandes reordenamientos

Se desarrolló en nuestro grupo previamente la detección de grandes reordenamientos en el gen LDLR por el método de PCR larga (Martín 2007). Para detectar de una manera más rápida la presencia de reordenamientos ya descritos se propuso una estrategia para la detección rápida de reordenamientos que se detalla a continuación.

5.2.1.1.1.2.1 Planteamiento teórico

La caracterización precisa un gran reordenamiento permite conocer con exactitud la secuencia del gen mutado. Conociendo la secuencia normal o silvestre y la secuencia mutada podemos diseñar un conjunto de cebadores que permitan, mediante PCR convencional, detectar la diferencia entre ambas secuencias.

Tanto en el caso de una gran delección como en el de una gran inserción, al comparar la secuencia mutada con la silvestre se encuentra que ambas se encuentran perfectamente alineadas salvo en la región insertada o delecionada. De esta manera, como se muestra a continuación, podríamos distinguir una zona no común correspondiente al reordenamiento y dos zonas 5' y 3' comunes en las secuencias.



Tomando por ejemplo una gran deleción, encontramos un punto o región virtual de ruptura en la secuencia mutada que corresponde a la zona de unión entre las regiones 5' y 3' comunes. En el caso de la secuencia silvestre tenemos dos puntos o regiones virtuales de ruptura, correspondientes a las zonas de unión entre las región 5' y 3' con la zona delecionada.

Si se diseñan una pareja de cebadores que se encuentren flanqueando el punto virtual de la mutada (cebador directo en 5' común y cebador reverso en 3' común), al realizar la amplificación por PCR convencional, obtendríamos dos productos con un tamaño diferente procedentes de la secuencia mutada y de la silvestre (la diferencia sería la longitud de la deleción). Mediante la separación y visualización por electroforesis en gel de agarosa podríamos determinar el tamaño y por tanto distinguir la existencia o no de la secuencia mutada.

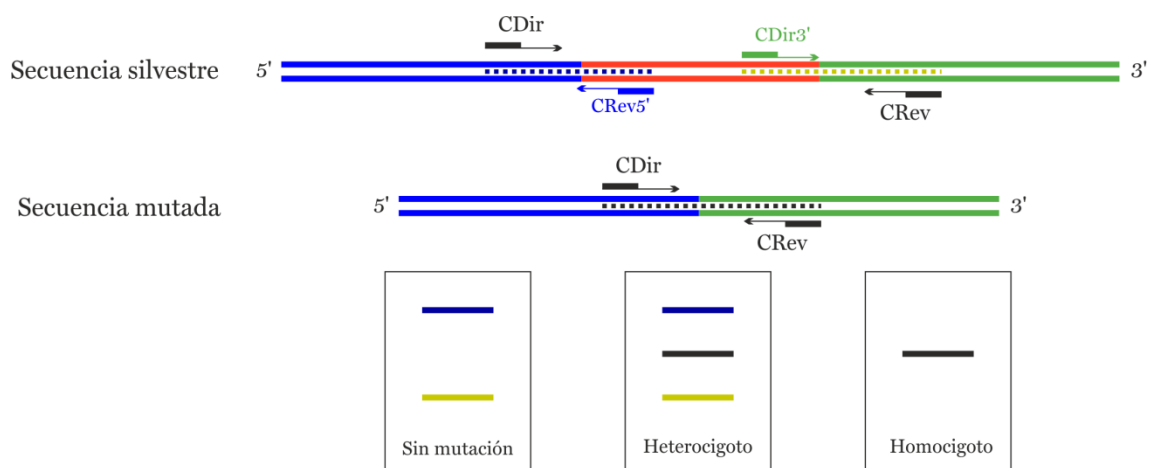
Debido a que normalmente las deleciones son de una longitud muy elevada como para ser amplificadas por PCR convencional, es poco probable que se pudiera obtener una amplificación exitosa de la secuencia silvestre. De esta manera se detectaría el producto de amplificación de la secuencia mutada pero no se produciría la amplificación detectable de la secuencia silvestre, por lo que en caso de no detectar por electroforesis el producto no se podría asegurar si la ausencia es debida a la no presencia de la mutación o si por el contrario ha habido algún fallo en la reacción de amplificación o en la separación electroforética. Adicionalmente, en el caso de detectar la amplificación de la secuencia mutada no se podría asegurar si la mutación aparece en heterocigosidad o en homocigosidad.

Para solventar estos problemas se propuso la obtención de información adicional de los puntos virtuales de ruptura de la secuencia silvestre. Para ello se diseñaron dos cebadores complementarios a los anteriores que hibridaban en la zona delecionada. De esta manera los cebadores serían específicos de la secuencia silvestre y por tanto las amplificaciones resultantes también serían específicas de dicha secuencia., sirviendo como control de amplificación.

Al realizar la reacción de PCR con los cuatro cebadores, en caso de no existir la mutación tan sólo se produciría la amplificación de los productos de control (2

bandas en la electroforesis). En caso de existir la mutación en heterocigosidad se amplificarían los productos de control en un alelo y el producto principal en el mutado (3 bandas en la electroforesis) mientras que si la mutación se encontrase en homocigosidad sólo se produciría la amplificación del producto principal (1 banda en la electroforesis).

Para facilitar la interpretación de los resultados se diseñó las amplificaciones con la suficiente diferencia de tamaño de los productos como para poder ser resueltos de manera inequívoca en un gel de agarosa convencional al 2%. Adicionalmente, debido a que en las reacciones de PCR multiplex ocasionalmente los productos más pequeños pueden inhibir la amplificación de los productos más grandes, se decidió que una de las amplificaciones de control fuera de un tamaño superior a la principal y que la otra fuera de un tamaño inferior.



5.2.1.1.2.2 Prueba de concepto

Para comprobar el funcionamiento del concepto que se acaba de exponer, se diseñó un experimento para la detección rápida del reordenamiento de 9 498 pb entre las posiciones 13 296 y 22 793 del gen LDLR que delecionaba los exones 3 a 6 y que había sido descrito previamente en nuestro laboratorio (Martín 2007).

5.2.1.1.2.2.1 Diseño de los cebadores

Se diseñaron los cebadores con el programa Oligo 6 (Molecular Biology Insights). Para la pareja CDir – CRev se tomó como referencia la secuencia mutada del gen LDLR, quedando dentro del fragmento amplificado el punto virtual de ruptura. Por el tamaño del reordenamiento, se buscó un tamaño de amplificación en torno a 1000 pb.

Se verificó que los cebadores eran válidos y específicos también para la ampliación sobre la secuencia silvestre del gen y posteriormente se pasó a diseñar los cebadores CRev5' y CDir3' compatibles con los anteriores para las amplificaciones

de control. Se buscó un tamaño de amplificación de alrededor de 500 pb para un fragmento y 1500 pb para el otro.

Una vez diseñados, se verificó sobre la secuencia mutada que los cebadores de control no hibridaban en dicha secuencia.

5.2.1.1.2.2.2 Diseño del experimento

Los cebadores diseñados fueron los siguientes

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Tamaño
CDir	CAG TTT CTG ATT CTG GCG TTG AG	23 b
CRev	GCC GTT GTT GTC CAA GCA TTC GT	23 b
CRev5'	CCC CAC CTC CTA ATT CAT GAT TG	23 b
CDir3'	CAT TTT TAG GCC TGG CAG GAT GGT T	25 b

Con estos cebadores, los productos que se esperaban de la reacción fueron los siguientes:

	Secuencia silvestre		Secuencia mutada	
	Producto	T _a	Producto	T _a
CDir - CRev	10 511 pb	58,3°C	1012 pb	58,9°C
CDir - CRev5'	418 pb	57,7°C	No amplifica	
CDir3' - CRev	1588 pb	59,6°C	No amplifica	

De tal manera, la interpretación del resultado del experimento quedó de la siguiente forma:

Ausencia reordenamiento: banda 1588 pb + banda 418 pb

Presencia heterocigota: banda 1588pb + banda 1012pb + banda 418pb

Presencia homocigota: banda 1012pb

5.2.1.1.2.2.3 Amplificación por PCR

Se empleó para la amplificación por PCR la enzima termoestable AccuPrime Taq dentro del kit AccuPrime SuperMix II (Invitrogen). Este kit facilitó la preparación de las reacciones de PCR al aunar en una sola mezcla todos los componentes necesarios a excepción de los cebadores y el DNA molde.

Alicuotas	Concentración
Mezcla reacción	2X
Cebadores	10 μM
DNA genómico	50 ng/μL

La mezcla de reacción estaba compuesta por: 40 mM Tris-HCl (pH 8,4), 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 400 μM dGTP, 400 μM dATP, 400 μM dTTP, 400 μM dCTP, AccuPrime Taq polimerasa y la proteína termoestable AccuPrime)

Se añadió 5 μL de la mezcla de reacción, 200 nM de cada uno de los 4 cebadores, 50 ng de DNA genómico y agua ultrapura (Gibco) hasta 10 μL.

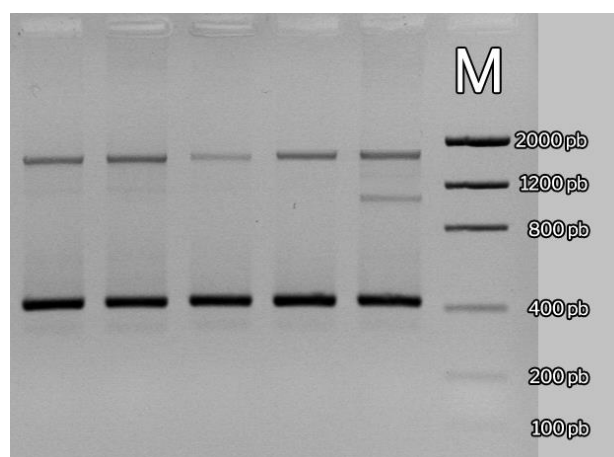
	Concentración final	Volumen unitario (10 μL total)
Agua		3,2 μL
Mezcla de reacción	1 X	5 μL
Cebadores	200 nM cada uno	4x 0,2 μL (0,8 μL)
DNA molde	5 ng/μL (50 ng)	1 μL

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) mediante las siguientes condiciones térmicas

94°C 2'; 30 x [94°C 15" – 60°C 15" – 68°C 90"]; 68°C 5'; 4°C ∞

5.2.1.1.2.2.4 Comprobación del resultado por electroforesis

Se comprobó el resultado de la amplificación y el patrón de bandas por electroforesis en gel de agarosa convencional al 2%. Para ello se añadió a cada pocillo 2 μL del producto de PCR mezclado con 2 μL de marrón diluido y se sometió a 94V durante 30 minutos. El resultado se muestra a continuación



El análisis del gel demostró la validez del planteamiento, permitiendo realizar la detección de un gran reordenamiento de una manera sencilla, rápida y barata.

5.2.1.1.2 Gen APOB

Por las características y las bases moleculares asociadas a hipercolesterolemias de este gen descritas con anterioridad, se decidió analizar solamente la secuencia codificante del entorno de los dominios de unión al receptor LDL en los exones 26 y 29.

Para la búsqueda de variantes y pequeños reordenamientos en dichas regiones se puso a punto un sistema de determinación de la secuencia génica mediante secuenciación automática capilar.

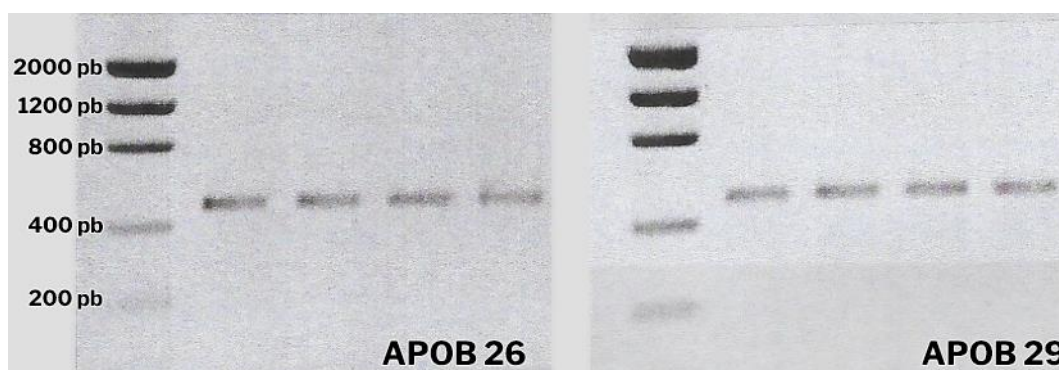
Para ello se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos cebadores que permitían amplificar de manera simultánea, bajo las mismas condiciones químicas y térmicas, las regiones a estudiar y que se detallan a continuación

Cebadores	Sentido	Secuencia (5' → 3')	Tamaño
Amplificación 1	Directo	GGA AAT ACC AAG TCA AAA CCT ACT GT	26 b
	Reverso	ACT TGC ATG GAC CTG AAC AAG AG	23 b
Amplificación 2	Directo	AAT CTT CAG GAC CTT TTA CAA TTC A	25 b
	Reverso	CTT TTC CAT CTG GAT CGG TA	20 b

Amplificación	Zona amplificada	Tamaño
Amplificación 1	Exón 26 parcial (correspondiente a aminoácidos 3455-3597)	480 pb
Amplificación 2	Exón 29 parcial (correspondiente a aminoácidos 4307-4454)	493 pb

La secuencia de nucleótidos de estas amplificaciones se adjunta como material suplementario al final de la memoria.

Se llevó a cabo la amplificación y secuenciación de las regiones estudiadas mediante el procedimiento descrito en *Materiales y Métodos* (cf. apartado 4.3.2). El resultado del producto de PCR se muestra a continuación



5.2.1.1.3 Gen APOE

Dadas las características y las bases moleculares de las dislipemias asociadas a este gen descritas con anterioridad, se decidió analizar parte del exón 4 que incluía la secuencia codificante correspondiente a los aminoácidos que determinaban el genotipo (Cys130 y Arg176) y a la variante patogénica p.Leu167del. Para ello se desarrollaron dos métodos, uno basado en secuenciación (que permitía localizar además otras variantes adicionales) y otro rápido basado en pirosecuenciación para interrogar las variantes conocidas.

5.2.1.1.3.1 Secuenciación

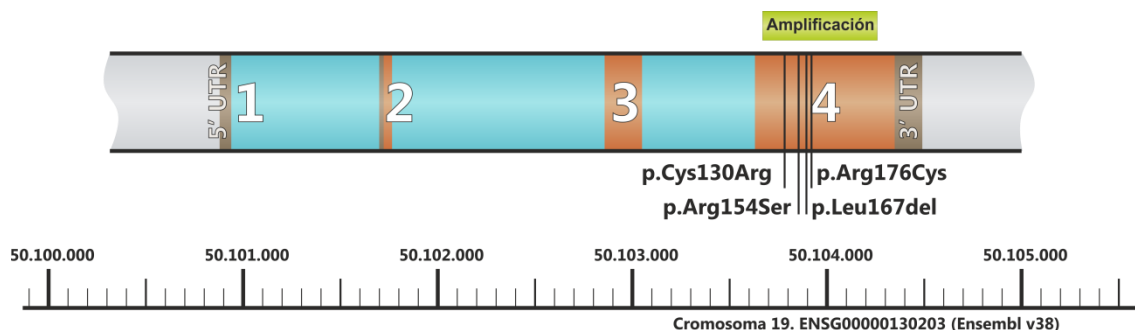
Analizamos la secuencia del exón 4 que codificaba la mayor parte del dominio proteico *Apolipoproteína A1/A4/E* (aminoácidos 86-273) y que a su vez contenía la secuencia correspondiente a los aminoácidos planteados inicialmente y al dominio de unión al receptor LDL (aminoácidos 158-168).

Para ello se diseñó una pareja de oligonucleótidos cebadores que permitían amplificar por PCR la región a estudiar y que se indican a continuación

Cebadores	Sentido	Secuencia (5' → 3')	Tamaño
Amplificación 1	Directo	CAA ATC GGA ACT GGA GGA ACA ACT G	25 b
	Reverso	CTT CCA CCA GGG GCT CGA AC	20 b

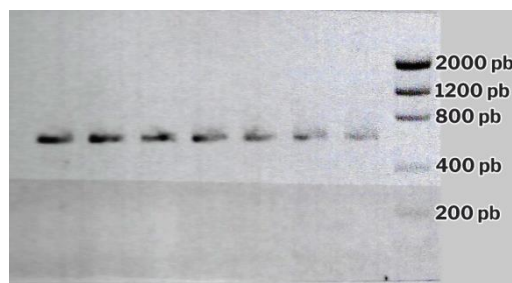
Amplificación	Zona amplificada	Tamaño
Amplificación 1	Exón 4 parcial (correspondiente a aminoácidos 101-281)	590 pb

El esquema de la amplificación por PCR y la localización de las variantes a estudiar se muestran a continuación



La secuencia de nucleótidos de esta amplificación se adjunta como material suplementario al final de la memoria.

Se llevó a cabo la amplificación y secuenciación de la región estudiada mediante el procedimiento descrito en *Materiales y Métodos* (cf. apartado 4.3.3.1). El resultado del producto de PCR se muestra a continuación



Además de la comprobación de la existencia de la variante p.Leu167del y de otras posibles variantes distintas, se determinó el genotipo mediante la interpretación del resultado de la secuencia con el siguiente esquema

Aminoácido 130	Aminoácido 176	Genotipo ApoE
TGC (Cys)	TGC (Cys)	$\epsilon 2/\epsilon 2$
TGC (Cys)	YGC (Cys/Arg)	$\epsilon 2/\epsilon 3$
TGC (Cys)	CGC (Arg)	$\epsilon 3/\epsilon 3$
CGC (Arg)	CGC (Arg)	$\epsilon 4/\epsilon 4$
YGC (Cys/Arg)	YGC (Cys/Arg)	$\epsilon 2/\epsilon 4$
YGC (Cys/Arg)	CGC (Arg)	$\epsilon 3/\epsilon 4$

5.2.1.1.3.2 Pirosecuenciación

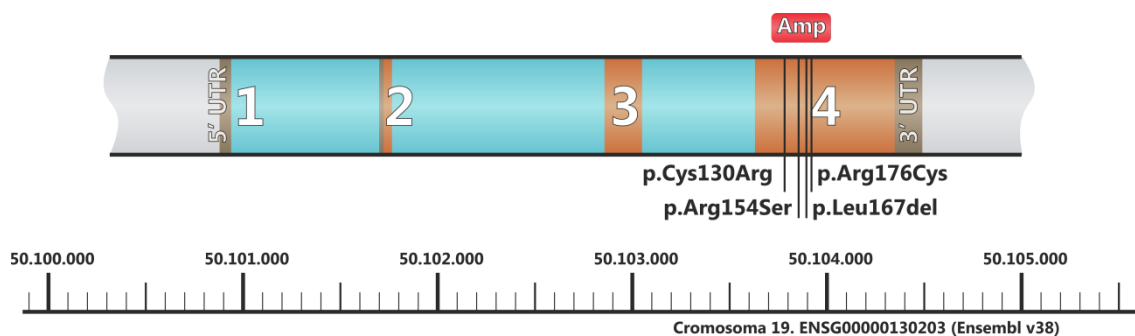
Para determinar de forma rápida los polimorfismos que definen el genotipo y la presencia de la mutación patogénica p.Leu167del se decidió desarrollar un procedimiento basado en pirosecuenciación.

Para ello se diseñó una pareja de oligonucleótidos cebadores que permitían amplificar por PCR la región a estudiar y además marcar la hebra reversa con biotina para facilitar su captura y purificación posterior. Los cebadores se indican a continuación

Cebadores	Sentido	Secuencia (5' → 3')	Tamaño
Amplificación 1	Directo	GCG GGC ACG GCT GTC CAA	18 b
	Reverso	Biot-GCA CGC GGC CCT GTT CCA C	19 b

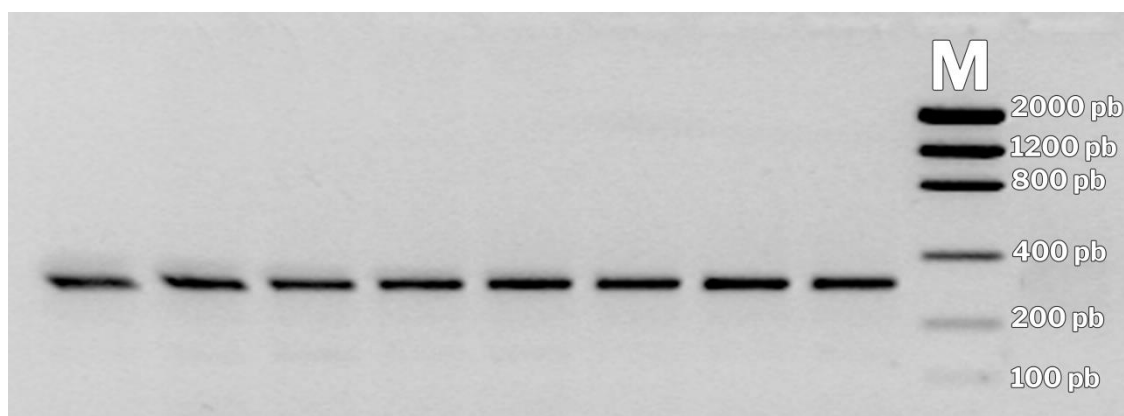
Amplificación	Zona amplificada	Tamaño
Amplificación 1	Exón 4 parcial (correspondiente a aminoácidos 114-202)	305 pb

El esquema de la amplificación por PCR y la localización de las variantes a estudiar se muestran a continuación



La secuencia de nucleótidos de esta amplificación se adjunta como material suplementario al final de la memoria.

Con el procedimiento descrito en *Materiales y Métodos* (cf. apartado 4.3.3.2) se llevó a cabo la amplificación de fragmento y el enriquecimiento y purificación de la hebra reversa marcada con biotina. El resultado del producto de PCR se muestra a continuación

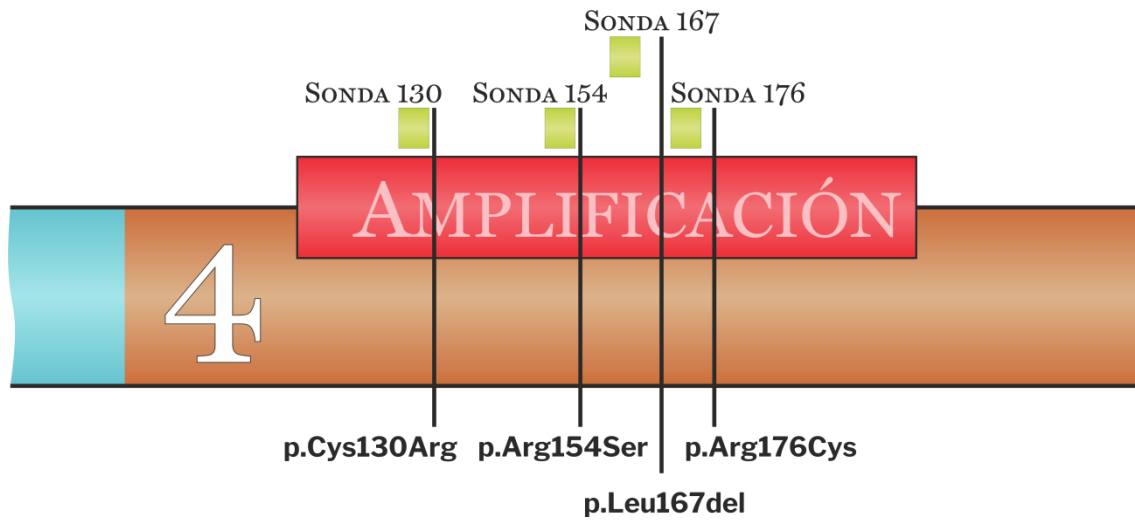


Mediante la herramienta desarrollada en este trabajo *Simulador de pirogramas* (cf. apartado 5.1.6), se diseñaron las sondas para cada uno de los polimorfismos y el orden de dispensación de los diferentes nucleótidos para determinar su naturaleza, quedando detallados a continuación

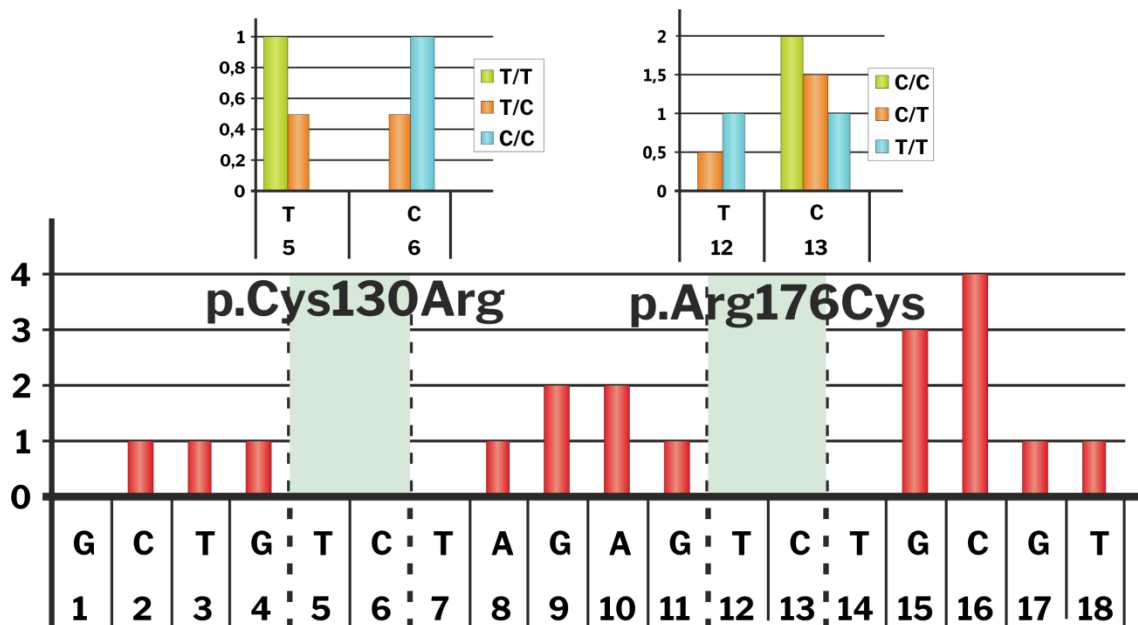
Sonda	Variante diana	Proteína	Secuencia (5' → 3')	Tamaño
S130	c.388T>C	p.Cys130Arg	CGG ACA TGG AGG ACG	15 b
S176	c.526C>T	p.Arg176Cys	GAT GCC GAT GAC CTG	15 b
S167	c.500_502delTCC	p.Leu167del	CTG CGC AAG CTG CGT	15 b

Experimento	Sondas	Orden de dispensación	Nucleótidos dispensados
Genotipo	S130 + S176	GCTGTCTAGAGTCTGCGT	18 nucleótidos
Genotipo+167	S130 + S176 + S167	GTCTGACAGTCGCTGCTCTA	20 nucleótidos

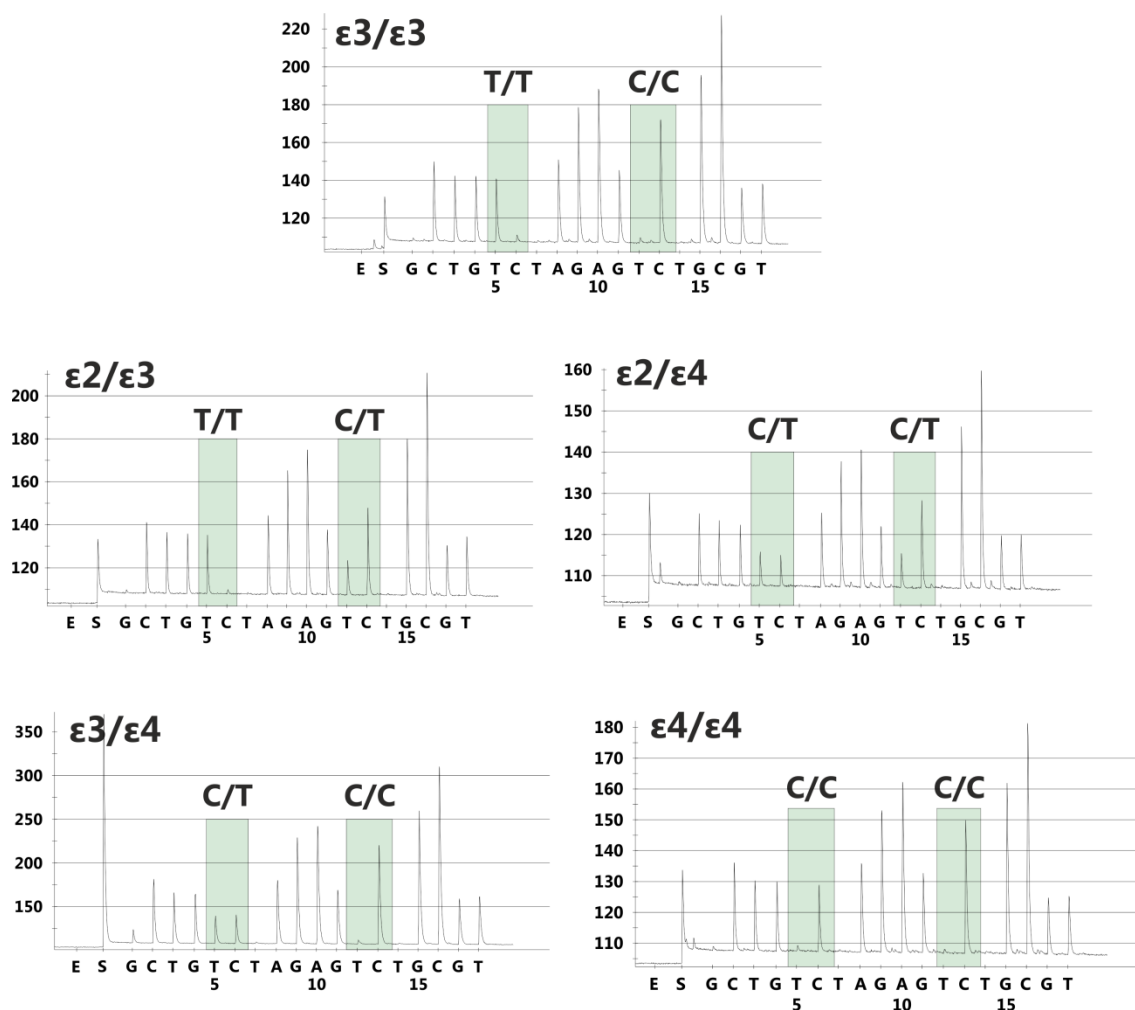
El esquema de la localización de las sondas y de variantes a estudiar se muestra a continuación



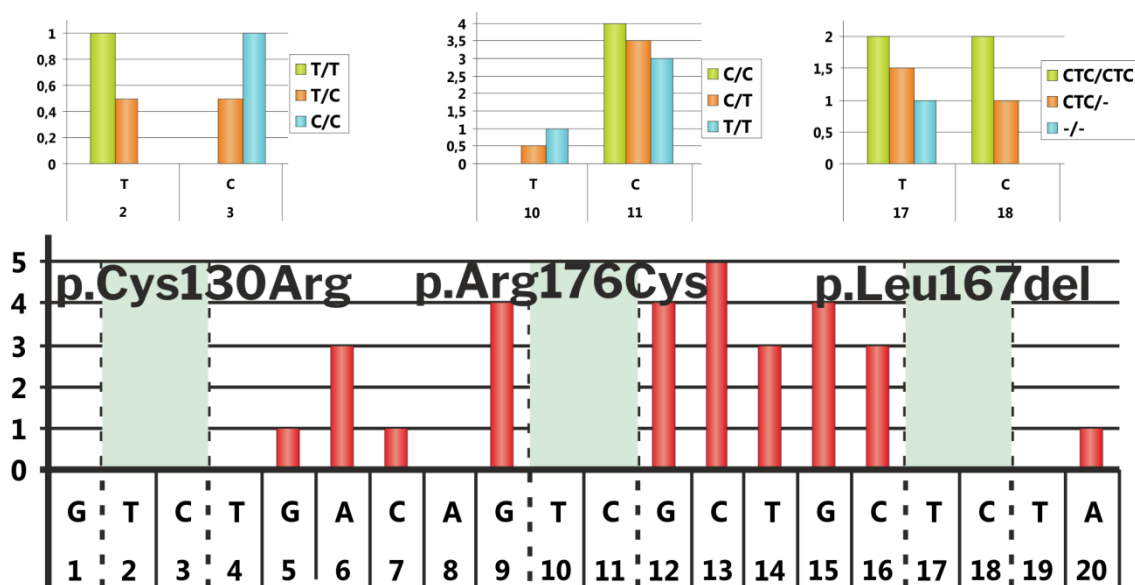
El pirograma teórico para la determinación del genotipo fue el siguiente



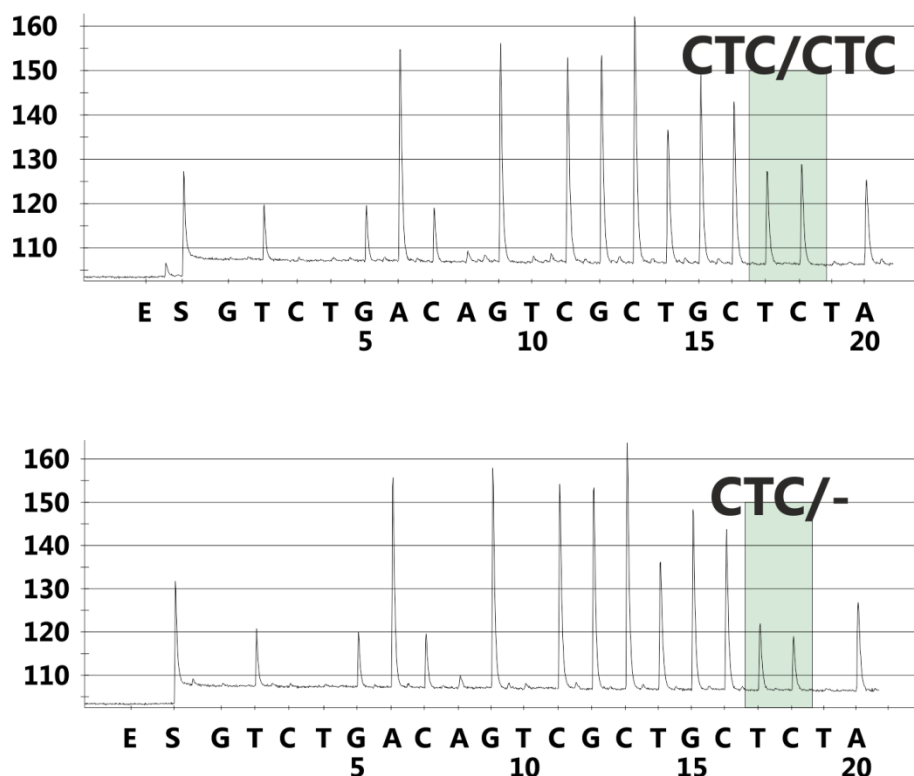
Y el resultado del pirograma real con su interpretación



El pirograma teórico para la determinación del genotipo y la variante p.Leu167del fue el siguiente



Y el resultado del pirograma real con su interpretación



Adicionalmente, para facilitar el proceso de interpretación de resultados, se desarrolló una herramienta propia –*Analizador de pirogramas* (cf. apartado 5.1.7)– que permitió acelerar sustancialmente el análisis de los pirogramas obtenidos frente a la simple inspección visual.

5.2.1.1.4 Gen PCSK9

Por las características del gen y la implicación de este gen en la causalidad de las distintas dislipemias descritas previamente, se decidió analizar la secuencia codificante del gen entero mediante secuenciación automática capilar.

Para facilitar la tarea y permitir organizar el trabajo usando placas de 96 pocillos, se decidió emplear la estrategia de unión de fragmentos –descrita en el apartado 5.3.2.1.2.1– para generar 4 uniones que contuvieran la secuencia de todos los exones.

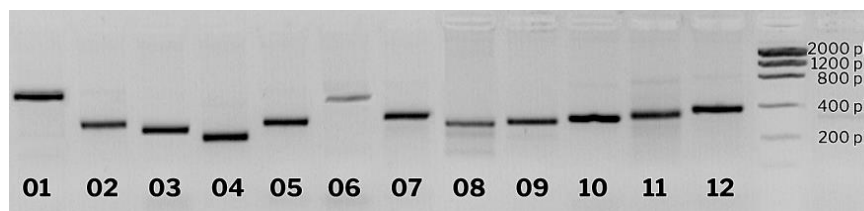
Para ello se diseñaron 12 parejas de oligonucleótidos cebadores que permitían amplificar por PCR de manera simultánea, bajo las mismas condiciones químicas y térmicas, las regiones a estudiar. Adicionalmente, se diseñaron las colas en 5' de los cebadores para permitir su unión en un segundo paso. Los cebadores se detallan a continuación

Cebadores	Sentido	Secuencia (5' → 3')	Tam
Amp. 1	Directo	gac ggg ctc gca gaC GCA CGG CCT CTA GGT C	31 b
	Reverso	aac gca cac gat gga cca atA GGC CCG AGA GGA AAC AG	38 b
Amp. 2	Directo	agc ggc ccg gcc taT GGG TTT CTT CCA TGT CAT CAT	36 b
	Reverso	ctg cga gcc cgt caC CCA GCC CTA TCA GGA AGT G	34 b
Amp. 3	Directo	tgt tac tat cac gcc cac GCT GTG TTT GCT GCT GTC CAA	39 b
	Reverso	agg ccg ggc cgc taG GGC AGA GCA AAT GGA TTC A	34 b
Amp. 4	Directo	cgt gca gcc agc caC CTC CTC TCC CAC AAA TGT CG	35 b
	Reverso	agc cgc cgc gag caG CCC TCC CAT CAG ACG	30 b
Amp. 5	Directo	tgt tac tat cac gcc cac gCA CCT GCT GAT TTG TTA TAG G	40 b
	Reverso	gag tag ctg cgc caC CCA GGC CAG GTC CAG AT	32 b
Amp. 6	Directo	gct cgc ggc gcc taC CAT CAC TCT GTG CCT GTA AGG	36 b
	Reverso	aac gca cac gat gga cca ata aGG CCT CCA GGA ACG TGC	39 b
Amp. 7	Directo	gat gct gcc agt caC CTC TGC AAC CCC TCT CTT G	34 b
	Reverso	aac gca cac gat gga cca atC AAA GGG GCT GTT AGC ATC	39 b
Amp. 8	Directo	ggc gca gct act caC ATC ACC ATC TTT CAC CAT TCA CC	38 b
	Reverso	cag cga gcg acc caG CCT GGA CTT GCC CAC	30 b
Amp. 9	Directo	tgt tac tat cac gcc cac GCC CTC CTC TCT CCT ACC ATG A	40 b
	Reverso	ggc tgg ctg cac gaC ACA CAC GAA GGA GGG GTA CAG	36 b
Amp. 10	Directo	agc ggc ccg gtc taA AGC AGA TTC CCA TTT CCG TC	35 b
	Reverso	gac tgg cag cat caC GGG CAG TGG GTG CAT AAG	33 b
Amp. 11	Directo	tgt tac tat cac gcc cac GCA CTG GAG ACG GAG CAT	36 b
	Reverso	aga ccg ggc cgc taG CTG TGC AGG AGA GAC ACG C	34 b
Amp. 12	Directo	ggg tcg ctc gct gaC GGG CCA CGC TAG ACA T	31 b
	Reverso	aac gca cac gat gga cca atA GGG ACA AGT CGG AAC CAT T	40 b

Número de amplificación	Zona amplificada	Tamaño
Amplificación 01	Exón 01 cod.	366 pb
Amplificación 02	Exón 02	308 pb
Amplificación 03	Exón 03	278 pb
Amplificación 04	Exón 04	220 pb
Amplificación 05	Exón 05	293 pb
Amplificación 06	Exón 06	441 pb
Amplificación 07	Exón 07	327 pb
Amplificación 08	Exón 08	269 pb
Amplificación 09	Exón 09	296 pb
Amplificación 10	Exón 10	303 pb
Amplificación 11	Exón 11	328 pb
Amplificación 12	Exón 12 cod	372 pb

Se llevó a cabo la amplificación por PCR de las regiones estudiadas con el procedimiento descrito en *Materiales y métodos* (cf. apartado 4.3.4.1).

Se muestra a continuación el resultado de la amplificación por PCR



La unión de los fragmentos resultantes mediante la interacción de los extremos generados por las colas diseñadas siguió el siguiente esquema

Unión 1	Cola cebador directo	Cola cebador reverso
Amp 03	Secuencia cebador universal directo	Complementaria a cola del cebador Amp02 directo
Amp 02	Complementaria a cola del cebador Amp03 reverso	Complementaria a cola del cebador Amp01 directo
Amp 01	Complementaria a cola del cebador Amp02 reverso	Secuencia cebador universal reverso

Unión 2	Cola cebador directo	Cola cebador reverso
Amp 09	Secuencia cebador universal directo	Complementaria a cola del cebador Amp04 directo
Amp 04	Complementaria a cola del cebador Amp09 reverso	Complementaria a cola del cebador Amp06 directo
Amp 06	Complementaria a cola del cebador Amp04 reverso	Secuencia cebador universal reverso

Unión 3	Cola cebador directo	Cola cebador reverso
Amp 11	Secuencia cebador universal directo	Complementaria a cola del cebador Amp10 directo
Amp 10	Complementaria a cola del cebador Amp11 reverso	Complementaria a cola del cebador Amp07 directo
Amp 07	Complementaria a cola del cebador Amp10 reverso	Secuencia cebador universal reverso

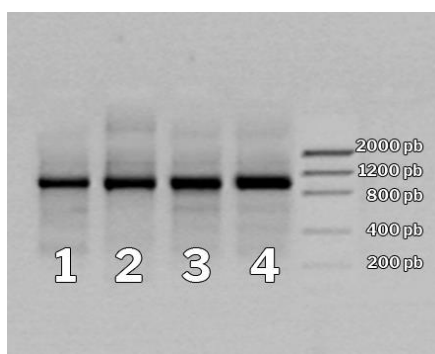
Unión 4	Cola cebador directo	Cola cebador reverso
Amp 05	Secuencia cebador universal directo	Complementaria a cola del cebador Amp08 directo
Amp 08	Complementaria a cola del cebador Amp05 reverso	Complementaria a cola del cebador Amp12 directo
Amp 12	Complementaria a cola del cebador Amp08 reverso	Secuencia cebador universal reverso

Para la amplificación exponencial del DNA recombinante de la unión de los fragmentos se empleó el procedimiento descrito en el apartado 4.3.4.2, empleando los cebadores universales diseñados indicados a continuación.

	Sentido	Secuencia (5' → 3')	Tam.
Cebadores universales	Directo	TGT TAC TAT CAC GCC CAC GC	20 b
	Reverso	AAC GCA CAC GAT GGA CCA AT	20 b

Grupos	Elementos	Tamaño
Unión 1	Amp. 03 + Amp. 02 + Amp. 01	926 pb
Unión 2	Amp. 09 + Amp. 04 + Amp. 06	931 pb
Unión 3	Amp. 11 + Amp. 10 + Amp. 07	932 pb
Unión 4	Amp. 05 + Amp. 08 + Amp 12	908 pb

El resultado de la unión de los fragmentos fue el siguiente



La secuencia de nucleótidos de estas amplificaciones se adjunta como material suplementario al final de la memoria.

5.2.1.2 Muestras analizadas

Una vez desarrollado y puesto a punto el procedimiento, se procedió a la validación con el empleo de muestras clínicas. Para ello se tomó una muestra de

125 pacientes con diagnóstico clínico de Hipercolesterolemia Familiar (8 o más puntos MEDPED (Mata et al. 2002)) procedentes de diversas Unidades de Lípidos de la Sociedad Española de Arteriosclerosis. A estos pacientes se les había descartado previamente la existencia de 117 mutaciones en el gen LDLR y de APOB:p.Arg3527Gln mediante el chip de oligonucleótidos de baja densidad Lipochip (Tejedor et al. 2005).

Se analizaron los genes LDLR, APOB y APOE por el procedimiento aquí descrito, obteniendo los siguientes resultados

	Gen LDLR	Gen APOB	Gen APOE
Resultado positivo	42 (33,6%)	0	1 (0,9 %)
Resultado negativo	83 (66,4%)	125	108 (99,1%)
TOTAL	125	125	109

Dentro de los resultados positivos en el gen LDLR se localizaron 37 variantes distintas. De todas estas se indican a continuación las 21 que no habían sido descritas previamente en el momento de su detección

Nombre común	cDNA	Proteína	Localización
L-6P	c.47T>C	p.(Leu16Pro)	Exón 1
G-2R	c.58G>A	p.(Gly20Arg)	Exón 1
C42Y	c.188G>A	p.(Cys63Tyr)	Exón 2
C74Y	c.284G>A	p.(Cys95Gly)	Exón 3
D200V	c.662A>T	p.(Asp221Val)	Exón 4
S205C	c.677C>G	p.(Ser226Cys)	Exón 4
R279G	c.898A>G	p.(Arg300Gly)	Exón 6
W422S	c.1328G>C	p.(Trp443Ser)	Exón 9
T446I	c.1400C>T	p.(Thr467Ile)	Exón 10
H562Q	c.1749C>A	p.(His583Gln)	Exón 12
E579D	c.1809G>C	p.(Glu600Asp)	Exón 12
R612H	c.1898G>A	p.(Arg633His)	Exón 13
D686N	c.2119G>T	p.(Asp707Tyr)	Exón 14
T740M	c.2282C>T	p.(Thr761Met)	Exón 15
V766E	c.2360T>A	p.(Val787Glu)	Exón 16
1587-1 G>C	c.1587-1G>C	p.?	Intrón 10
2389+3 A>C	c.2389+3A>C	p.?	Intrón 16
2389+8 C>T	c.2389+8C>T	p.?	Intrón 16
1587-5_1618del36	c.1587-5_1618del	p.?	Intrón 10- exón 11
2544dupC	c.2544dupC	p.(Ser849Leufs*10)	Exón 17
969delC	c.969delC	p.(Gly324Alafs*46)	Exón 7

El listado completo de los resultados y variantes obtenidas se adjunta al final de la memoria como material suplementario.

5.2.2 Disbetalipoproteinemias

5.2.2.1 Estrategias de diagnóstico

5.2.2.1.1 Gen APOE

Por las bases moleculares descritas con anterioridad y la frecuencia de variantes asociadas a disbetalipoproteinemia, se decidió analizar solamente la secuencia codificante correspondiente a los aminoácidos que determinaban el genotipo (Cys130 y Arg176) para determinar la existencia del genotipo ϵ_2/ϵ_2 y la correspondiente a la variante p.Arg154Ser (APOE2 Christchurch). Para ello se desarrolló un método de detección rápida basado en pirosecuenciación.

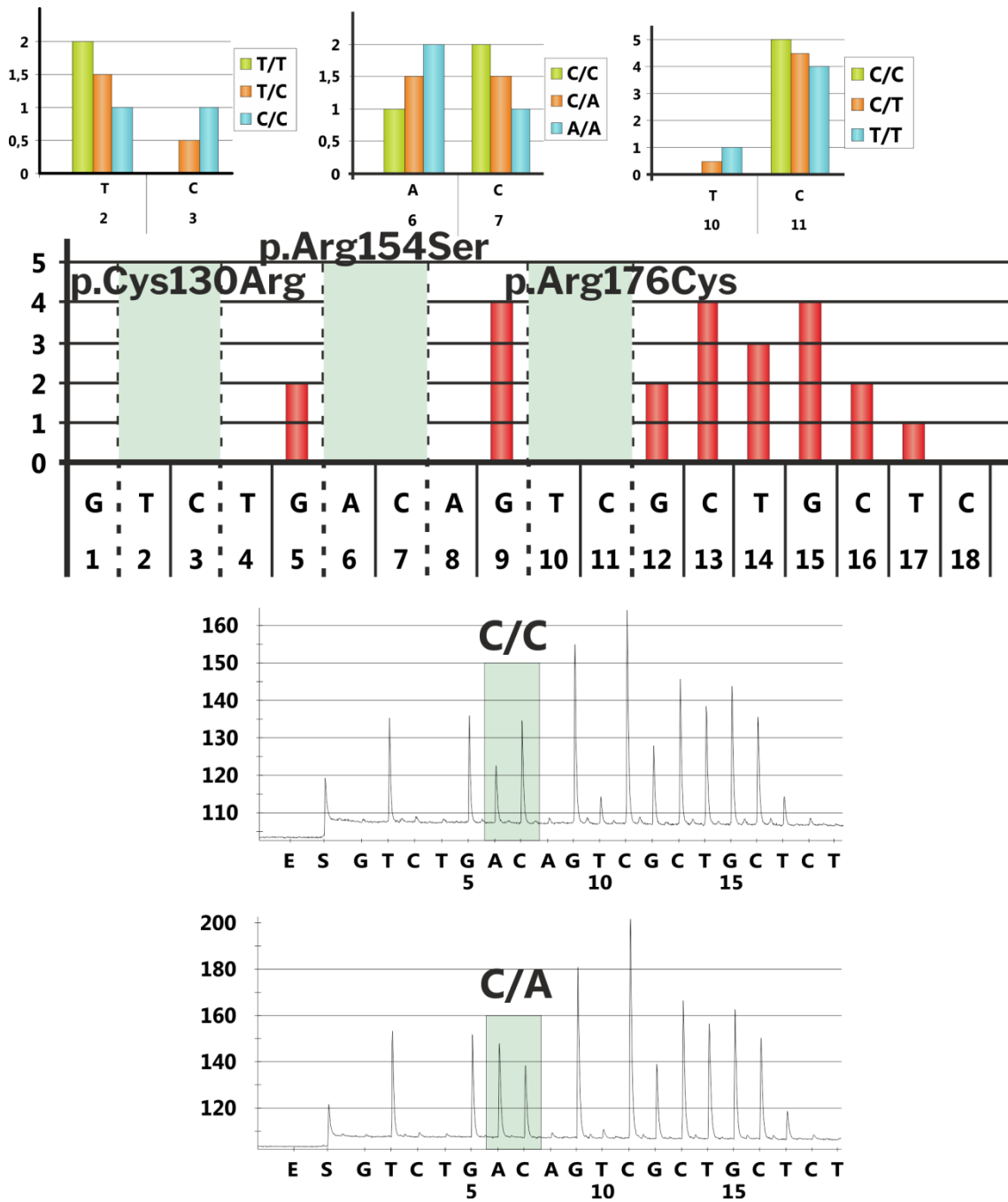
Se amplificó y capturó la hebra reversa con la estrategia descrita anteriormente en el apartado 5.2.1.1.3.2.

Mediante la herramienta de desarrollo propio *Simulador de pirogramas* (cf. apartado 5.1.6), se diseñaron las sondas para cada uno de los polimorfismos y el orden de dispensación de los diferentes nucleótidos para determinar su naturaleza, detallándose a continuación

Sonda	Variante diana	Proteína	Secuencia (5' → 3')	Tamaño
S130	c.388T>C	p.Cys130Arg	CGG ACA TGG AGG ACG	15 b
S176	c.526C>T	p.Arg176Cys	GAT GCC GAT GAC CTG	15 b
S154	c.460C>A	p.Arg154Ser	CCG AGG AGC TGC GGG	15 b
S167	c.500_502delTCC	p.Leu167del	CTG CGC AAG CTG CGT	15 b

Experimento	Sondas	Orden de dispensación	Nucleótidos dispensados
Genotipo	S130 + S176	GCTGTCTAGAGTCTGCGT	18 nucleótidos
Genotipo+154	S130 + S176 + S154	GTCTGACAGTCGCTGCTC	18 nucleótidos
154+167	S154 + S167	GAGCGCTCTCTGACTGCT	18 nucleótidos

El pirograma teórico para la determinación del genotipo y la variante p.Arg154Ser con su correspondiente interpretación fue el siguiente



5.2.2.2 Muestras analizadas

Una vez desarrollado y puesto a punto el procedimiento, se procedió a la validación con el empleo de 212 muestras con diagnóstico clínico de Hiperlipemia Familiar Combinada procedentes de Unidades de Lípidos de la Sociedad Española de Arteriosclerosis. Se obtuvo el siguiente resultado

Genotipo	N	%	Variantes	N	%
$\epsilon 2/\epsilon 2$	4	1,89%	p.Arg154Ser	0	0%
$\epsilon 2/\epsilon 3$	17	8,02%	p.Leu167del	5	2,36%
$\epsilon 2/\epsilon 4$	3	1,42%			
$\epsilon 3/\epsilon 3$	148	69,81%			
$\epsilon 3/\epsilon 4$	39	18,40%			
$\epsilon 4/\epsilon 4$	1	0,47%			
N total = 212 pacientes					

Parte de este trabajo fue publicado (Civeira et al. 2008) y puede consultarse en el artículo adjuntado al final de la memoria como material suplementario.

5.3 Análisis de lipidosis

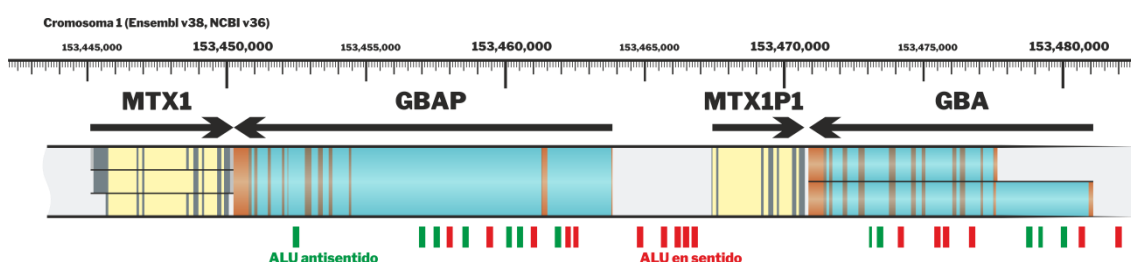
5.3.1 Enfermedad de Gaucher

5.3.1.1 Estrategias de diagnóstico desarrolladas

Teniendo en cuenta las bases moleculares descritas anteriormente de esta esfingolipidosis, se diseñó un método de cribado rápido de muestras mediante la comprobación de las variantes más frecuentes en el gen GBA por la técnica de pirosecuenciación. La alta frecuencia de las variantes p.Asn409Ser (N370S) y p.Leu483Pro (L444P), unida a la detección adicional de p.Asp448His (D409H), p.Gly416Ser (G377S) y c.1265_1319del (del55) podía detectar alrededor del 75% de los alelos mutados detectados previamente en población española (Giraldo et al. 2012).

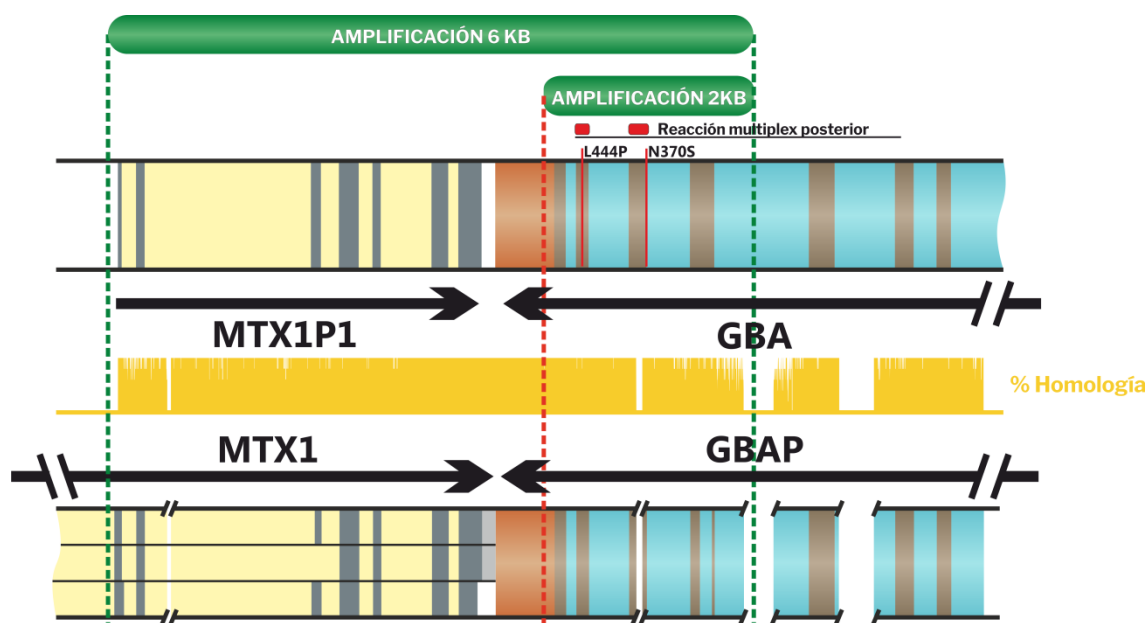
5.3.1.1.1 Amplificación específica del gen GBA

Se analizó en detalle la secuencia de toda la región contenedora de los genes GBA, MTX1 y sus correspondientes pseudogenes. Para ello, se alineó, usando el algoritmo Clustal W (Thompson et al. 1994), las diferentes isoformas expresadas de cada uno de estos elementos con la región genómica para determinar con precisión la localización y detalles de todos los elementos.



Posteriormente se alineó la región génica contenedora del gen GBA y el pseudogen MTX1P1 con la contenedora del pseudogen GBAP y el gen MTX1, determinando las secuencias alineadas homólogas y los huecos en la alineación. Mediante el software VectorNTI 10 (Invitrogen) se calculó el porcentaje de homología entre las regiones alineadas.

Se localizaron los huecos de alineación (secuencias existentes en la región del gen GBA que no se encontraban presentes en la región del pseudogen GBAP) más cercanos a la región donde se encontraban las variantes a analizar y se diseñó una amplificación totalmente específica para el gen GBA de aproximadamente 6 Kb. Para facilitar el proceso de cribado rápido, se diseñó adicionalmente una amplificación de tamaño inferior que podía ser llevada a cabo de manera más rápida y con una polimerasa convencional. Esta amplificación, de aproximadamente 2 Kb, de una manera homóloga a una PCR alelo-específica permitió amplificar preferencialmente la región deseada de GBA.



Se detallan los cebadores a continuación.

Cebadores	Sentido	Región	Secuencia (5' → 3')	Tam.
Amp 1Largo	Directo	Específico zona GBA	TGA AAA GGA GCA GAG ATA GAA TTC G	25 pb
Amp 1Corto	Directo	GBA/GBAP	CCT GCT GTG CCC TCT TTA GTC AC	23 pb
Amp 1	Reverso	Específico zona GBA	GGG GGT GGT GGT TCA TGT AT	20 pb

Amplificación	Cebador directo	Cebador reverso	Producto de PCR
PCR larga específica	Amp1Largo	Amp1 Reverso	5963 pb
PCR región específica	Amp1Corto	Amp1 Reverso	1954 pb

5.3.1.1.2 Pirosecuenciación

Se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos cebadores para amplificar mediante una reacción anidada de LATE-PCR multiplex la región génica de los exones 9 y 10 que contenía las variantes a analizar. Los cebadores, con el cebador reverso marcado con biotina, se indican a continuación

Cebadores	Sentido	Secuencia (5' → 3')	Tam	Producto
Exón 9	Directo	TCT TTG CCT TTG TCC TTA CCC	21 b	185 pb
	Reverso	Biot-AAG TGG CCA AGG TGG TAG AA	20 b	
Exón 10	Directo	GTT CCC ACA TTC AGC AAG TTC A	22 b	134 pb
	Reverso	Biot-CAC CGG TTT AGC ACG AC	17 b	

La secuencia de nucleótidos de estas amplificaciones se adjunta como material suplementario al final de la memoria.

Partiendo de la amplificación específica de la región GBA, mediante el procedimiento descrito en el apartado 4.3.5.1.2 de *Materiales y Métodos* se llevó a cabo la amplificación de los fragmentos y la purificación de las hebras reversas marcadas con biotina.

Mediante la herramienta desarrollada en este trabajo *Simulador de pirogramas* se diseñaron las sondas y el orden de dispensación de los nucleótidos para analizar las variantes a través de diferentes experimentos, quedando detallados a continuación

Sonda	Variante diana	Proteína	Secuencia (5' → 3')	Tamaño
N370S	c.1226A>G	p.Asn409Ser	TTG TCC TTA CCC TAG	15 b
	c.1246G>A	p.Gly416Ser		
	c.1265_1319del	p.Leu422Profs*4		
D409H	c.1342G>C	p.Asp448His	CAT CAT TGT AGA CAT	15 b
L444P	c.1448T>C	p.Leu483Pro	GGG CTG GTT GCC AGT	15 b

Experimento	Sondas usadas	Variantes analizadas	Orden de dispensación	Nucleótidos dispensados
Sonda N370S	N370S	c.1226A>G c.1246G>A c.1265_1319del	GAGCT CTGTA CATGT GTCGA GACTG ACGAC TGACA TCGC	39 nt
Sonda D409H	D409H	c.1342G>C	TCACG AGCTA	10 nt
Sonda L444P	L444P	c.1448T>C	TCAGA GACGA TCTCG	15 nt
N370S + L444P	N370S + L444P	c.1226A>G c.1448T>C	TAGAC AGTAG ACGTA CTCGA T	21 nt

Experimento	Sondas usadas	Variantes analizadas	Orden de dispensación	Nucleótidos dispensados
N370S + L444P + D409H A	N370S + L444P + D409H	c.1226A>G c.1246G>A c.1265_1319del c.1342G>C c.1448T>C	TAGTC AGAGC AGCTC TACAG CATCT CACAT GTGTC AGTCT GACGA CTGCA TCTAC	55 nt
N370S + L444P + D409H B	N370S + L444P + D409H	c.1226A>G c.1246G>A c.1265_1319del c.1342G>C c.1448T>C	TAGTC TCTGT ACAGC TGTGA CGTCG AGACG ATCTG ACGAC TGACT AC	47 nt

5.3.1.2 Muestras analizadas

5.3.1.2.1 Análisis de GBA

Se comprobó la validez del método mediante el análisis de 96 pacientes, con un diagnóstico genético positivo confirmado previamente mediante secuenciación automática capilar, procedentes de la Fundación Española para el Estudio y Terapéutica de la Enfermedad de Gaucher (FEETEG), obteniendo una concordancia del 100% entre ambas técnicas. La distribución de los genotipos comprobados fue el siguiente

Genotipo	N	%
N370S/N370S	15	15,63%
N370S/L444P	29	30,21%
N370S/G377S	1	1,04%
N370S/del55	2	2,08%
N370S/otra	33	34,38%
L444P/L444P	3	3,13%
L444P/otra	1	1,04%
G377S/D409H	7	7,29%
otra/otra	5	5,21%

Adicionalmente, empleando esta metodología se analizó la frecuencia en población general de las mutaciones p.Asn409Ser (N370S) y p.Leu483Pro (L444P) con el análisis de 991 sujetos procedentes de toda España. Los resultados fueron publicados (García-Rodríguez et al. 2012) y pueden consultarse en el artículo adjuntado al final de la memoria como material suplementario.

5.3.1.2.2 Análisis de APOE en pacientes con EG

Adicionalmente, se analizó el genotipo del gen APOE en los 96 pacientes diagnosticados genéticamente con Enfermedad de Gaucher para determinar la presencia del genotipo $\epsilon 4/\epsilon 4$, asociado con procesos neurodegenerativos (Enfermedad de Alzheimer) con los siguientes resultados.

Genotipo	N	%
$\epsilon 2/\epsilon 2$	0	0,00%
$\epsilon 2/\epsilon 3$	16	16,67%
$\epsilon 2/\epsilon 4$	4	4,17%
$\epsilon 3/\epsilon 3$	59	61,46%
$\epsilon 3/\epsilon 4$	12	12,50%
$\epsilon 4/\epsilon 4$	5	5,21%
N Total= 96 pacientes		

5.3.2 Enfermedad de Niemann-Pick

5.3.2.1 Estrategias de diagnóstico desarrolladas

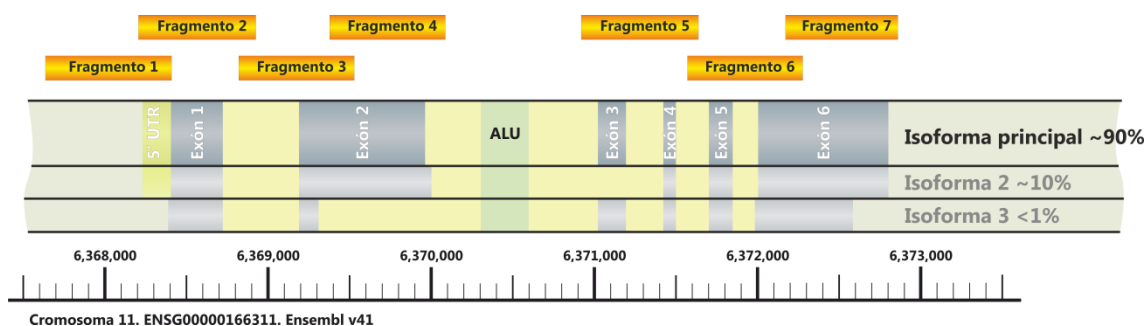
5.3.2.1.1 Tipo A/B - Gen SMPD1

Por las características del gen y las bases moleculares descritas con anterioridad, se decidió analizar la secuencia codificante completa del gen SMPD1 mediante secuenciación automática capilar. Para ello se diseñó un conjunto de 7 pares de oligonucleótidos cebadores que permitían amplificar por PCR todas las regiones génicas a analizar, detallándose a continuación

Cebadores	Sentido	Secuencia (5' → 3')	Tamaño
Amp. 1	Directo	ATG CTC GCT TTT ACT GTC GTG GAT	24 b
	Reverso	GCA TTG TCG CGC TTC CTA CAC	21 b
Amp. 2	Directo	GCC ACC GAG AGA TCA GCT GTC AGA G	25 b
	Reverso	TCT TAC TTC ACA AAG GTC ACA ATG GG	26 b
Amp. 3	Directo	ATG GAG AGG GTG GCA TCT ACA ATC	24 b
	Reverso	CGT GCC CTC CAG GTA GTC AT	20 b
Amp. 4	Directo	CTG GGA CAT TTT CTC ATC TTG GAA C	25 b
	Reverso	AGC CAA ATG AAG AGC ACT AAG GAC	24 b
Amp. 5	Directo	TGG GGA AGA TGT CAT GTA TGC TTT TAC CCT	30 b
	Reverso	GAT GCC CTC TTT CTC CAA CCT GTT CTA GTG	30 b

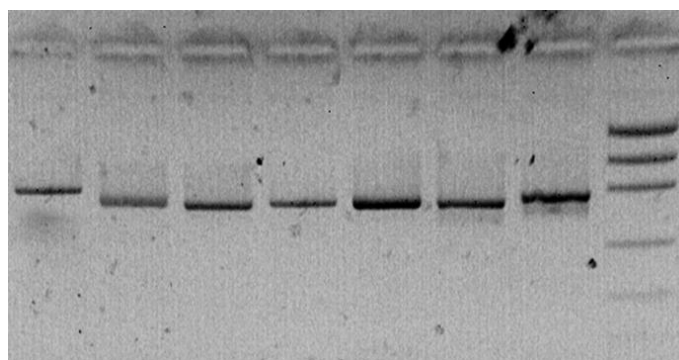
Amp. 6	Directo	CAC CAT CCC TGT TGT CCC ATG GAG T	25 b
	Reverso	CAC AGG GCT CCG AGG GTG GGT	21 b
Amp. 7	Directo	CTA CCG CCT GGC ACA ACC TGG TAT A	25 b
	Reverso	AGA TCT CCT TGC CCT GCT TGC CT	23 b

Número de amplificación	Zona amplificada	Tamaño
Amplificación 1	Zona promotora y 5'UTR	773 pb
Amplificación 2	Exón 1	719 pb
Amplificación 3	Región 5' exón 2	708 pb
Amplificación 4	Región 3' exón 2	709 pb
Amplificación 5	Exones 3 y 4	718 pb
Amplificación 6	Exón 5 y región 5' exón 6	706 pb
Amplificación 7	Región 3' exón 6 y 3' UTR	688 pb



La secuencia de nucleótidos de estas amplificaciones está adjuntada como material suplementario al final de la memoria.

Con el procedimiento descrito en *Materiales y Métodos* (cf. apartado 4.3.6) se llevó a cabo la amplificación y secuenciación de las regiones estudiadas.



La existencia del polimorfismo rs3838786 –consistente en un número variable de repeticiones del hexanucleótido CTG GCG que codifica a su vez un péptido señal polimórfico con un número variable de repeticiones Leu-Ala (Rhein et al. 2014)– provocó que los cromatogramas obtenidos en la secuenciación de la amplificación 2 fueran de difícil interpretación en el caso de que el número de repeticiones fuera

distinto en cada alelo. Para solventarlo, se diseñó la siguiente pareja de cebadores para la realización una nueva reacción de secuenciación adicional que permitió la lectura completa de ambas hebras.

Secuenciación	Sentido	Secuencia (5' → 3')	Tamaño
Adicionales SecAmp 2	Directo	TCT GTC TGA CTC TCG GGT TC	20 b
	Reverso	ATC AGG GAT GCA TTC TGA GC	20 b

5.3.2.1.2 Tipo C – Genes NPC1 y NPC2

5.3.2.1.2.1 Desarrollo de una estrategia de amplificación para optimizar el tamaño de los productos de PCR analizados por secuenciación automática capilar

5.3.2.1.2.1.1 Motivación

El tamaño medio de un exón humano es de aproximadamente 150 pb (International Human Genome Sequencing Consortium 2001), sin embargo la secuenciación tipo Sanger por electroforesis capilar es capaz de analizar fragmentos mucho más largos. Aunque ocasionalmente existen intrones cortos que permiten amplificar y secuenciar en la misma reacción dos exones adyacentes, normalmente los exones se encuentran separados por intrones mucho más largos (Piovesan et al. 2016). Esto causa que habitualmente, al plantear la estrategia de análisis de un gen, se termine equiparando un exón con un producto de PCR y un par de reacciones de secuenciación a pesar de que la longitud del fragmento analizado está muy por debajo de la capacidad de análisis que posee la técnica de secuenciación. Por ello se planteó el desarrollo de una estrategia que permitiera superar esta limitación y aprovechar al máximo las capacidades de las técnicas para optimizar el proceso de análisis genético.

5.3.2.1.2.1.2 Planteamiento teórico

Tomando como referencia la técnica de mutagénesis de sitio dirigido por PCR (Ho et al. 1989) que era realizada en nuestro laboratorio habitualmente –permitiendo crear secuencias mutadas a partir de un DNA mediante su amplificación por PCR con cebadores modificados con dichas mutaciones–se consideró la posibilidad de aprovechar al máximo las posibilidades de generar productos de PCR con secuencias personalizadas en sus extremos. Como se ha visto anteriormente, según

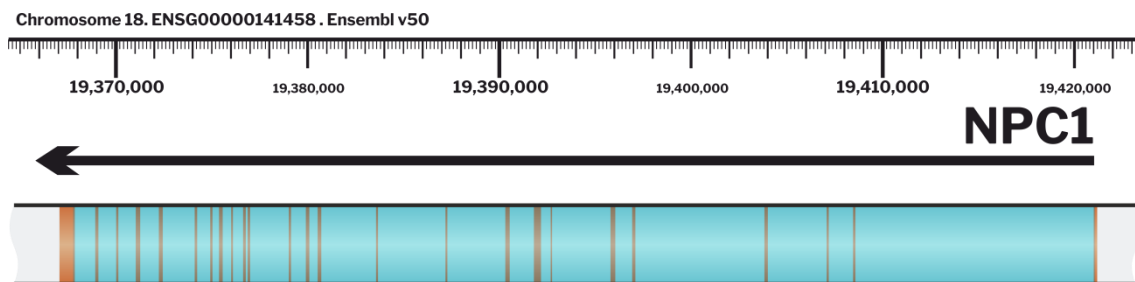
los fundamentos de la técnica de PCR, los productos que se amplifican de manera exponencial en la reacción son los que usan los productos previos como molde para la hibridación y elongación y no los que usan el DNA molde inicial. De esta manera, toda la secuencia que se añadiera en la zona 5' de un oligonucleótido cebador terminaría siendo incorporadas en el extremos del fragmento de doble cadena amplificado.

Basado en este principio, se planteó la posibilidad de amplificar diversos fragmentos pequeños usando diferentes colas específicas y complementarias por pares en posición 5' de cada uno de los cebadores empleados. Una vez generados estos productos con extremos modificados, al juntarlos en un segundo paso en una reacción con las condiciones químicas y térmicas de una PCR, las secuencias complementarias de los distintos fragmentos –introducidas por las colas– hibridarían entre sí y, en los casos en los que la hibridación se produjera en el extremo 3' se produciría la elongación de la cadena por parte de la DNA polimerasa. En este proceso ya se obtendría una secuencia recombinante de DNA consistente en la secuencia de dos fragmentos diana amplificados unidos por la secuencia de unión proporcionada por las colas de los cebadores. En el proceso cíclico, a su vez esta secuencia seguiría hibridando con otras secuencias con extremos complementarios que, en el caso de hacerlo en 3', seguiría elongando la cadena y creando la estructura de diana-unión-diana hasta producir una secuencia conteniendo todos los fragmentos amplificados y unidos. Para seleccionar y amplificar exponencialmente esta secuencia completa frente a todos los intermediarios anteriores se introduciría, en el cebador directo del fragmento extremo en 5' y en el cebador reverso del fragmento extremo en 3', una secuencia específica correspondiente a unos cebadores universales. Al introducir dichos cebadores en la reacción sólo se produciría la amplificación exponencial por PCR de la secuencia completa conteniendo todos los fragmentos. A su vez, estos cebadores de la amplificación serían los cebadores para la reacción de secuenciación del DNA recombinante generado. El proceso seguiría el siguiente esquema



5.3.2.1.2.3 Prueba de concepto

Para comprobar la validez del concepto, se planteó una estrategia de amplificación del gen NPC1 (cuyas mutaciones están relacionadas con la enfermedad de Niemann-Pick tipo C) al reunir éste unas características que permitían aprovechar enormemente las ventajas potenciales del procedimiento. El gen se expandía alrededor de 55 Kb, distribuyendo su secuencia codificante en 25 exones de pequeño tamaño y separados por intrones de gran tamaño, ajustándose perfectamente a la motivación del desarrollo.



La longitud del intrón 15 (97 pb) permitió plantear la amplificación de los 25 exones en 24 amplificaciones, con lo que aplicando la estrategia de unión con 3 fragmentos se podía realizar la amplificación de todos los exones en 8 reacciones y ajustar el trabajo en placas con pipetas multicanal.

Como prueba de concepto, se diseñó la amplificación y unión de 3 fragmentos que, por tamaño, resultaban una muestra representativa del conjunto (correspondientes a exón 03, 07 y 08).

5.3.2.1.2.1.3.1 Esquema del experimento

Se diseñó el siguiente esquema para las modificaciones de secuencia en la posición 5' de los cebadores para la unión de los fragmentos generados.

Núm.	Zona	Cola cebador directo	Cola cebador reverso
Amp08	Exón8	Secuencia cebador universal directo	Complementaria a cola del cebador Amp07 directo
Amp07	Exón7	Complementaria a cola del cebador Amp08 reverso	Complementaria a cola del cebador Amp03 directo
Amp03	Exón3	Complementaria a cola del cebador Amp07 reverso	Secuencia cebador universal reverso

De esta manera, tras la amplificación inicial de los fragmentos por PCR, mediante el proceso de unión se produciría un DNA recombinante cuya secuencia correspondería a la región amplificada en el exón 8, 7 y 3, con la secuencia de las

colas de unión intercalada entre ellas y la secuencia de los cebadores universales en los extremos.

5.3.2.1.2.1.3.2 Diseño de los cebadores iniciales

Se diseñaron los cebadores con el programa Oligo6 (Molecular Biology Insights) para amplificar la secuencia codificante y, al menos, 30 bases de los nexos exón-intrón de los exones 3, 7 y 8

Núm.	Sentido	Secuencia (5' → 3')	Tam.	Zona amp.	Prod.
Amp 03	Directo	CCT TAC TCT AAC TGT TGC CTA CTC	24 b	Exón 03	235pb
	Reverso	GAA TAA ATG GAA AGC TGA GCA TTA	24 b		
Amp 07	Directo	GTC CCA AAA ACA ACC TCA CT	20 b	Exón 07	189pb
	Reverso	ATG ACA GAC AGC ATC ATC TGA	21 b		
Amp 08	Directo	ATG CTT TCC CTG TTC CGA C	19 b	Exón 08	508pb
	Reverso	GTA AAA GCC AGC AAA CCA CAA G	22 b		

Dichos cebadores se diseñaron para permitir la amplificación por PCR en las mismas condiciones químicas y térmicas, con una temperatura de hibridación T_a en torno a 55-60°C. Adicionalmente se comprobó la ausencia de interacciones de consideración entre todos ellos.

5.3.2.1.2.1.3.3 Diseño de los cebadores modificados y de los cebadores universales

Siguiendo el esquema planteado para las modificaciones en 5' de los cebadores, se diseñaron las colas complementarias entre ellos y un par de cebadores universales para PCR y secuenciación usando el programa Oligo6.

El criterio para el diseño de las colas se basó en tres principios. El primero fue el genérico que se aplicaba para el diseño de cualquier oligonucleótido que actúe como cebador, ya que era la función esperada en la reacción de unión. Este criterio se expone en el apartado 1.4.1.4.2, pero brevemente se resume en una elevada especificidad, en una composición de bases equilibrada, la ausencia de homopolímeros, de estructuras secundarias internas de relevancia y de zonas termodinámicamente muy estables. El segundo fue, al unir la cola al cebador inicial y considerar la secuencia en su totalidad, la ausencia de estructuras secundarias internas de relevancia. Por último, se buscó que la estabilidad de hibridación entre los cebadores con colas complementarias –medida a través de su T_m – fuera similar en ambos casos y, de manera adicional, que ésta fuera igual o

superior a la que presentaban los cebadores iniciales para la amplificación por PCR.

Para el diseño de los cebadores universales se aplicaron los mismos principios genéricos anteriores y dos consideraciones adicionales. La primera fue que se diseñaron para llevar a cabo las reacciones de PCR con una temperatura de hibridación T_a en torno a 60°C. La segunda fue que, debido a su vocación de uso universal para otras reacciones, se exigió una especificidad máxima en la hibridación para cada uno de los cebadores. Para ello, la secuencia de cada uno de los cebadores fue enfrentada mediante BLAST (Altschul et al. 1990) y ThermoBLAST (DNA Software) contra la secuencia del genoma humano completo sin encontrar similitudes significativas.

De esta manera se diseñaron los siguientes cebadores modificados (las secuencias en minúscula indican la cola) y los cebadores universales.

Núm.	Sentido	Secuencia (5' → 3')	Tam
Amp 03	Directo	cat ggc tgc att cgc tCC TTA CTC TAA CTG TTG CCT ACT C	40 b
	Reverso	aac gca cac gat gga ccA ATA AAT GGA AAG CTG AGC ATT A	40 b
Amp 07	Directo	tta cgg agc gtc tct gtg cgG TCC CAA AAA CAA CCT CAC T	40 b
	Reverso	gta agg agc gaa tcg agc cAT GAC AGA CAG CAT CAT CTG A	40 b
Amp 08	Directo	tgt tac tat cac gcc cac gcA ATG CTT TCC CTG TTC CGA C	40 b
	Reverso	acc gca cag aga cgc tcc GTA AAA GCC AGC AAA CCA CAA G	40 b
Cebadores universales	Directo	TGT TAC TAT CAC GCC CAC GC	20 b
	Reverso	AAC GCA CAC GAT GGA CCA AT	20 b

Número de amplificación	Zona amplificada	Tamaño
Amplificación 03	Exón 03	267 pb
Amplificación 07	Exón 07	228 pb
Amplificación 08	Exón 08	547 pb

La interacción esperada entre dichos cebadores y las secuencias generadas en la unión fueron las siguientes:

Entre el cebador 08 reverso y el 07 directo

```

07 Directo          5' tta cgg agc gtc tct gtg cgG TCC CAA AAA CAA CCT CAC T
                    ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |
GAA CAC CAA ACG ACC GAA AAT Gcc tcg cag aga cac gcc a 5'      08 Reverso
    
```

Secuencia generada (5' → 3')

CTT GTG GTT TGC TGG CTT TTA Cgg agc gtc tct gtg cgG TCC CAA AAA CAA CCT CAC T

Entre el cebador 07 reverso y el 03 directo

```

03 Directo      5' cat ggc tgc att cgc tCC TTA CTC TAA CTG TTG CCT ACT C
                ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |
AGT CTA CTA CGA CAG ACA GTA ccg agc taa gcg agg aat g 5'      07 Reverso

```

Secuencia generada (5' → 3')

TCA GAT GAT GCT GTC TGT CAT ggc tgc att cgc tCC TTA CTC TAA CTG TTG CCT ACT C

5.3.2.1.2.1.3.4 Amplificación por PCR

Se amplificó por PCR de manera simultánea y con las mismas condiciones químicas y térmicas cada uno de los fragmentos empleando los cebadores modificados. Debido a que el objetivo de esta primera amplificación era solamente obtener los fragmentos que iban a formar la molécula recombinante completa y no era crítica la cantidad de producto obtenido, se empleó simultáneamente las concentraciones *estándar* de PCR y unas concentraciones *diluidas* de ciertos reactivos con propósito de optimización.

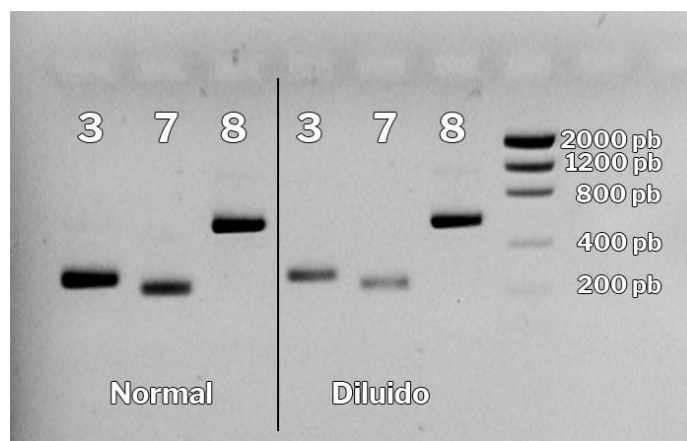
Alícuotas	Concentración
Tampón	10X
dNTP	2 mM
MgCl ₂	50 mM
Cebadores	5 μM
PlatinumTaq	5 U/μL
DNA	25 ng/μL

	Concentración final <i>estándar</i>	Volumen unitario <i>estándar</i> (10 μL total)	Concentración final <i>diluida</i>	Volumen unitario <i>diluido</i> (10 μL total)
Agua		6,35 μL		7,5 μL
Tampón	1,0 X	1 μL	1,0 X	1 μL
dNTP	200 μM	1 μL	100 μM	0,5 μL
MgCl ₂	1,5 mM	0,3 μL	1,5 mM	0,3 μL
Cebador dir.	200 nM	0,4 μL	50 nM	0,1 μL
Cebador rev.	200 nM	0,4 μL	50 nM	0,1 μL
Platinum Taq	0,025 U/μL	0,05 μL	0,025 U/μL	0,05 μL
DNA	2,5 ng/μL	0,5 μL	2,5 ng/μL	0,5 μL

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) mediante las siguientes condiciones térmicas

94°C 2'; 30 x [94°C 20" – 60°C 20" – 72°C 30"]; 72°C 5'; 4°C ∞

El resultado se comprobó en agarosa estándar al 2%, como se muestra a continuación



5.3.2.1.2.1.3.5 Unión de los productos de PCR

Para la formación de la unión de los fragmentos amplificados se siguió el protocolo de una reacción de PCR convencional, pero empleando la unión de los productos como molde para la amplificación exponencial en lugar de DNA genómico. Según el planteamiento teórico se esperaba que, durante los primeros ciclos de la PCR, se fueran ensamblando los productos iniciales hasta generar el fragmento recombinante completo para ser amplificado exponencialmente con los cebadores universales.

El tamaño de la unión esperado para estos fragmentos fue de 998 pb.

Alícuotas	Concentración
Tampón	10X
dNTP	2 mM
MgCl ₂	50 mM
Cebadores universales	10 µM
PlatinumTaq	5 U/µL

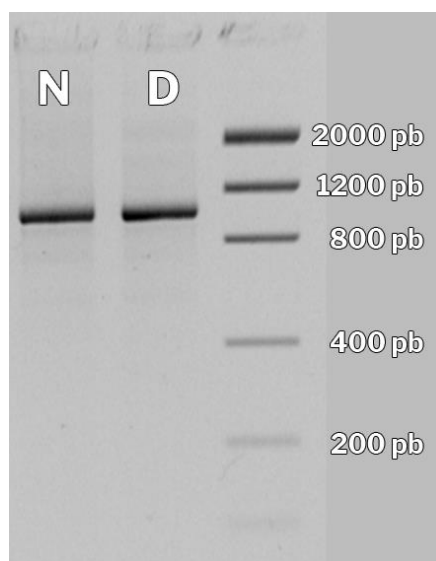
	Concentración final	Volumen unitario (10 µL total)
Agua		6,25 µL
Tampón	1,0 X	1 µL
dNTP	200 µM	1 µL

	Concentración final	Volumen unitario (10 μ L total)
MgCl ₂	1,5 mM	0,3 μ L
Cebador directo	250 nM	0,25 μ L
Cebador reverso	250 nM	0,25 μ L
PlatinumTaq	0,025 U/ μ L	0,05 μ L (0,25 U)
Producto PCR	-	0,3 μ L de cada uno

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) mediante las siguientes condiciones térmicas

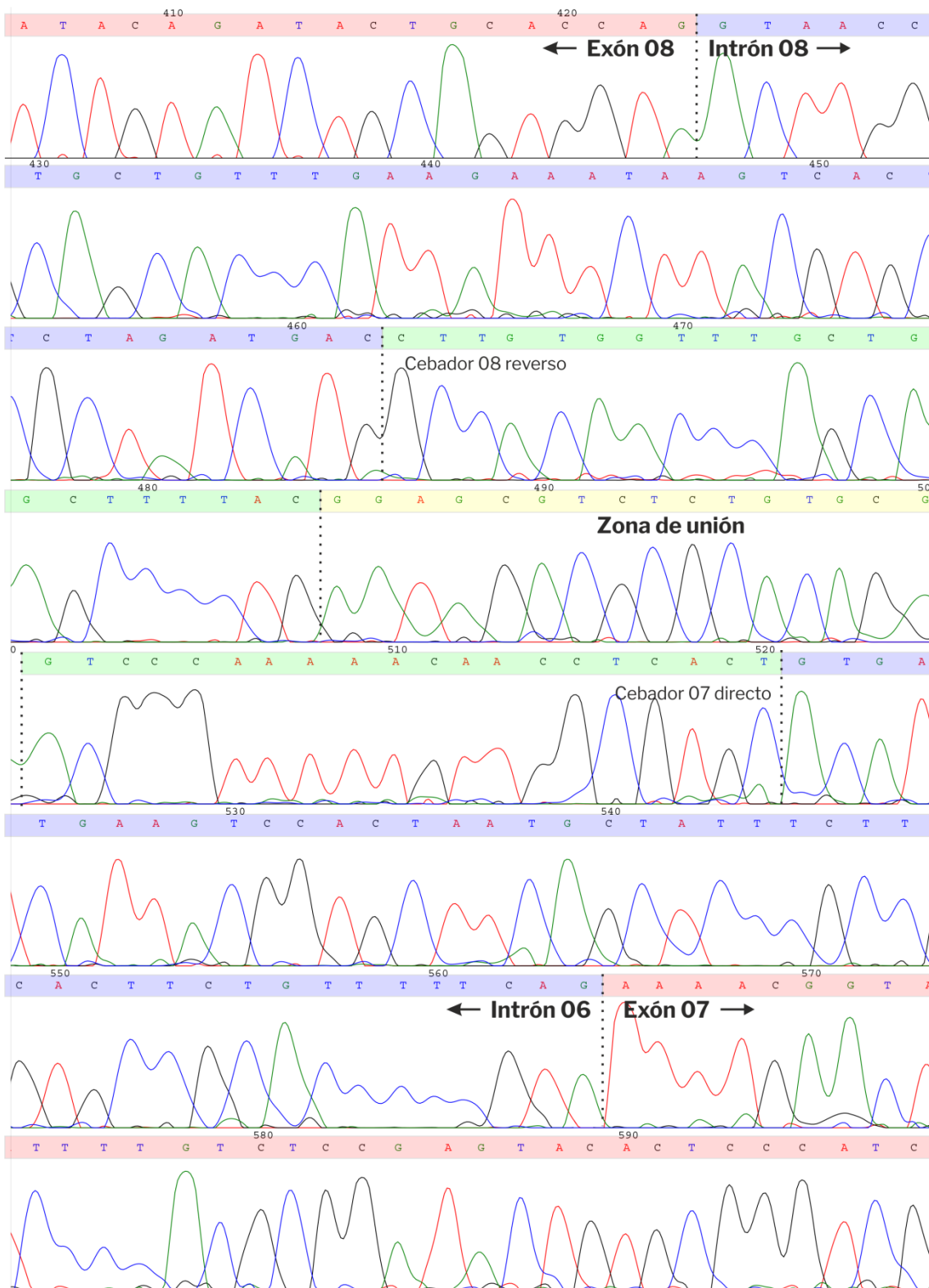
94°C 2'; 10 x [94°C 20" – 60°C 40" – 72°C 60"]; 30 x [94°C 20" – 60°C 20" – 72°C 60"]; 72°C 5'; 4°C ∞

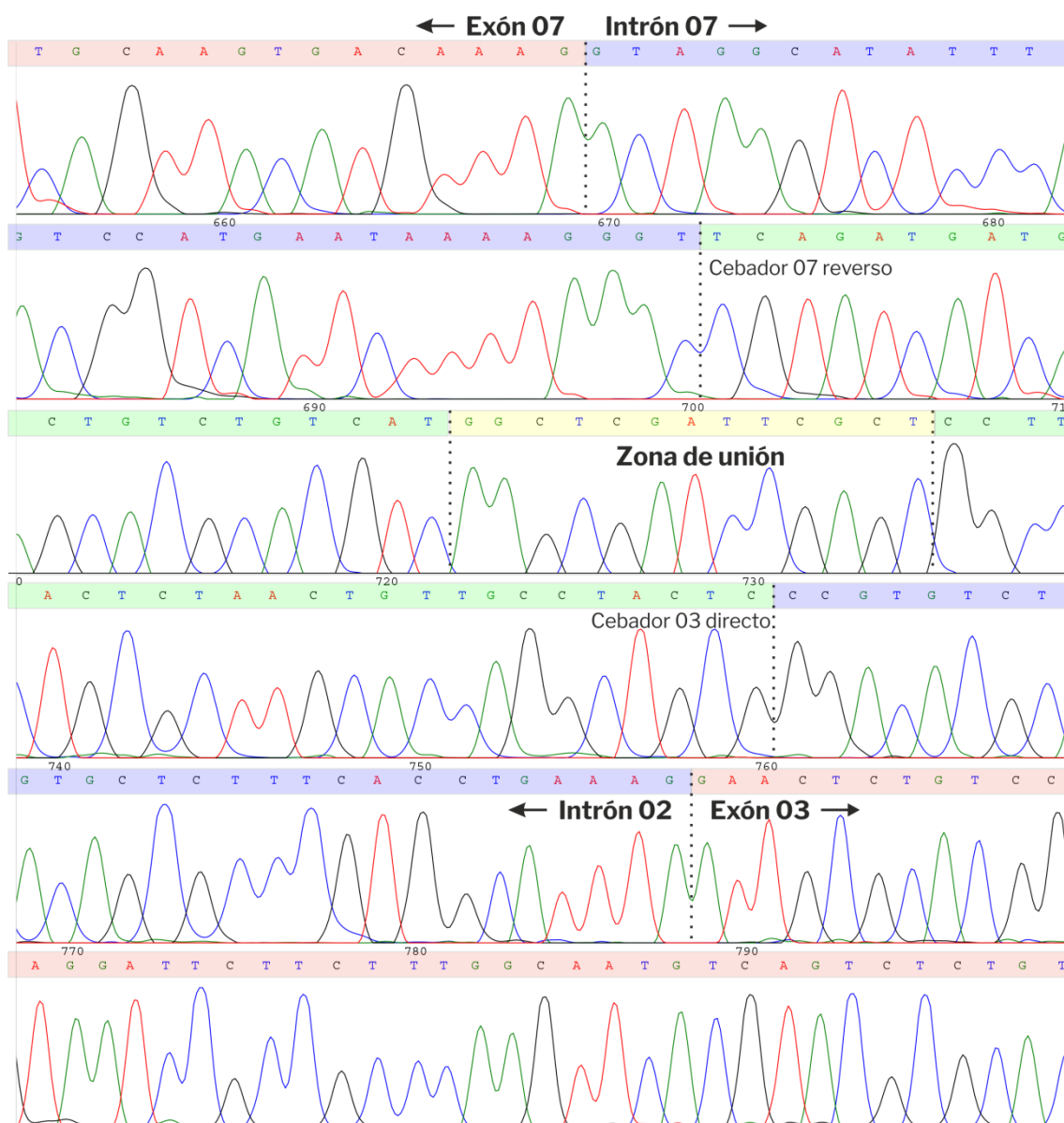
El resultado se comprobó en agarosa estándar al 2% como se muestra a continuación



5.3.2.1.2.1.3.6 Secuenciación

Para verificar que el resultado de esta unión se trataba de la molécula recombinante diseñada, se procedió a su secuenciación en el sistema MegaBACE 500 siguiendo el protocolo estándar descrito previamente.



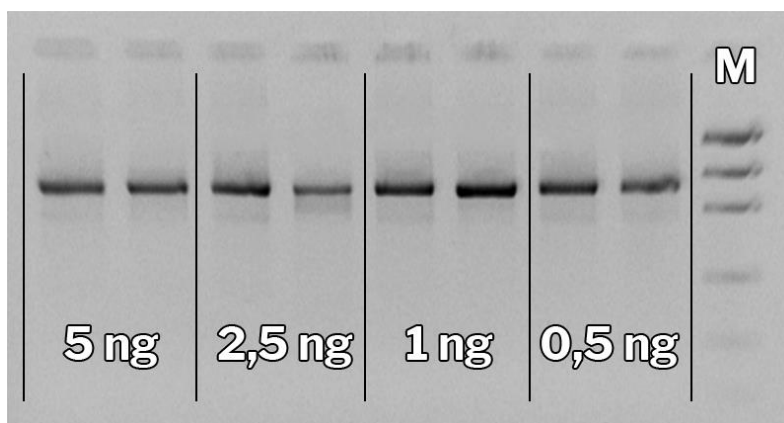


De esta manera quedó demostrada la formación de la molécula recombinante con el tamaño y la estructura concebidos, dando validez al planteamiento inicial.

5.3.2.1.2.1.3.7 Ajuste de la cantidad de DNA molde inicial

Durante las pruebas de unión realizadas se observó que la cantidad de molécula recombinante generada no dependía directamente de la concentración de los productos individuales amplificados inicialmente. Al ser la reacción de unión una variante de una PCR anidada, la generación de unas pocas moléculas recombinantes completas era suficiente para iniciar la amplificación exponencial y obtener la cantidad necesaria de producto para los análisis posteriores.

Para comprobar hasta qué punto podía reducirse la necesidad de generación de los fragmentos individuales iniciales, se diseñó un experimento en el que se realizó la amplificación por PCR en las condiciones *diluidas* descritas anteriormente pero variando la cantidad de DNA genómico total añadido en cada reacción (5 ng – 2,5 ng – 1 ng – 0,5 ng). Posteriormente se llevó a cabo la reacción de unión en las mismas condiciones y se comprobó el resultado por electroforesis en gel de agarosa.



De esta manera se demostró que, además de la optimización conseguida en la amplificación y el tamaño para la secuenciación, se podía disminuir drásticamente la cantidad de DNA genómico necesario para la realización de un análisis genético complejo frente a protocolos anteriores.

5.3.2.1.2.2 Tipo C1 – Gen NPC1

Por las características del gen y las bases moleculares descritas anteriormente, se decidió analizar la secuencia codificante completa del gen mediante secuenciación automática capilar. Para facilitar el trabajo en placas de 96 pocillos y teniendo en cuenta la extensión del gen y el número y longitud de sus exones se decidió seguir la estrategia de unión de fragmentos para generar 8 uniones que contuvieran la secuencia de todos los exones.

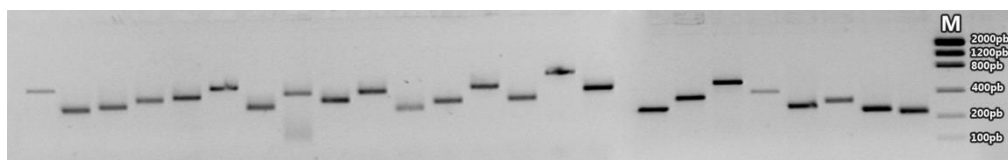
Para ello se diseñó un conjunto de 24 pares de oligonucleótidos cebadores que permitían amplificar por PCR de manera simultánea, bajo las mismas condiciones químicas y térmicas, todas las regiones génicas a analizar. Adicionalmente, y como se acaba de comentar, se diseñaron las colas en 5' de los cebadores que permitieron unir los fragmentos en un segundo paso. La secuencia de los cebadores se detalla a continuación.

Cebadores	Sentido	Secuencia (5' → 3')	Tam
Amp 01	Directo	gaa gta gcg tat ctg tGC CCG GGC CAG GGA GTC C	34 b
	Reverso	aat cta gct aat ccg tcc taC CGT CGC TGG GCC CGT CG	38 b
Amp 02	Directo	agt ggt cag cgt atc ata gag TGA GAC CCT GGT AAC ACT G	40 b
	Reverso	act tct ccc agc gaa tag aca TGA TCA GCA TTT TGT GTT C	40 b
Amp 03	Directo	cat ggc tcg att cgc tCC TTA CTC TAA CTG TTG CCT ACT C	40 b
	Reverso	aac gca cac gat gga cca ATA AAT GGA AAG CTG AGC ATT A	40 b
Amp 04	Directo	ggc ttc tac aaa cgt aag GCC CTA TTA TGT GTG AGA T	37 b
	Reverso	cat cct agc gaa tcc agt cAA TTT GCT CTG CTG TCC TGA T	40 b
Amp 05	Directo	cat ggg gct tcc ttc gct CCT CGT GAA TTA CAG CAA GCA T	40 b
	Reverso	aac gca cac gat gga cca atc taT cTG CCC AGC CAG TTC C	40 b
Amp 06	Directo	att cta ctg gtc acc cct TTG GAT GTT TTT AAT TGA GAT T	40 b
	Reverso	aac gca cac gat gga cca atT AAC CAA GCT CTG ACA AAT G	40 b
Amp 07	Directo	tta cgg agc gtc tct gtg cgG TCC CAA AAA CAA CCT CAC T	40 b
	Reverso	gta agg agc gaa tcg agc cAT GAC AGA CAG CAT CAT CTG A	40 b
Amp 08	Directo	tgt tac tat cac gcc cac gcA ATG CTT TCC CTG TTC CGA C	40 b
	Reverso	acc gca cag aga cgc tcc GTA AAA GCC AGC AAA CCA CAA G	40 b
Amp 09	Directo	aag taa tgt aga gtc gct gtT GAG AGA AAT GTG ACG TGT T	40 b
	Reverso	ttc acg agg agc gaa gga agc CCC ATG TAC CCT AAG TCA G	40 b
Amp 10	Directo	aca tgc gga gcg tca cac tcg TCT TGA GGC CCT TCT AAC T	40 b
	Reverso	tct tcc agc gaa tcc gac CTA ATG ACA AAA CCG AGA TG	38 b
Amp 11	Directo	tgt tac tat cac gcc cac gcT CCC CTG GTA TGT GTC TAA T	40 b
	Reverso	tga aca cgc tat gat acg ctg aCC GCA AGT GTC TAG CTT C	40 b
Amp 12	Directo	gat cat gtc tat tcg ctG GGA GAA GTT TCT TAC TTA GCT G	40 b
	Reverso	aac gca cac gat gga cca atG AGG CAA AAA TAT GAC GTT A	40 b
Amp 13	Directo	cgg ttt cgc acg att cgc aTA ACA AGT GGG ACA GAC AAC C	40 b
	Reverso	aac gca cac gat gga cca ata CCC AGG AGC CAT TCA CAG T	40 b
Amp 14	Directo	tgt tac tat cac gcc cac gcA GCA AGA AAT GaC GTT GTT A	40 b
	Reverso	gca cag ata cgc tac TTC TCC AGG CTC AGC AGA CTA	36 b
Amp 15	Directo	tgt tac tat cac gcc cac gcA TGC ACA TGA ACA TAA GAC C	40 b
	Reverso	aga cga gtg tga cgc tcc GCA TGT GAT AAT CTG TTT CAG T	40 b
Amp 16	Directo	tag gac gga tta gct aGA TTT TAT TTC TGG TCG TAA GC	38 b
	Reverso	aac gca cac gat gga cca atA AAA ATG TAT TCA TCA TCA G	40 b
Amp 17	Directo	tgt tac tat cac gcc cac gcT CTC CAT GAT CCT CGC CTT G	40 b
	Reverso	ggg cat gaa cag aga acc tcc AGA GCC TCC TCC GCT GCT T	40 b
Amp 18	Directo	tag gtc gga ttc gct gga AGA CTT CCT CCC TGT GGA GC	38 b
	Reverso	aac gca cac gat gga cca atT AAA CTG AGG CAC GAT GCA A	40 b
Amp 19	Directo	tgt tac tat cac gcc cac gcA ATC TGG AGA CCT ATT CTT C	40 b
	Reverso	gcc tta cgt ttg tag aag CCC AGT CCT CTC CTA GTT T	37 b
Amp 20	Directo	tgt tac tat cac gcc cac gcA GCC TCA AGT GCT CAG ATT C	40 b
	Reverso	gtc tca ctc tat gat acg ctg aCC ACT CCC ACC CAG TGT A	40 b
Amp 21	Directo	gag caa att gac tgg att cgc tAG GAT GAA CAC GCA GTG T	40 b
	Reverso	aac gca cac gat gga cca atG GTT TAC ATG GAA TCT AAG A	40 b
Amp 22	Directo	tgt tac tat cac gcc cac gcc AGC ACC CAT CCT CAG AAC G	40 b
	Reverso	ctc tca aca gcg act cta cAT TAC TTT GTG GTG CGA CTC T	40 b

Cebadores	Sentido	Secuencia (5' → 3')	Tam
Amp 23	Directo	gcg gtc agc gta tca tag cgT GTT CAA TTA CAG GTT GGT A	40 b
	Reverso	cat cca aag ggg tga cca gta GAA TGC CTC AGG ATA GAA T	40 b
Amp 24	Directo	gag gct ctg gag gtt ctc tgt tcA TGC CCA GCC AAC TAG C	40 b
	Reverso	ttg tta tgc gaa tcg tgc gAA ACC GAC CGA CCC TTA GAC A	40 b

Número de amplificación	Zona amplificada	Tamaño
Amplificación 01	Exón 01	420 pb
Amplificación 02	Exón 02	251 pb
Amplificación 03	Exón 03	267 pb
Amplificación 04	Exón 04	324 pb
Amplificación 05	Exón 05	336 pb
Amplificación 06	Exón 06	422 pb
Amplificación 07	Exón 07	228 pb
Amplificación 08	Exón 08	547 pb
Amplificación 09	Exón 09	384 pb
Amplificación 10	Exón 10	249 pb
Amplificación 11	Exón 11	276 pb
Amplificación 12	Exón 12	367 pb
Amplificación 13	Exón 13	351 pb
Amplificación 14	Exón 14	270 pb
Amplificación 15	Exón 15 y exón 16	538 pb
Amplificación 16	Exón 17	257 pb
Amplificación 17	Exón 18	354 pb
Amplificación 18	Exón 19	293 pb
Amplificación 19	Exón 20	295 pb
Amplificación 20	Exón 21	382 pb
Amplificación 21	Exón 22	420 pb
Amplificación 22	Exón 23	285 pb
Amplificación 23	Exón 24	332 pb
Amplificación 24	Exón 25	237 pb

Con el procedimiento descrito en *Materiales y Métodos* se llevó a cabo la amplificación por PCR de las regiones estudiadas.



La unión de los fragmentos mediante la interacción de los extremos de los fragmentos generados por las colas diseñadas siguió el siguiente esquema

Unión 1	Cola cebador directo	Cola cebador reverso
Amp 14	Secuencia cebador universal directo	Complementaria a cola del cebador Amp01 directo
Amp 01	Complementaria a cola del cebador Amp14 reverso	Complementaria a cola del cebador Amp16 directo
Amp 16	Complementaria a cola del cebador Amp01 reverso	Secuencia cebador universal reverso

Unión 2	Cola cebador directo	Cola cebador reverso
Amp 20	Secuencia cebador universal directo	Complementaria a cola del cebador Amp02 directo
Amp 02	Complementaria a cola del cebador Amp20 reverso	Complementaria a cola del cebador Amp12 directo
Amp 12	Complementaria a cola del cebador Amp02 reverso	Secuencia cebador universal reverso

Unión 3	Cola cebador directo	Cola cebador reverso
Amp 08	Secuencia cebador universal directo	Complementaria a cola del cebador Amp07 directo
Amp 07	Complementaria a cola del cebador Amp08 reverso	Complementaria a cola del cebador Amp03 directo
Amp 03	Complementaria a cola del cebador Amp07 reverso	Secuencia cebador universal reverso

Unión 4	Cola cebador directo	Cola cebador reverso
Amp 19	Secuencia cebador universal directo	Complementaria a cola del cebador Amp04 directo
Amp 04	Complementaria a cola del cebador Amp19 reverso	Complementaria a cola del cebador Amp21 directo
Amp 21	Complementaria a cola del cebador Amp04 reverso	Secuencia cebador universal reverso

Unión 5	Cola cebador directo	Cola cebador reverso
Amp 22	Secuencia cebador universal directo	Complementaria a cola del cebador Amp09 directo
Amp 09	Complementaria a cola del cebador Amp22 reverso	Complementaria a cola del cebador Amp05 directo
Amp 05	Complementaria a cola del cebador Amp09 reverso	Secuencia cebador universal reverso

Unión 6	Cola cebador directo	Cola cebador reverso
Amp 11	Secuencia cebador universal directo	Complementaria a cola del cebador Amp23 directo
Amp 23	Complementaria a cola del cebador Amp11 reverso	Complementaria a cola del cebador Amp06 directo
Amp 06	Complementaria a cola del cebador Amp23 reverso	Secuencia cebador universal reverso

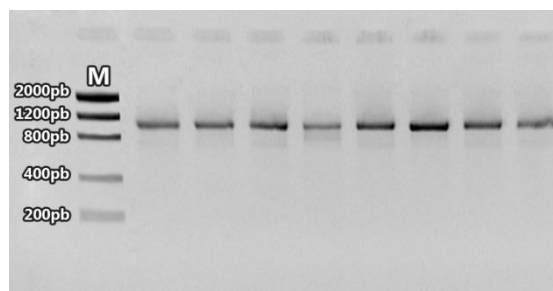
Unión 7	Cola cebador directo	Cola cebador reverso
Amp 15	Secuencia cebador universal directo	Complementaria a cola del cebador Amp10 directo
Amp 10	Complementaria a cola del cebador Amp15 reverso	Complementaria a cola del cebador Amp18 directo
Amp 18	Complementaria a cola del cebador Amp10 reverso	Secuencia cebador universal reverso

Unión 8	Cola cebador directo	Cola cebador reverso
Amp 17	Secuencia cebador universal directo	Complementaria a cola del cebador Amp24 directo
Amp 24	Complementaria a cola del cebador Amp17 reverso	Complementaria a cola del cebador Amp13 directo
Amp 13	Complementaria a cola del cebador Amp24 reverso	Secuencia cebador universal reverso

Para la amplificación exponencial del DNA recombinante de la unión de los fragmentos se empleó el procedimiento descrito en el apartado 4.3.7.3 empleando los cebadores universales diseñados.

	Sentido	Secuencia (5' → 3')	Tamaño
Cebadores universales	Directo	TGT TAC TAT CAC GCC CAC GC	20 b
	Reverso	AAC GCA CAC GAT GGA CCA AT	20 b

Grupos	Elementos	Tamaño
Unión 1	Amp. 14 + Amp. 01 + Amp. 16	956 pb
Unión 2	Amp. 20 + Amp. 02 + Amp. 12	947 pb
Unión 3	Amp. 08 + Amp. 07 + Amp. 03	998 pb
Unión 4	Amp. 19 + Amp. 04 + Amp. 21	959 pb
Unión 5	Amp. 22 + Amp. 09 + Amp. 05	952 pb
Unión 6	Amp. 11 + Amp. 23 + Amp. 06	979 pb
Unión 7	Amp. 15 + Amp. 10 + Amp. 18	995 pb
Unión 8	Amp. 17 + Amp. 24 + Amp. 13	888 pb



La secuencia de nucleótidos de estas uniones se adjunta como material suplementario al final de la memoria.

Con el procedimiento descrito en *Materiales y Métodos* (cf. apartado 4.3.7.4) se llevó a cabo la secuenciación de los productos de unión obtenidos.

La existencia de una región homopolimérica poliT en el intrón 13 adyacente al exón 14 (amplificación 14 – unión 1) y en el intrón 17 adyacente al exón 17 (amplificación 16 – unión 1) causó ocasionalmente el fallo de la reacción de secuenciación. Para permitir la secuenciación de la unión atravesando esas regiones se diseñaron un par de cebadores, usados para la unión 1, y que se detallan a continuación

Cebador	Sentido	Secuencia (5' → 3')	Tamaño
Sec14D	Directo	AAT GTC GCA TAA TTT TTT TTT TTT TTT TTT AAG	33 b
Sec16R	Reverso	TCA GCT AAA GAA GTT AAA AAA AAA AAA AAA AGG AAG	36 b

5.3.2.1.2.3 Tipo C2 – Gen NPC2

Por las características del gen y las bases moleculares descritas anteriormente, se decidió analizar la secuencia codificante completa del gen mediante secuenciación automática capilar. Teniendo en cuenta la extensión del gen y el número y longitud de sus exones, se decidió seguir la estrategia de unión de fragmentos para generar un DNA recombinante que contuviera la secuencia de todos los exones y nexos exón-intrón amplificados simultáneamente en 5 fragmentos mediante PCR multiplex.

Para ello se diseñó un conjunto de 5 pares de oligonucleótidos cebadores compatibles entre sí para permitir la amplificación por PCR multiplex y con colas en 5' para permitir la unión posterior. La secuencia de los cebadores se detalla a continuación.

Cebadores	Sentido	Secuencia (5' → 3')	Tam
Amp. 1	Directo	tgt tac tat cac gcc cac gcA CAG GTT TGT CTT GTG ACC G	40 b
	Reverso	ggc tgg ctg ctc gaG GGC GCG GGA ACC TTG	30 b
Amp. 2	Directo	cga gca gcc agc caG CTT ATT TCT CCT CCT ATT CT	35 b
	Reverso	agg ccg ggc cgc taT TAT GCT GTA ACA TGA ATT TGA GT	38 b
Amp. 3	Directo	agc ggc ccg gcc taT TAT TTT CTT TGC CAT CTG ATT	36 b
	Reverso	agc cgc cgc gca gaC CTC CCG TGT CCT CAA TA	32 b
Amp. 4	Directo	ctg cgc ggc ggc taA TTA TGG ATA GAA GTC AGG TCC TA	38 b
	Reverso	tcc gcg agc ccg aaA CTT TCT TCC CTC CAC CCA	33 b
Amp. 5	Directo	ttc ggg ctc gcg gaG TTC CAA ACC ACT TCC ACT G	34 b
	Reverso	aac gca cac gat gga cca atC ATT GGC CAG ATG CAC	36 b

Número de amplificación	Zona amplificada	Tamaño
Amplificación 1	Exón 1	217 pb
Amplificación 2	Exón 2	229 pb
Amplificación 3	Exón 3	272 pb
Amplificación 4	Exón 4	212 pb
Amplificación 5	Exón 5	124 pb

Con el procedimiento descrito en el apartado 4.3.8.1 de *Materiales y Métodos* se llevó a cabo la reacción de PCR multiplex.

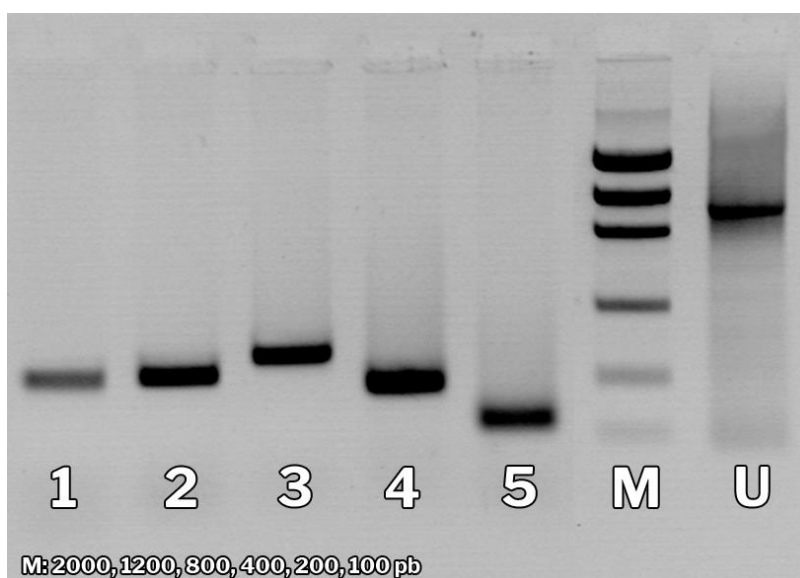
La unión de los fragmentos mediante la interacción de los extremos de los fragmentos generados por las colas diseñadas siguió el siguiente esquema

Unión	Cola cebador directo	Cola cebador reverso
Amp 1	Secuencia cebador universal directo	Complementaria a cola del cebador Amp2 directo
Amp 2	Complementaria a cola del cebador Amp1 reverso	Complementaria a cola del cebador Amp3 directo
Amp 3	Complementaria a cola del cebador Amp2 reverso	Complementaria a cola del cebador Amp4 directo
Amp 4	Complementaria a cola del cebador Amp3 reverso	Complementaria a cola del cebador Amp5 directo
Amp 5	Complementaria a cola del cebador Amp04 reverso	Secuencia cebador universal reverso

La amplificación exponencial del DNA recombinante generado en la unión de los fragmentos se llevó a cabo con el procedimiento descrito previamente empleando los cebadores universales diseñados.

	Sentido	Secuencia (5' → 3')	Tamaño
Cebadores universales	Directo	TGT TAC TAT CAC GCC CAC GC	20 b
	Reverso	AAC GCA CAC GAT GGA CCA AT	20 b

De esta manera, se generó un DNA recombinante de 1001 pb, cuya secuencia de nucleótidos se adjunta como material suplementario al final de la memoria.



Con el procedimiento descrito en *Materiales y Métodos* (cf. apartado 4.2.8.3) se llevó a cabo la secuenciación de este producto de unión obtenido.

5.3.2.2 Muestras analizadas

Se recibieron diferentes muestras de pacientes con sospecha clínica de enfermedad de Niemann-Pick procedentes de la Fundación Española para el Estudio y la Terapéutica de la Enfermedad de Gaucher (FEETEG) y de unidades clínicas colaboradoras del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) para la comprobación de mutaciones en los genes asociados a la enfermedad.

5.3.2.2.1 Análisis SMPD1

Se analizó la presencia de variantes causantes de enfermedad en el gen SMPD1 en un total de 18 muestras de casos índice con sospecha clínica de enfermedad de Niemann-Pick tipo A/B, de los cuales 8 tuvieron un resultado positivo. En los casos

positivos, se procedió al análisis de muestras de familiares en caso de disponer de ellas (un total de 11 muestras correspondientes a familiares de 4 casos índice).

Adicionalmente, también se analizó la presencia de variantes en el gen SMPD1 en 5 casos índice recibidos con sospecha clínica de enfermedad de Niemann-Pick tipo C pero que tuvieron un resultado negativo en la búsqueda de mutaciones causales en los genes NPC1 y NPC2. De estos, 1 caso resultó positivo, por lo que se procedió también al análisis de sus familiares (4 muestras).

El resumen de los resultados fue el siguiente:

Paciente	Genotipo SMPD1	Proteína
1	c.[739G>A];[1474G>A]	p.[Gly247Ser];[Gly492Ser]
2	c.[1828_1830del]; [1828_1830del]	p.[Arg610del];[Arg610del]
3	c.[169delG]+[682T>C]	p.[Ala57Leufs*20];[Cys228Arg]
4	c.[1341delG];[1341delG]	p.?
5	c.[84delC];[96G>A]	p.[Gly29Aspfs*48];[Trp32*]
6	c.[1828_1830del]; [1828_1830del]	p.[Arg610del];[Arg610del]
7	c.[739G>A];[1159T>C]	p.[Gly247Ser];[Cys387Arg]
8	c.[739G>A]; [1828_1830del]	p.[Gly247Ser];[Arg610del]
NPC	c.[1795C>T];[1795C>T]	p.[Leu599Phe];[Leu599Phe]

Caso índice	Mutación	Familiares
Paciente 1	c.[739G>A];[1474G>A] p.[Gly247Ser];[Gly492Ser]	- Hermano: c.[739G>A];[1474G>A] - Sobrino: c.739G>A
Paciente 5	c.[84delC];[96G>A] p.[Gly29Aspfs*48];[Trp32*]	- Padre: c.96G>A - Madre: c.84delC - Hermano 1: c.84delC - Hermano 2: c.96G>A
Paciente 7	c.[739G>A];[1159T>C] p.[Gly247Ser];[Cys387Arg]	- Padre: c.739G>A - Madre: c.1159T>C
Paciente 8	c.[739G>A]; [1828_1830del] p.[Gly247Ser];[Arg610del]	- Hermano: c.1828_1830del
NPC	c.[1795C>T];[1795C>T] p.[Leu599Phe];[Leu599Phe]	- Padre: c.1795C>T - Madre: c.1795C>T - Hermano 1: c.1795C>T - Hermano 2: c.[1795C>T];[1795C>T]

Los resultados completos fueron publicados (Irun et al. 2013) y pueden consultarse en el artículo adjuntado al final de la memoria como material suplementario.

5.3.2.2.2 Análisis NPC1 y NPC2

Se analizó la presencia de variantes causantes de enfermedad en los genes NPC1 y NPC2 en un total de 10 muestras de casos índice con sospecha clínica de Niemann-Pick tipo C, de los cuales 1 paciente tuvo un resultado positivo con dos alelos mutados en NPC1 y 2 pacientes un resultado positivo con 1 alelo mutado en NPC1. No se encontró ninguna variante en NPC2.

Paciente	Genotipo NPC1	Proteína
1	c.[2932C>T];[2983T>C]	p.[Arg978Cys];[Phe995Leu]
2	c.2537T>C	p.(Leu846Pro)
3	c.1770T>G	p.(Phe590Leu)

Posteriormente, siguiendo este protocolo, se analizó a 151 pacientes con sospecha clínica de enfermedad de Niemann-Pick tipo C (De Castro-Orós et al. 2017). El resultado obtenido puede consultarse en el artículo adjuntado en la memoria como material suplementario.

5.4 Listado de publicaciones derivadas

5.4.1 Artículos publicados en revistas indexadas

1. Junyent M, Gilabert R, Zambón D, Pocoví M, **MALLÉN M**, Cofán M, Núñez I, Civeira F, Tejedor D, Ros E. Femoral atherosclerosis in heterozygous familial hypercholesterolemia: influence of the genetic defect. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 580–586.
2. Civeira F, Jarauta E, Cenarro A, García-Otín AL, Tejedor D, Zambón D, **MALLÉN M**, Ros E, Pocoví M. Frequency of low-density lipoprotein receptor gene mutations in patients with a clinical diagnosis of familial combined hyperlipidemia in a clinical setting. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 1546–1553.
3. Junyent M, Gilabert R, Jarauta E, Núñez I, Cofán M, Civeira F, Pocoví M, **MALLÉN M**, Zambón D, Almagro F, Vega J, Tejedor D, Ros E. Impact of low-density lipoprotein receptor mutational class on carotid atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2010; 208: 437–441.
4. García-Rodríguez B, Alfonso P, **MALLÉN M**, Pocoví M, Giraldo P. Gaucher disease: a pyrosequencing frequency analysis of the N370S and L444P mutations in the Spanish population. *Clin Genet* 2012; 81: 495–497.
5. Irun P, **MALLÉN M**, Dominguez C, Rodriguez-Sureda V, Alvarez-Sala LA, Arslan N, Bermejo N, Guerrero C, Pérez de Soto I, Villalón L, Giraldo P, Pocoví M. Identification of seven novel SMPD1 mutations causing Niemann-Pick disease types A and B. *Clin Genet* 2013; 84: 356–361.
6. De Castro-Orós I, Irún P, Cebolla JJ, Rodriguez-Sureda V, **MALLÉN M**, Pueyo MJ, Mozas P, Dominguez C, Pocoví M. Assessment of plasma chitotriosidase activity, CCL18/PARC concentration and NP-C suspicion index in the diagnosis of Niemann-Pick disease type C: a prospective observational study. *J Transl Med* 2017; 15: 43.

5.4.2 Patentes derivadas de los resultados

1. (WO2004067740) (EP1589104B1) Procedimiento y dispositivo de detección de mutaciones en secuencias génicas aisladas del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL-r) asociado con la Hipercolesterolemia Familiar. 2004.
Inventores: Mata, P.; Alonso, R.; Mozas, P.; Reyes, G.; Pocoví, M.; Castillo, S.; Tejedor, D.; Martínez, A.; **MALLÉN PÉREZ, Miguel**
2. (WO2006067254) Método y dispositivo in vitro de diagnóstico de Hipercolesterolemia Familiar basado en la detección de mutaciones en la secuencia del gen del receptor de lipoproteínas de baja densidad (r-LDL).2006.
Inventores: Pocoví M, Castillo S, **MALLÉN PÉREZ, Miguel**, Tejedor D, Martínez A.
3. (WO2006075039) Método de diagnóstico in vitro de hipercolesterolemia familiar mediante detección de reordenamientos génicos. 2006.
Inventores: Lopez M, Martín B, Tejedor D, Jiménez E, **MALLÉN PÉREZ, Miguel**, Martínez A, Pocoví M; Castillo S

6. DISCUSIÓN

6.1 Aspectos generales del diagnóstico genético

El conocimiento derivado de la publicación de la secuencia del genoma humano (International Human Genome Sequencing Consortium 2001, 2004), unido al gran desarrollo técnico de las herramientas de secuenciación, ha permitido incrementar enormemente la cantidad de información genética disponible. El aumento de la disponibilidad de información genética de un individuo puede suponer una herramienta fundamental en la práctica clínica. No solamente puede proporcionar diagnósticos precisos o contribuir en el diagnóstico diferencial sino que además, en ciertas ocasiones, puede orientar el tratamiento e incluso permitir el desarrollo eficaz de una medicina preventiva.

De esta manera, el diagnóstico genético se ha consolidado como una herramienta muy útil y potente, que no solamente aporta mucho a la práctica clínica sino que ha contribuido enormemente a la identificación de los mecanismos moleculares asociados a la enfermedad.

La puesta en marcha de un procedimiento diagnóstico bien planificado para una enfermedad, considerado desde la toma de la muestra hasta la obtención del resultado, es un proceso de varios pasos cuyo éxito requiere el estudio, la planificación y la consideración de diversos factores.

6.2 Planificación de una estrategia de diagnóstico genético

El genoma humano está formado por DNA que a su vez está compuesto por sólo cuatro tipos diferentes de monómeros –los nucleótidos de adenina, citosina, guanina y timina– en proporciones muy similares, por lo que se trata de una molécula muy monótona desde el punto de vista químico. Debido a esta monotonía química es necesario realizar ciertas operaciones que permitan su estudio, principalmente la amplificación de la región a estudiar y posteriormente algún tipo de funcionalización o reacción que permita su detección.

Hay diversas técnicas que permiten estudiar la secuencia o las variaciones de la secuencia en un ácido nucleico mediante el empleo de reacciones enzimáticas, hibridaciones con sondas, diversos marcajes fluorescentes o incluso analizando sus propiedades fisicoquímicas. Cada técnica tiene sus características y sus peculiaridades, sus fortalezas y sus limitaciones. Es muy importante para decidir la técnica y la estrategia más adecuada al tipo de análisis que se desea llevar a cabo la consideración de varios factores que definen el *problema analítico*, entre los que destacan:

1. Las bases moleculares de la enfermedad de la que se quiere desarrollar el diagnóstico genético, considerando el tipo y las características del gen, genes o región genómica que puede contener las variantes causantes de la enfermedad.
2. Si se quiere determinar la presencia o ausencia de una o varias variantes ya conocidas previamente o si por el contrario se quiere determinar la existencia de cualquier variante, incluyendo desconocidas.
3. El tipo de variante que se quiere determinar, tanto en el caso de que se trate de variantes conocidas previamente como en el caso de que se busquen variantes desconocidas.
4. El número de muestras que se quiere analizar o que potencialmente pueden ser analizadas.
5. Los recursos disponibles para llevar a cabo el diagnóstico, considerando el equipamiento instrumental del laboratorio, el personal técnico y su cualificación, los recursos económicos disponibles tanto para el desarrollo del protocolo como para la realización de cada análisis.
6. La existencia de parámetros temporales requeridos entre la toma de muestra y la entrega del resultado.

Aunque cada uno de estos factores tiene un peso importante en el diseño del análisis –y necesariamente todos deben ser tenidos en cuenta– resulta evidente que los dos últimos son el factor limitante que en última instancia condiciona en gran medida el desarrollo del método global.

Un buen diseño no es simplemente aplicar la tecnología más novedosa, sino ajustar la mejor estrategia y la mejor tecnología disponible en función de las circunstancias concretas del análisis que se quiere llevar a cabo.

Para ello, una vez que se han estudiado y considerado todos los factores que condicionan y definen el problema analítico que debe ser resuelto, se ha de proceder al estudio pormenorizado de las herramientas técnicas que pueden emplearse para la realización del análisis.

Es fundamental tener un conocimiento profundo de los conceptos fisicoquímicos subyacentes en las técnicas de biología molecular empleadas y conocer con precisión qué es lo que ocurre a nivel molecular durante su realización para entender sus posibilidades y limitaciones, como optimizar su procedimiento, la interpretación de sus resultados y la detección y resolución de posibles fallos.

Durante la realización de este trabajo se intentó comprender al detalle las bases fisicoquímicas de los procedimientos y técnicas empleados para poder alcanzar de manera más eficiente los objetivos planteados al comienzo del mismo.

Más adelante se discutirá sobre los factores que afectaron al desarrollo de cada método en particular, pero inicialmente vamos a considerar aquí las cuestiones genéricas asociadas a las técnicas empleadas en el análisis.

6.3 Análisis de las técnicas empleadas

6.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

6.3.1.1 Procesos de diseño y optimización

El objetivo del diseño de una reacción de PCR es conseguir de manera eficiente y específica la amplificación de un fragmento de DNA en cantidad suficiente como para permitir su análisis posterior sin problemas. Para ello, como se ha visto en el apartado 1.4.1.4, hay un proceso de diseño en el que se ha de decidir la zona a amplificar, los cebadores a emplear y las condiciones químicas y térmicas de la reacción. Tanto en el diseño como en la puesta a punto experimental hay que considerar todas las variables que aporta cada una de estas áreas de decisión para buscar la solución óptima global al problema.

6.3.1.2 Zonas génicas a amplificar

La decisión de la zona génica a amplificar por PCR es el primer paso del diseño y de forma simultánea es uno de los parámetros clave a tener en cuenta para el éxito global.

La determinación de la región y tamaño a amplificar –una vez descartados otros factores derivados de la secuencia como regiones homopoliméricas, altamente repetitivas o con muy alto contenido GC– depende casi exclusivamente del grupo de nucleótidos que se quiere determinar y del espacio alrededor que requiere por sus características la técnica de análisis que se va a emplear para ello.

Un ejemplo de esta dependencia está reflejado en la memoria para el análisis del genotipo y variantes de APOE por secuenciación (cf. 4.3.3.1) y pirosecuenciación (cf. 4.3.3.2). En ambos casos se amplifican las regiones que contienen, al menos, los nucleótidos codificantes de los aminoácidos que determinan el genotipo (Cys130 y Arg176) y las variantes comunes (Arg154 y Leu167) pero la amplificación para la secuenciación es de 590 pb y la de pirosecuenciación es de 305 pb. La razón de esta diferencia reside en las diferentes maneras de determinar la secuencia que

proporciona la secuenciación automática capilar por el método de Sanger y la pirosecuenciación. La secuenciación automática capilar permite lecturas de 600-700 bases de manera rutinaria, pero por las limitaciones electroforéticas no se puede determinar la secuencia de, al menos, las primeras 40-50 bases del fragmento analizado. Por otra parte, con la pirosecuenciación se obtienen lecturas mucho más cortas (50-100 bases) pero a cambio permite determinar con precisión la secuencia a partir de la primera base adyacente al cebador. Por ello, además de por aprovechar su capacidad de análisis, la secuenciación requiere de una amplificación de mayor tamaño con un espacio más grande entre los cebadores y las regiones de interés que el que requiere la pirosecuenciación. Adicionalmente, la pirosecuenciación se realiza de manera isoterma a baja temperatura (28-35°C), por lo que la formación de estructuras secundarias en el DNA molde puede ser problemática. Por ello, el fragmento amplificado para usar de molde en la pirosecuenciación debe ser lo suficientemente grande como para contener la región de interés y el espacio para que hibride la sonda, pero a la vez tener un tamaño contenido que minimice la posibilidad de formación de estructuras secundarias.

Otro ejemplo de la importancia de la elección de la zona génica a amplificar lo tenemos en el método de análisis del gen LDLR (cf. 4.3.1.1). Hasta el desarrollo de la técnica aquí propuesta, uno de los métodos más extendidos para la búsqueda de variantes en el gen era mediante la técnica de SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism* o *Polimorfismos de Conformación de Cadena Sencilla*) (Jensen et al. 1996). Por las características de la técnica era recomendable que los fragmentos amplificados fueran de un tamaño pequeño, por lo que la región que se amplificaba estaba muy ajustada al tamaño del exón. Con la disponibilidad de la técnica de secuenciación por electroforesis capilar comenzó a emplearse el producto de esas amplificaciones para la reacción de secuenciación. Al no amplificar un espacio adicional suficiente a la zona de interés, en el proceso de secuenciación era imposible obtener simultáneamente la secuencia directa y reversa de los nexos exón-intrón y de los extremos de los exones. La diferencia en la técnica empleada posteriormente hacía que las amplificaciones que eran útiles y válidas para un método no resultaran adecuadas para el otro. La resolución de este problema fue una de las motivaciones para el desarrollo del método propuesto en la memoria (apartado 4.3.1.1).

6.3.1.3 Diseño de los oligonucleótidos cebadores

Como se ha visto en el apartado 1.4.1.4.2, un oligonucleótido cebador debe cumplir unas determinadas características para ser válido para una reacción de PCR. Se han desarrollado diversos programas informáticos para ayudar en el diseño de los cebadores. A pesar de las diferencias que puedan existir entre los diferentes programas en los métodos de cálculo, hay un algoritmo común en ellos para la búsqueda del par de cebadores de la reacción. Este algoritmo supone el uso de la fuerza bruta para determinar la secuencia adecuada de los cebadores. Una vez determinada la secuencia de la región diana, se proporciona los intervalos de la secuencia en los que se desea que hibriden los cebadores y el rango de tamaño aceptable de los mismos. El algoritmo genera todos los posibles cebadores que cumplen la condición de localización y tamaño, y comienza a descartar los que no cumplen las características de validez (por su secuencia, estructuras internas, estabilidad interna e inespecificidad). El grupo de cebadores válidos pasa a ser analizado esta vez por pares directo-reverso, descartando las parejas que no estén equilibradas termodinámicamente, que formen estructuras secundarias entre ellas o que generen un producto de PCR con características termodinámicas muy diferentes a las suyas. Tras este proceso se obtendría un listado de cebadores válidos para las condiciones proporcionadas. En caso de no obtenerse ninguno, deberían modificarse las condiciones para comenzar de nuevo la búsqueda.

Dentro del margen que tenemos en el diseño de los cebadores para la amplificación por PCR hay dos factores que resultan de especial interés. El primero, ahondando en el apartado anterior, es la delimitación de la zona de búsqueda para determinar el fragmento generado. El segundo, que resulta más interesante, está íntimamente ligado a la determinación de los parámetros térmicos de la reacción. El parámetro crítico del programa térmico de una reacción de PCR es la temperatura de hibridación T_a , y ésta depende directamente de la temperatura de fusión T_m de los cebadores y del producto de PCR. Mediante la elección cuidadosa de las zonas de búsqueda y modificando la longitud del cebador, podemos ajustar el diseño para que se pueda realizar la PCR a una determinada temperatura de hibridación. En el caso de tener que amplificar varios fragmentos de un gen, con este condicionante de buscar una T_a objetivo en el diseño, podemos planificar la amplificación simultánea de todos los fragmentos en un solo proceso térmico, con el ahorro de tiempo y ayuda a la organización que ello supone.

Todos los métodos desarrollados en este trabajo se han diseñado con este condicionante, lo cual ha sido clave para el establecimiento de protocolos cómodos

y sencillos que permiten simplificar el manejo de muestras al usar procesos comunes para todas las amplificaciones realizadas.

6.3.1.4 Establecimiento de las condiciones químicas

Podemos agrupar en tres grupos los reactivos empleados en la reacción de PCR.

En el primer grupo está el tampón de reacción que acompaña a cada DNA polimerasa de origen comercial. Este tampón, de manera general, amortigua el pH y contiene una concentración determinada de cationes monovalentes. Adicionalmente el fabricante puede añadir otros aditivos destinados a estabilizar la enzima o mejorar la reacción.

En el segundo grupo está el resto de componentes básicos de la reacción: DNA molde, oligonucleótidos cebadores, cationes de magnesio y dNTP.

Por último, el tercer grupo son los aditivos o potenciadores no esenciales para la reacción.

De manera general se empleó el tampón y el resto de componentes básicos en la concentración recomendada por el fabricante de la DNA polimerasa. En la mayoría de los casos, estas concentraciones resultaron adecuadas. En algunas amplificaciones destinadas a ser secuenciadas, se disminuyó la concentración de dNTP y de los cebadores con objeto de purificar el producto de PCR para secuenciación por simple dilución en lugar de por purificación enzimática.

Se prefirió optimizar las amplificaciones mediante la modificación de las condiciones térmicas a la de las condiciones químicas al afectar mucho más las primeras al resultado obtenido.

A pesar de la comprobación del efecto de diferentes aditivos o potenciadores de la reacción, el único aditivo que se usó con asiduidad por afectar significativamente

6.3.1.5 Establecimiento de las condiciones térmicas

Dentro de las condiciones térmicas de la reacción, los dos parámetros más importantes fueron la temperatura de hibridación y la determinación del número de ciclos.

La temperatura de hibridación marca el punto de corte termodinámico de las hibridaciones que se van a producir. Tiene que ser lo suficientemente baja como para que los cebadores hibriden en el DNA molde y suficientemente alta como para que esta hibridación sea específica en la zona deseada.

Como se ha visto en el apartado 1.4.1.3.5, cuando la reacción alcanza la fase de meseta no se produce más cantidad de producto aunque se sigan aumentando el número de ciclos. En condiciones ideales, la amplificación deseada alcanza la fase

meseta en torno a 25 ciclos. En la práctica, los ciclos necesarios para alcanzar dicha fase dependen de la eficiencia de la hibridación en la primera fase de la reacción. Cuanto más ineficiente sea, se necesitan más ciclos para generar la concentración de productos que dan lugar a la fase exponencial. Para establecer las condiciones térmicas de la reacción, hay que considerar cómo afecta la temperatura a la eficiencia de hibridación del cebador en las primeras fases y ajustar en función de eso el número de ciclos.

Prolongar el número de ciclos más de lo necesario puede tener como efecto que hibridaciones inespecíficas alcancen la fase de amplificación exponencial, lo cual es totalmente indeseado.

6.3.2 Secuenciación automática capilar

6.3.2.1 Objetivos del diseño y optimización

El objetivo de un experimento de secuenciación es determinar, con la calidad suficiente, la secuencia de nucleótidos de una región de DNA. Para ello es necesario optimizar cada uno de los pasos que se llevan a cabo, haciendo especial hincapié en los que puedan presentar algún problema.

Las optimizaciones están encaminadas a:

- Obtener una buena amplificación de la secuencia a estudiar, limpia, específica y con buen rendimiento.
- Obtener un conjunto de productos de extensión bien distribuido por tamaños y con una señal lo más homogénea posible.
- Obtener una buena separación entre todos los productos de extensión que permita determinar con calidad la secuencia de la mayor parte del fragmento secuenciado.

6.4.3.2 Proceso de optimización

Las diferentes químicas de terminación existentes para los secuenciadores producen diferentes perfiles en las secuencias, considerando el valor de la señal y patrón de distribución de los picos. Mediante el análisis del aspecto tanto del pirograma como de los datos crudos de la electroforesis, es posible detectar posibles problemas que han podido ocurrir durante todo el proceso de secuenciación. Tras la localización del problema hay que llevar a cabo las medidas necesarias para su resolución.

Uno de los factores considerado normalmente como crítico para la reacción de secuenciación es la relación de concentración entre el cebador y el molde.

Las pruebas realizadas durante este trabajo para valorar la relación de concentración óptima entre cebador y molde demostraron que, dentro de un orden 2-10 pmol de cebador y 20-100 fmol de molde, no hay una relación directa entre la ratio y la calidad de la secuencia, sino que es más importante que se parta de un producto de PCR de calidad y limpio y se emplee un cebador con buenos parámetros termodinámicos de hibridación. Lo mismo ocurre con los parámetros de inyección y carrera de la electroforesis (dentro de un rango razonable y moderado). Cuando un producto de PCR es limpio y el cebador está bien diseñado, la secuencia tiene una buena calidad en un rango de condiciones amplio. Por el contrario, partiendo de un mal producto de PCR, un mal cebador o una purificación deficiente, no se puede conseguir una buena secuencia a pesar de la modificación de cualquier parámetro.

6.4 Protocolos desarrollados

6.4.1 Hipercolesterolemias autosómicas dominantes

Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel global, siendo responsables del 31% de los fallecimientos. Entre las principales causas de la enfermedad cardiovascular prematura se encuentran las hipercolesterolemias.

Una parte importante de estas hipercolesterolemias tienen un origen genético, siendo especialmente destacables las hipercolesterolemias autosómicas dominantes (HAD) que tienen una prevalencia en población general estimada de 1:300.

La alta prevalencia en población general hace que el método de diagnóstico genético para estos trastornos tiene que estar especialmente diseñado para una alta volumen de muestras.

De los genes implicados en las HAD (LDLR, APOB, PCSK9, APOE) la mayor parte de mutaciones se encuentran en el LDLR, en menor medida en APOB y con una frecuencia muy baja en APOE y PCSK9

6.4.1.1 Análisis del gen LDLR

El gen LDLR es el principal gen implicado en HAD y es el protagonista principal del método desarrollado.

Debido a la necesidad de analizar por completo la secuencia codificante del gen y al alto número de muestras esperado se diseñó un protocolo específicamente adaptado para trabajar por columnas en placas de 96 pocillos, con pipetas multicanal y mismas condiciones químicas y térmicas para todas las

amplificaciones. A través del alicuotado en columnas y el uso de premezclas, se llevó a cabo la preparación de las diferentes reacciones necesarias para amplificar y secuenciar todo el gen de una manera sencilla, con una reducción notable del número de pipeteos necesarios para ello si lo comparabamos con los procedimientos estándar. Esto permitió, además de realizar el proceso con más rapidez, minimizar los riesgos de error en la manipulación.

El establecimiento de condiciones homogéneas para los procesos y el sistema de trabajo por columnas resultó fundamental para simplificar la realización de este análisis genético complejo y aumentar su eficiencia y rapidez frente a métodos anteriores.

6.4.1.2 Análisis del gen APOB

El gen APOB es el segundo gen por la frecuencia de aparición de mutaciones en pacientes con HAD, aunque con un porcentaje mucho menor al de LDLR.

Un gran porcentaje de las mutaciones aparecidas en APOB corresponden a una única variante situada en el exón 26 (p.Arg3527Gln), aunque existen otras variantes causales con muy baja frecuencia.

Al ser un gen con una región codificante muy grande, con una frecuencia baja de pacientes con mutaciones en gen y siendo además una de estas mutaciones muy frecuente, se estimó poco efectivo analizar rutinariamente el gen completo mediante secuenciación automática capila. Para simplificar el proceso, se diseñó sólo un par de amplificaciones que permitían detectar la secuencia codificante de los aminoácidos de las regiones implicadas en la interacción con el receptor de LDL. A pesar de no detectar el 100% de las posibles variantes, resultó una solución adecuada considerando el equilibrio coste-nivel de detección.

6.4.1.3 Análisis del gen APOE

El uso de la pirosecuenciación para analizar las variantes en APOE demostró ser un método rápido y fiable con multitud de ventajas sobre otras técnicas, incluida la secuenciación. De una manera muy rápida se pudo determinar el genotipo y detectar las mismas variantes que aparecían en un análisis por secuenciación del gen entero que resultaba mucho más laborioso y costoso (Solanas-Barca et al. 2012).

6.4.2 Lipidosis

6.4.2.1 Análisis del gen GBA

Los dos factores clave para el protocolo diseñado para este gen fueron la existencia de un pseudogen cercano con un alto grado de homología y la altísima frecuencia de aparición de las mutaciones N370S (p.Asn409Ser) y L444P (p.Leu483Pro).

Debido a la alta frecuencia de estas dos mutaciones, se decidió diseñar un método basado en pirosecuenciación que permitiera hacer un cribado rápido de estas mutaciones antes de tener que abordar la secuenciación completa del gen.

La necesidad de realizar una PCR larga específica previa para amplificar el gen frente al pseudogen suponía ralentizar y complicar el proceso de cribado. Por eso la clave del método fue el desarrollo de una amplificación región-específica de 2 Kb, que podía ser realizada de forma más sencilla y rápida con una polimerasa convencional frente a la PCR larga anterior, para seleccionar el gen frente al pseudogen en las amplificaciones anidadas posteriores. Tras esta amplificación, la reacción de LATE-PCR multiplex anidada permitía realizar la pirosecuenciación de una manera muy robusta y eficaz

La suma de las dos reacciones facilitó enormemente el proceso frente a otros abordajes y permitió usar esta técnica para cribados rápidos en un número alto de muestras.

6.4.2.2 Análisis del gen SMPD1

El gen SMPD1 es un gen corto y compacto, con intrones pequeños. Tiene más de 100 mutaciones descritas distribuidas a lo largo del gen sin ninguna especialmente prevalente en población general.

El abordaje de este gen compacto se llevó a cabo mediante la amplificación y secuencia de la práctica totalidad del locus mediante dos grupos de fragmentos solapantes de 3 y 4 fragmentos. La zona no amplificada del locus correspondía a una zona repetitiva ALU.

Debido a la baja prevalencia de la enfermedad de Niemann-Pick en población general, el número de muestras potencialmente analizables no era muy elevado. Por eso en esta aproximación se decidió asegurar la posible detección de cualquier variante localizada en el gen completo frente a un análisis más restringido que valorase preferencialmente factores de rapidez y coste.

El número de mutaciones localizadas reforzó la validez de esta aproximación.

6.4.2.3 Análisis del gen NPC1 y NPC2

Los genes NPC1 y NPC2 son el caso contrario a SMPD1, son genes muy expandidos que tienen exones muy pequeños e intrones muy grandes. Como se ha visto, para el análisis tradicional por secuenciación esto es muy ineficiente, ya que no se aprovecha la capacidad de lectura que tiene la técnica. Considerando su baja prevalencia y que entre los dos hay 30 exones, cualquier abordaje tradicional sería poco eficiente.

Mediante el método propuesto de unión de fragmentos se consiguió generar una molécula quimérica de un tamaño mayor y que permitió aprovechar mejor las capacidades de la secuenciación automática capilar ganando algo más de eficiencia. Adicionalmente, con el uso de condiciones homogéneas y con la organización del protocolo en placas, también se consiguió simplificar el manejo de muestras y la realización de un análisis genético complejo

6.5 Vigencia actual de los métodos diseñados

Durante los últimos años se han producido grandes avances en las técnicas de secuenciación con el desarrollo de nuevas plataformas conocidas como NGS (*Next-generation sequencing, secuenciación de nueva generación*). Frente a la secuenciación automática capilar, estas plataformas permiten aumentar enormemente la velocidad y cantidad de secuencias generadas al mismo tiempo que disminuye muy significativamente el coste por base del análisis.

Las técnicas de NGS suponen un gran avance y se utilizan ahora ampliamente para la detección de variantes en múltiples genes y genomas, sin embargo tienen aparejadas una serie de limitaciones en su aplicación clínica pendientes de resolución. En primer lugar hay que considerar que son técnicas relativamente caras. A pesar de la disminución drástica del coste por base secuenciada, al aumentar de forma muy significativa las bases generadas por experimento el coste global de cada carrera puede ser elevado. La gran cantidad de resultados generados en cada experimento suponen un problema posterior en la gestión del almacenamiento de datos y además estos son mucho más complejos de analizar, por lo que se requiere personal técnico bioinformático especializado.

Dependiendo de la profundidad de lectura puede haber problemas de sensibilidad y especificidad, por lo que se recomienda suplementar las técnicas de NGS con la secuenciación de Sanger para alcanzar los mejores resultados.

Por todo esto, a pesar del desarrollo de las nuevas técnicas, los métodos aquí presentados pueden seguir siendo útiles tanto como para complementar grandes proyectos de NGS como para el uso principal en pequeños laboratorios.

Adicionalmente, en ciertos casos en los que no se necesita una gran generación de datos por muestra, como por ejemplo comprobación de variantes en familiares, los métodos aquí presentados pueden ser mucho más eficaces.

7. CONCLUSIONES

De los resultados expuestos en este trabajo, se deducen las siguientes conclusiones:

1. Se ha desarrollado y optimizado un método que permite la identificación de variantes puntuales y pequeños reordenamientos en los genes LDLR y PCSK9, facilita el diagnóstico de las hipercolesterolemias autosómicas dominantes y ha sido validado analizando 125 pacientes con hipercolesterolemia, identificando 21 variantes en el gen LDLR que no habían sido descritas previamente.
2. Se ha desarrollado una estrategia basada en la reacción en cadena de la polimerasa para detectar de manera rápida grandes reordenamientos.
3. Se ha desarrollado y optimizado un método rápido, basado en pirosecuenciación, que permite determinar el genotipo de APOE y una variante asociada a hipercolesterolemia autosómica dominante. Se ha validado este método con 212 pacientes con hiperlipemia combinada y 96 pacientes con diagnóstico genético de enfermedad de Gaucher (EG).
4. Se ha desarrollado y optimizado un método rápido, basado en pirosecuenciación, que permite detectar la presencia de 5 variantes en el gen GBA relacionadas con la EG. Dicho método hace uso de una aproximación novedosa de amplificación rápida y específica por PCR del gen GBA frente a su pseudogen y ha sido validado con 96 muestras de pacientes con EG.
5. Se ha desarrollado y optimizado un método, basado en secuenciación automática capilar, que permite la identificación de variantes puntuales y pequeños reordenamientos del gen SMPD1. Este método facilita el diagnóstico genético de la enfermedad de Niemann-Pick tipo A/B. Con este método se han localizado 10 variantes en el gen SMPD1, de las cuales 6 no habían sido descritas previamente.
6. Se ha desarrollado y optimizado un método, basado en la secuenciación automática capilar, que permite la identificación de variantes puntuales y pequeños reordenamientos en los genes NPC1 y NPC2. Este método facilita el diagnóstico genético de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C. Mediante el uso de este método se han identificado 4 variantes no polimórficas en el gen NPC1 no descritas previamente.
7. Se ha desarrollado una estrategia de unión de amplificaciones de reacciones de PCR que permite aprovechar el rendimiento máximo de la secuenciación automática capilar.
8. Se han desarrollado diversas herramientas y estrategias que permiten facilitar la realización del diagnóstico genético y abordar de manera más eficiente nuevos diseños de métodos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- AGARWAL KL, BÜCHI H, CARUTHERS MH, GUPTA N, KHORANA HG, KLEPPE K, ET AL. Total synthesis of the gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. *Nature*. 1970;227(5253):27-34.
- ALONSO R, DEFESCHE JC, TEJEDOR D, CASTILLO S, STEF M, MATA N, ET AL. Genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia using a DNA-array based platform. *Clin Biochem*. 2009;42(9):899-903.
- ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403-10.
- AMSELLEM S, BRIFFAUT D, CARRIÉ A, RABÈS JP, GIRARDET JP, FREDENRICH A, ET AL. Intronic mutations outside of Alu-repeat-rich domains of the LDL receptor gene are a cause of familial hypercholesterolemia. *Hum Genet*. 2002;111(6):501-10.
- ANSORGE W, SPROAT BS, STEGEMANN J, SCHWAGER C. A non-radioactive automated method for DNA sequence determination. *J Biochem Biophys Methods*. 1986;13(6):315-23.
- ANTONARAKIS SE, BECKMANN JS. Mendelian disorders deserve more attention. *Nat Rev Genet*. 2006;7(4):277-82.
- ATKINSON MR, DEUTSCHER MP, KORNBERG A, RUSSELL AF, MOFFATT JG. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXIV. Termination of chain growth by a 2',3'-dideoxyribonucleotide. *Biochemistry (Mosc)*. 1969;8(12):4897-904.
- BACHMANN B, LÜKE W, HUNSMANN G. Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(5):1309.
- BARNES WM. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci*. 1994;91(6):2216-20.
- BARTLETT JMS, STIRLING D. PCR Protocols. 2.^a ed. Humana Press; 2003. (Methods in Molecular Biology).
- BEUTLER E, GRABOWSKI GA. Gaucher disease. En: Scriver CR, Sly WS, Childs B, Beaudet AL, Valle D, Kinzler KW, et al., editores. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3635-68.
- BOYLE EA, LI YI, PRITCHARD JK. An Expanded View of Complex Traits: From Polygenic to Omnigenic. *Cell*. 2017;169(7):1177-86.
- BRAUTIGAM CA, STEITZ TA. Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes. *Curr Opin Struct Biol*. 1998;8(1):54-63.
- CARR AC, MOORE SD. Robust Quantification of Polymerase Chain Reactions Using Global Fitting. Lucia A, editor. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e37640.
- CARTEGNI L, CHEW SL, KRAINER AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet*. 2002;3(4):285-98.

- CENARRO A, ETXEBARRIA A, DE CASTRO-ORÓS I, STEF M, BEA AM, PALACIOS L, ET AL. The p.Leu167del Mutation in APOE Gene Causes Autosomal Dominant Hypercholesterolemia by Down-regulation of LDL Receptor Expression in Hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(5):2113-21.
- CENARRO A, JENSEN HK, CASAO E, CIVEIRA F, GONZÁLEZ-BONILLO J, RODRÍGUEZ-REY JC, ET AL. Identification of recurrent and novel mutations in the LDL receptor gene in Spanish patients with familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat.* 1998;11(5):413.
- CHAKRABARTI R, SCHUTT CE. The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(11):2377-81.
- CHAMBERLAIN JS, GIBBS RA, RAINER JE, NGUYEN PN, THOMAS C. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(23):11141-56.
- CHEN DF, PASTUCHA LT, CHEN HY, KADAR JG, STANGEL W. Simultaneous genotyping of human platelet antigens by hot start sequence-specific polymerase chain reaction with DNA polymerase AmpliTaq Gold. *Vox Sang.* 1997;72(3):192-6.
- CHENG S, FOCKLER C, BARNES WM, HIGUCHI R. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(12):5695-9.
- CHIEN A, EDGAR DB, TRELA JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol.* 1976;127(3):1550-7.
- CHOU Q. Minimizing deletion mutagenesis artifact during Taq DNA polymerase PCR by *E. coli* SSB. *Nucleic Acids Res.* 1992;20(16):4371.
- CIVEIRA F, JARAUTA E, CENARRO A, GARCÍA-OTÍN AL, TEJEDOR D, ZAMBÓN D, ET AL. Frequency of low-density lipoprotein receptor gene mutations in patients with a clinical diagnosis of familial combined hyperlipidemia in a clinical setting. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(19):1546-53.
- CIVEIRA F, POCOVÍ M, CENARRO A, CASAO E, VILELLA E, JOVEN J, ET AL. Apo E variants in patients with type III hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis.* 1996;127(2):273-82.
- CRAXTON M. Linear amplification sequencing, a powerful method for sequencing DNA. *Methods.* 1991;3(1):20-6.
- DAHIYA R, DENG G, CHEN K, HAUGHNEY PC, CUNHA GR, NARAYAN P. Terms and techniques: New approach to hot-start polymerase chain reaction using Taq DNA polymerase antibody. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 1995;1(1):42-6.
- D'AQUILA RT, BECHTEL LJ, VIDELER JA, ERON JJ, GORCZYCA P, KAPLAN JC. Maximizing sensitivity and specificity of PCR by preamplification heating. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(13):3749-3749.

- DE CASTRO-ORÓS I, IRÚN P, CEBOLLA JJ, RODRIGUEZ-SUREDA V, MALLÉN M, PUEYO MJ, ET AL. Assessment of plasma chitotriosidase activity, CCL18/PARC concentration and NP-C suspicion index in the diagnosis of Niemann-Pick disease type C: a prospective observational study. *J Transl Med.* 2017;15(1):43.
- DEFESCHE JC, GIDDING SS, HARADA-SHIBA M, HEGELE RA, SANTOS RD, WIERZBICKI AS. Familial hypercholesterolaemia. *Nat Rev Dis Primer.* 2017;3:17093.
- DEKKER N, DUSSEN L VAN, HOLLAK CEM, OVERKLEEF H, SCHEIJ S, GHAUHARALI K, ET AL. Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response. *Blood.* 2011;118(16):e118-27.
- DELUCA M. Firefly luciferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1976;44:37-68.
- DOMINGUES L. PCR: Methods and Protocols. New York: Springer-Verlag; 2017. (Methods in Molecular Biology).
- DOVICH NJ. DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* 1997;18(12-13):2393-9.
- DOVICH NJ, ZHANG J. DNA Sequencing by Capillary Array Electrophoresis. En: *DNA Sequencing Protocols.* Humana Press; 2001. p. 225-39. (Methods in Molecular Biology™).
- DROSSMAN H, LUCKEY JA, KOSTICHKA AJ, D'CUNHA J, SMITH LM. High-speed separations of DNA sequencing reactions by capillary electrophoresis. *Anal Chem.* 1990;62(9):900-3.
- DUNNEN JT DEN, DALGLEISH R, MAGLOTT DR, HART RK, GREENBLATT MS, MCGOWAN-JORDAN J, ET AL. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat.* 2016;37(6):564-9.
- ERIKSSON J, GHARIZADEH B, NORDSTRÖM T, NYRÉN P. Pyrosequencing technology at elevated temperature. *Electrophoresis.* 2004;25(1):20-7.
- EWING B, GREEN P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. *Genome Res.* 1998;8(3):186-94.
- EWING B, HILLIER L, WENDL MC, GREEN P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Res.* 1998;8(3):175-85.
- FERNANDEZ-RACHUBINSKI F, ENG B, MURRAY WW, BLAJCHMAN MA, RACHUBINSKI RA. Incorporation of 7-deaza dGTP during the amplification step in the polymerase chain reaction procedure improves subsequent DNA sequencing. *DNA Seq J DNA Seq Mapp.* 1990;1(2):137-40.
- FOUCHIER SW, KASTELEIN JJP, DEFESCHE JC. Update of the molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands. *Hum Mutat.* 2005;26(6):550-6.
- FREDRICKSON DS, LEES RS. Editorial: A System for Phenotyping Hyperlipoproteinemia. *Circulation.* 1965;31(3):321-7.

- GARCÍA-GARCÍA AB, REAL JT, PUIG O, CEBOLLA E, MARÍN-GARCÍA P, MARTÍNEZ FERRANDIS JI, ET AL. Molecular genetics of familial hypercholesterolemia in Spain: Ten novel LDLR mutations and population analysis. *Hum Mutat.* 2001;18(5):458-9.
- GARCÍA-RODRÍGUEZ B, ALFONSO P, MALLÉN M, POCOVÍ M, GIRALDO P. Gaucher disease: a pyrosequencing frequency analysis of the N370S and L444P mutations in the Spanish population. *Clin Genet.* 2012;81(5):495-7.
- GHARIZADEH B, ERIKSSON J, NOURIZAD N, NORDSTRÖM T, NYRÉN P. Improvements in Pyrosequencing technology by employing Sequenase polymerase. *Anal Biochem.* 2004;330(2):272-80.
- GHARIZADEH B, NORDSTRÖM T, AHMADIAN A, RONAGHI M, NYRÉN P. Long-read pyrosequencing using pure 2'-deoxyadenosine-5'-O'-(1-thiotriphosphate) Sp-isomer. *Anal Biochem.* 2002;301(1):82-90.
- GHAUHARALI-VAN DER VLUGT K, LANGEVELD M, POPPEMA A, KUIPER S, HOLLAK CEM, AERTS JM, ET AL. Prominent increase in plasma ganglioside GM3 is associated with clinical manifestations of type I Gaucher disease. *Clin Chim Acta.* 2008;389(1):109-13.
- GIRALDO P, ALFONSO P, IRÚN P, GORT L, CHABÁS A, VILAGELIU L, ET AL. Mapping the genetic and clinical characteristics of Gaucher disease in the Iberian Peninsula. *Orphanet J Rare Dis.* 2012;7:17.
- GOLDSTEIN JL, BROWN MS. A Century of Cholesterol and Coronaries: From Plaques to Genes to Statins. *Cell.* 2015;161(1):161-72.
- GOLDSTEIN JL, HOBBS HH, BROWN MS. Familial Hypercholesterolemia. En: Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, Gibson KM, et al., editores. *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* [Internet]. New York, NY: The McGraw-Hill Companies, Inc.; 2014. Disponible en: ommbid.mhmedical.com/content.aspx?aid=1102889774
- GRABOWSKI GA, PETSKO GA, KOLODNY EH. Gaucher Disease. En: Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, Gibson KM, et al., editores. *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* [Internet]. New York, NY: The McGraw-Hill Companies, Inc.; 2014. Disponible en: ommbid.mhmedical.com/content.aspx?aid=1102895727
- GREEN MR, SAMBROOK J. Hot Start Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc.* 2018;2018(5):pdb.prot095125.
- GUILLIATT AM. Agarose and polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2002;187:1-11.
- GYLLENSTEN UB, ERLICH HA. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc Natl Acad Sci.* 1988;85(20):7652-6.
- HANKE M, WINK M. Direct DNA sequencing of PCR-amplified vector inserts following enzymatic degradation of primer and dNTPs. *BioTechniques.* 1994;17(5):858-60.

- HEATH KE, GUDNASON V, HUMPHRIES SE, SEED M. The type of mutation in the low density lipoprotein receptor gene influences the cholesterol-lowering response of the HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*. 1999;143(1):41-54.
- HENGEN PN. Optimizing multiplex and LA-PCR with betaine. *Trends Biochem Sci*. 1997;22(6):225-6.
- HENKE W, HERDEL K, JUNG K, SCHNORR D, LOENING SA. Betaine Improves the PCR Amplification of GC-Rich DNA Sequences. *Nucleic Acids Res*. 1997;25(19):3957-8.
- HIRAYAMA T, YAMAKI E, HATA A, TSUJI M, HASHIMOTO K, YAMAMOTO M, ET AL. Five familial hypercholesterolemic kindreds in Japan with novel mutations of the LDL receptor gene. *J Hum Genet*. 1998;43(4):250-4.
- HO KIM Y, YANG I, BAE Y-S, PARK S-R. Performance evaluation of thermal cyclers for PCR in a rapid cycling condition. *BioTechniques*. 2008;44(4):495-505.
- HO SN, HUNT HD, HORTON RM, PULLEN JK, PEASE LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*. 1989;77(1):51-9.
- HOBBS HH, BROWN MS, GOLDSTEIN JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat*. 1992;1(6):445-66.
- HOBBS HH, RUSSELL DW, BROWN MS, GOLDSTEIN JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet*. 1990;24:133-70.
- HONOE B, MADSEN P. The Tetramethylammonium Chloride (TMAC) Method for Screening cDNA Libraries with Highly Degenerate Oligonucleotide Probes Obtained by Reverse Translation of Amino Acid Sequences. En: *cDNA Library Protocols*. Humana Press; 1997. p. 139-46. (Methods in Molecular Biology™).
- HOROWITZ M, WILDER S, HOROWITZ Z, REINER O, GELBART T, BEUTLER E. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: Structure and evolution. *Genomics*. 1989;4(1):87-96.
- HUANG XC, QUESADA MA, MATHIES RA. DNA sequencing using capillary array electrophoresis. *Anal Chem*. 1992;64(18):2149-54.
- HUMPHRIES SE, WHITTALL RA, HUBBART CS, MAPLEBECK S, COOPER JA, SOUTAR AK, ET AL. Genetic causes of familial hypercholesterolaemia in patients in the UK: relation to plasma lipid levels and coronary heart disease risk. *J Med Genet*. 2006;43(12):943-9.
- HYMAN ED. A new method of sequencing DNA. *Anal Biochem*. 1988;174(2):423-36.
- INNIS MA, MYAMBO KB, GELFAND DH, BROW MA. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(24):9436-40.

- INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921.
- INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431(7011):931-45.
- IRUN P, MALLÉN M, DOMINGUEZ C, RODRIGUEZ-SUREDA V, ALVAREZ-SALA LA, ARSLAN N, ET AL. Identification of seven novel SMPD1 mutations causing Niemann-Pick disease types A and B. *Clin Genet*. 2013;84(4):356-61.
- JENSEN HK, JENSEN LG, HANSEN PS, FAERGEMAN O, GREGERSEN N. High sensitivity of the single-strand conformation polymorphism method for detecting sequence variations in the low-density lipoprotein receptor gene validated by DNA sequencing. *Clin Chem*. 1996;42(8):1140-6.
- JENSEN HK, JENSEN LG, HANSEN PS, PETERSEN LS, GERDES LU, BOLUND L, ET AL. An alanine29-serine variant in exon 2 of the low density lipoprotein receptor gene: no association with hypercholesterolemia. *Clin Genet*. 1994;46(2):214-5.
- JIAN X, BOERWINKLE E, LIU X. In silico tools for splicing defect prediction - A survey from the viewpoint of end-users. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2014;16(7):497-503.
- JUNYENT M, GILABERT R, JARAUTA E, NÚÑEZ I, COFÁN M, CIVEIRA F, ET AL. Impact of low-density lipoprotein receptor mutational class on carotid atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2010;208(2):437-41.
- JUNYENT M, GILABERT R, ZAMBÓN D, POCOVÍ M, MALLÉN M, COFÁN M, ET AL. Femoral atherosclerosis in heterozygous familial hypercholesterolemia: influence of the genetic defect. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(3):580-6.
- KAINZ P. The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1494(1-2):23-7.
- KHORANA HG. Nucleic acid synthesis. *Pure Appl Chem*. 1968;17(3):349-82.
- KLENOW H, OVERGAARD-HANSEN K, PATKAR SA. Proteolytic Cleavage of Native DNA Polymerase into Two Different Catalytic Fragments. *Eur J Biochem*. 1971;22(3):371-81.
- KLEPPE K, OHTSUKA E, KLEPPE R, MOLINEUX I, KHORANA HG. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol*. 1971;56(2):341-61.
- KOMOSZYNSKI M, WOJTCZAK A. Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 1996;1310(2):233-41.
- KREADER CA. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl Environ Microbiol*. 1996;62(3):1102-6.

- LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN NP, CHENNA R, MCGETTIGAN PA, MCWILLIAM H, ET AL. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23(21):2947-8.
- LAWYER FC, STOFFEL S, SAIKI RK, CHANG SY, LANDRE PA, ABRAMSON RD, ET AL. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *Genome Res*. 1993;2(4):275-87.
- LAWYER FC, STOFFEL S, SAIKI RK, MYAMBO K, DRUMMOND R, GELFAND DH. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J Biol Chem*. 1989;264(11):6427-37.
- LEE LG, CONNELL CR, WOO SL, CHENG RD, MCARDLE BF, FULLER CW, ET AL. DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments. *Nucleic Acids Res*. 1992;20(10):2471-83.
- LEE LG, SPURGEON SL, HEINER CR, BENSON SC, ROSENBLUM BB, MENCHEN SM, ET AL. New energy transfer dyes for DNA sequencing. *Nucleic Acids Res*. 1997;25(14):2816-22.
- LEHMANN U, TOST J. *Pyrosequencing: methods and protocols*. Second edition. New York: Humana Press; 2015. (Methods molecular biology).
- LEIGH S, FUTEMA M, WHITTALL R, TAYLOR-BEADLING A, WILLIAMS M, DUNNEN JT DEN, ET AL. The UCL low-density lipoprotein receptor gene variant database: pathogenicity update. *J Med Genet*. 2017;54(4):217-23.
- LEREN TP, MANSHAUS T, SKOVHOLT U, SKODJE T, NOSSEN IE, TEIE C, ET AL. Application of molecular genetics for diagnosing familial hypercholesterolemia in Norway: results from a family-based screening program. *Semin Vasc Med*. 2004;4(1):75-85.
- LEREN TP, TONSTAD S, GUNDERSEN KE, BAKKEN KS, RØDNINGEN OK, SUNDVOLD H, ET AL. Molecular genetics of familial hypercholesterolaemia in Norway. *J Intern Med*. 1997;241(3):185-94.
- LEWIS R. *Human genetics: concepts and applications*. 9th ed. New York: McGraw-Hill; 2009.
- LIGUORI R, BIANCO AM, ARGIRIOU A, PAUCIULLO P, GIANNINO A, RUBBA P, ET AL. LDL receptor cDNA sequence analysis in familial hypercholesterolemia patients: 5 novel mutations with high prevalence in families originating from southern Italy. *Hum Mutat*. 2001;17(5):433.
- LO YMD. *Clinical Applications of PCR*. Humana Press; 2006. (Methods in Molecular Biology).
- LOMBARDI MP, REDEKER EJ, DEFESCHE JC, KAMERLING SW, TRIP MD, MANNENS MM, ET AL. Molecular genetic testing for familial hypercholesterolemia: spectrum of LDL receptor gene mutations in The Netherlands. *Clin Genet*. 2000;57(2):116-24.

- LONG GL, WINFIELD S, ADOLPH KW, GINNS EI, BORNSTEIN P. Structure and Organization of the Human Metaxin Gene (MTX) and Pseudogene. *Genomics*. 1996;33(2):177-84.
- LUCKEY JA, DROSSMAN H, KOSTICHKA AJ, MEAD DA, D'CUNHA J, NORRIS TB, ET AL. High speed DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(15):4417-21.
- MAGNER LN. A history of medicine. 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis; 2005.
- MALAMEDE RJ. Automatable process for sequencing nucleotide [Internet]. 1985. Disponible en: <https://patents.google.com/patent/US4863849A/en>
- MARDUEL M, OUGUERRAM K, SERRE V, BONNEFONT-ROUSSELOT D, MARQUES-PINHEIRO A, ERIK BERGE K, ET AL. Description of a large family with autosomal dominant hypercholesterolemia associated with the APOE p.Leu167del mutation. *Hum Mutat*. 2013;34(1):83-7.
- MARGULIES M, EGHOLM M, ALTMAN WE, ATTIYA S, BADER JS, BEMBEN LA, ET AL. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005;437(7057):376-80.
- MARQUES SM, ESTEVES DA SILVA JCG. Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB Life*. 2009;61(1):6-17.
- MARTÍN B. Estudios de interacción dieta-gen en pacientes con hipercolesterolemia: Papel de los genes LXR α y NPC1L1. [Zaragoza]: Universidad de Zaragoza; 2007.
- MATA P, ALONSO R, CASTILLO S, POCOVI M. MEDPED and the Spanish familial hypercholesterolemia foundation. *Atheroscler Suppl*. 2002;2(3):9-11.
- MAXAM AM, GILBERT W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci*. 1977;74(2):560-4.
- MELCHIOR WB, HIPPEL PHV. Alteration of the Relative Stability of dA·dT and dG·dC Base Pairs in DNA. *Proc Natl Acad Sci*. 1973;70(2):298-302.
- MISTRY PK, LIU J, YANG M, NOTTOLI T, MCGRATH J, JAIN D, ET AL. Glucocerebrosidase gene-deficient mouse recapitulates Gaucher disease displaying cellular and molecular dysregulation beyond the macrophage. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(45):19473-8.
- MONTGOMERY JL, WITWER CT. Influence of PCR Reagents on DNA Polymerase Extension Rates Measured on Real-Time PCR Instruments. *Clin Chem*. 2014;60(2):334-40.
- MUJUMDAR RB, ERNST LA, MUJUMDAR SR, LEWIS CJ, WAGGONER AS. Cyanine dye labeling reagents: Sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjug Chem*. 1993;4(2):105-11.
- MULLIS K, FALOONA F, SCHARF S, SAIKI R, HORN G, ERLICH H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263-73.

- MULLIS KB, FALOONA FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
- MULLIS KB, FERRÉ F, GIBBS R. *The Polymerase chain reaction.* Boston: Birkhäuser; 1994.
- MURRAY V. Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(21):8889.
- NAUCK MS, KÖSTER W, DÖRFER K, ECKES J, SCHARNAGL H, GIERENS H, ET AL. Identification of recurrent and novel mutations in the LDL receptor gene in German patients with familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat.* 2001;18(2):165-6.
- NCBI RESOURCE COORDINATORS. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D12-7.
- NYRÉN P. Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity. *Anal Biochem.* 1987;167(2):235-8.
- NYRÉN P. Apyrase immobilized on paramagnetic beads used to improve detection limits in bioluminometric ATP monitoring. *J Biolumin Chemilumin.* 1994;9(1):29-34.
- NYRÉN P. The History of Pyrosequencing. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2015;1315:3-15.
- NYRÉN P, LUNDIN A. Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. *Anal Biochem.* 1985;151(2):504-9.
- NYRÉN P, PETTERSSON B, UHLEN M. Solid Phase DNA Minisequencing by an Enzymatic Luminometric Inorganic Pyrophosphate Detection Assay. *Anal Biochem.* 1993;208(1):171-5.
- O'LEARY NA, WRIGHT MW, BRISTER JR, CIUFO S, HADDAD D, MCVEIGH R, ET AL. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D733-45.
- OLIVE DM, SIMSEK M, AL-MUFTI S. Polymerase chain reaction assay for detection of human cytomegalovirus. *J Clin Microbiol.* 1989;27(6):1238-42.
- PÄÄBO S, GIFFORD JA, WILSON AC. Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(20):9775-87.
- PARK DJ. *PCR Protocols.* 3.^a ed. Humana Press; 2011. (Methods in Molecular Biology).
- PARKER LT, ZAKERI H, DENG Q, SPURGEON S, KWOK PY, NICKERSON DA. AmpliTaq DNA polymerase, FS dye-terminator sequencing: analysis of peak height patterns. *BioTechniques.* 1996;21(4):694-9.

- PATTERSON MC, VANIER MT, SUZUKI K, MORRIS JA, CARSTEA E, NEUFELD EB, ET AL. Niemann-Pick Disease Type C: A Lipid Trafficking Disorder. En: Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, Gibson KM, et al., editores. *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* [Internet]. New York, NY: The McGraw-Hill Companies, Inc.; 2014. Disponible en: ommbid.mhmedical.com/content.aspx?aid=1102895490
- PELTIER M. Nouvelles Expériences sur la Caloricité des courans électriques. *Ann Chim Phys.* 1834;56:371-86.
- PIOVESAN A, CARACAUSI M, ANTONAROS F, PELLERI MC, VITALE L. GeneBase 1.1: a tool to summarize data from NCBI Gene datasets and its application to an update of human gene statistics. *Database* [Internet]. 2016;2016. Disponible en: <https://academic.oup.com/database/article/doi/10.1093/database/baw153/2730089>
- POCOVI M, CENARRO A, CIVEIR F, MYERS RH, CASAO E, ESTEBAN M, ET AL. Incomplete dominance of type III hyperlipoproteinemia is associated with the rare apolipoprotein E2 (Arg136 → Ser) variant in multigenerational pedigree studies. *Atherosclerosis.* 1996;122(1):33-46.
- PROBER JM, TRAINOR GL, DAM RJ, HOBBS FW, ROBERTSON CW, ZAGURSKY RJ, ET AL. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science.* 1987;238(4825):336-41.
- REES WA, YAGER TD, KORTE J, VON HIPPEL PH. Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. *Biochemistry (Mosc).* 1993;32(1):137-44.
- REEVE MA, FULLER CW. A novel thermostable polymerase for DNA sequencing. *Nature.* 1995;376(6543):796-7.
- RHEIN C, REICHEL M, MÜHLE C, ROTTER A, SCHWAB SG, KORNHUBER J. Secretion of Acid Sphingomyelinase is Affected by its Polymorphic Signal Peptide. *Cell Physiol Biochem.* 2014;34(4):1385-401.
- RONAGHI M. Improved performance of pyrosequencing using single-stranded DNA-binding protein. *Anal Biochem.* 2000;286(2):282-8.
- RONAGHI M, KARAMOHAMED S, PETTERSSON B, UHLÉN M, NYRÉN P. Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Anal Biochem.* 1996;242(1):84-9.
- RONAGHI M, UHLÉN M, NYRÉN P. A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate. *Science.* 1998;281(5375):363-5.
- ROSENBLOOM BE, WEINREB NJ. Gaucher disease: a comprehensive review. *Crit Rev Oncog.* 2013;18(3):163-75.
- ROSENBLUM BB, LEE LG, SPURGEON SL, KHAN SH, MENCHEN SM, HEINER CR, ET AL. New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(22):4500-4.

- RUANO G, PAGLIARO EM, SCHWARTZ TR, LAMY K, MESSINA D, GAENSSLEN RE, ET AL. Heat-soaked PCR: an efficient method for DNA amplification with applications to forensic analysis. *BioTechniques*. 1992;13(2):266-74.
- RUIZ-MARTINEZ MC, BERKA J, BELENKII A, FORET F, MILLER AW, KARGER BL. DNA sequencing by capillary electrophoresis with replaceable linear polyacrylamide and laser-induced fluorescence detection. *Anal Chem*. 1993;65(20):2851-8.
- RYCHLIK W. Selection of primers for polymerase chain reaction. *Mol Biotechnol*. 1995;3(2):129-34.
- RYCHLIK W. OLIGO 7 primer analysis software. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2007;402:35-60.
- RYCHLIK W, SPENCER WJ, RHOADS RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(21):6409-12.
- SAIKI RK, BUGAWAN TL, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA. Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*. 1986;324(6093):163-6.
- SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, ET AL. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487-91.
- SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB, HORN GT, ERLICH HA, ET AL. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985;230(4732):1350-4.
- SANCHEZ JA, PIERCE KE, RICE JE, WANGH LJ. Linear-After-The-Exponential (LATE)-PCR: An advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(7):1933-8.
- SANGER F, COULSON AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975;94(3):441-8.
- SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*. 1977;74(12):5463-7.
- SANTALUCIA J. Physical principles and visual-OMP software for optimal PCR design. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2007;402:3-34.
- SARKAR G, KAPELNER S, SOMMER SS. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(24):7465.
- SAUNDERS GC, DUKES J, PARKES HC, CORNETT JH. Interlaboratory Study on Thermal Cycler Performance in Controlled PCR and Random Amplified Polymorphic DNA Analyses. *Clin Chem*. 2001;47(1):47-55.
- SCHOUTEN JP, McELGUNN CJ, WAAIJER R, ZWIJNENBURG D, DIEPVEN F, PALS G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(12):e57-e57.

- SCHUCHMAN EH, DESNICK RJ. Niemann-Pick Disease Types A and B: Acid Sphingomyelinase Deficiencies. En: Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, Gibson KM, et al., editores. *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* [Internet]. New York, NY: The McGraw-Hill Companies, Inc.; 2014. Disponible en: ommbid.mhmedical.com/content.aspx?aid=1102895257
- SCHULZE H, SANDHOFF K. Lysosomal Lipid Storage Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(6):a004804.
- SCHUSTER H, KELLER C, WOLFRAM G, ZÖLLNER N. Ten LDL receptor mutants explain one third of familial hypercholesterolemia in a German sample. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(12):2176-80.
- SCRIVER CR, SLY WS, CHILDS B, BEAUDET AL, VALLE D, KINZLER KW, ET AL. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 4 volume set. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001.
- SEGEL IH, RENOSTO F, SEUBERT PA. Sulfate-activating enzymes. *Methods Enzymol.* 1987;143:334-49.
- SHARKEY DJ, SCALICE ER, JR KGC, ATWOOD SM, DAISS JL. Antibodies as Thermolabile Switches: High Temperature Triggering for the Polymerase Chain Reaction. *Nat Biotechnol.* 1994;12(5):506-9.
- SHERRY ST, WARD M-H, KHOLODOV M, BAKER J, PHAN L, SMIGIELSKI EM, ET AL. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(1):308-11.
- SHIN JA, KIM SH, KIM UK, CHAE JJ, CHOE SJ, NAMKOONG Y, ET AL. Identification of four novel mutations of the low-density lipoprotein receptor gene in Korean patients with familial hypercholesterolemia. *Clin Genet.* 2000;57(3):225-9.
- SISSOËFF I, GRISVARD J, GUILLÉ E. Studies on metal ions-DNA interactions: Specific behaviour of reiterative DNA sequences. *Prog Biophys Mol Biol.* 1978;31:165-99.
- SLATKO BE, KIELECZAWA J, JU J, GARDNER AF, HENDRICKSON CL, AUSUBEL FM. «First generation» automated DNA sequencing technology. *Curr Protoc Mol Biol.* 2011;Chapter 7:Unit7.2.
- SMITH LM, FUNG S, HUNKAPILLER MW, HUNKAPILLER TJ, HOOD LE. The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus: synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 1985;13(7):2399-412.
- SMITH LM, SANDERS JZ, KAISER RJ, HUGHES P, DODD C, CONNELL CR, ET AL. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature.* 1986;321(6071):674-9.
- SOLANAS-BARCA M, DE CASTRO-ORÓS I, MATEO-GALLEGO R, COFÁN M, PLANA N, PUZO J, ET AL. Apolipoprotein E gene mutations in subjects with mixed hyperlipidemia and a clinical diagnosis of familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis.* 2012;222(2):449-55.

- SPATARO N, RODRÍGUEZ JA, NAVARRO A, BOSCH E. Properties of human disease genes and the role of genes linked to Mendelian disorders in complex disease aetiology. *Hum Mol Genet.* 2017;26(3):489-500.
- SUN XM, PATEL DD, WEBB JC, KNIGHT BL, FAN LM, CAI HJ, ET AL. Familial hypercholesterolemia in China. Identification of mutations in the LDL-receptor gene that result in a receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb J Vasc Biol.* 1994;14(1):85-94.
- SWERDLOW H, GESTELAND R. Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(6):1415-9.
- TABOR S, RICHARDSON CC. DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci.* 1987;84(14):4767-71.
- TABOR S, RICHARDSON CC. A single residue in DNA polymerases of the Escherichia coli DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92(14):6339-43.
- TEJEDOR D, CASTILLO S, MOZAS P, JIMÉNEZ E, LÓPEZ M, TEJEDOR MT, ET AL. Reliable Low-Density DNA Array Based on Allele-Specific Probes for Detection of 118 Mutations Causing Familial Hypercholesterolemia. *Clin Chem.* 2005;51(7):1137-44.
- TERPE K. Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97(24):10243-54.
- THEOPHILUS BDM, RAPLEY R. PCR Mutation Detection Protocols. 2.^a ed. Humana Press; 2011. (Methods in Molecular Biology).
- THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(22):4673-80.
- TJIO JH, LEVAN A. The Chromosome Number of Man. *Hereditas.* 1956;42(1-2):1-6.
- TURNER SL, JENKINS FJ. Use of deoxyinosine in PCR to improve amplification of GC-rich DNA. *BioTechniques.* 1995;19(1):48-52.
- VANIER MT. Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5:16.
- WAN CY, WILKINS TA. Spermidine facilitates PCR amplification of target DNA. *Genome Res.* 1993;3(3):208-10.
- WATSON JD, CRICK FH. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature.* 1953a;171(4361):964-7.
- WATSON JD, CRICK FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 1953b;171(4356):737-8.
- WERLE E, SCHNEIDER C, RENNER M, VÖLKER M, FIEHN W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(20):4354-5.

- WHEELER DA, SRINIVASAN M, EGHOLM M, SHEN Y, CHEN L, MCGUIRE A, ET AL. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature*. 2008;452(7189):872-6.
- WHITE BA. PCR Protocols [Internet]. Vol. 15. New Jersey: Humana Press; 1993. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1385/0896032442>
- WINFIELD SL, TAYEBI N, MARTIN BM, GINNS EI, SIDRANSKY E. Identification of Three Additional Genes Contiguous to the Glucocerebrosidase Locus on Chromosome 1q21: Implications for Gaucher Disease. *Genome Res*. 1997;7(10):1020-6.
- WINSHIP PR. An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. *Nucleic Acids Res*. 1989;17(3):1266.
- ZAMPIERI S, FILOCAMO M, PIANTA A, LUALDI S, GORT L, COLL MJ, ET AL. SMPD1 Mutation Update: Database and Comprehensive Analysis of Published and Novel Variants. *Hum Mutat*. 2016;37(2):139-47.
- ZERBINO DR, ACHUTHAN P, AKANNI W, AMODE MR, BARRELL D, BHAI J, ET AL. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D754-61.
- ZHAO G, GUAN Y. Polymerization behavior of Klenow fragment and Taq DNA polymerase in short primer extension reactions. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2010;42(10):722-8.

9. MATERIAL SUPLEMENTARIO

9.1 Resultado del análisis de muestras de hipercolesterolemias autosómicas dominantes

Tabla resumen de los resultados obtenidos en el análisis de hipercolesterolemias autosómicas dominantes, siendo N el número de muestra, S el sexo, PM la puntuación Medped y el resultado del análisis de cada gen (LDLR, APOB y APOE)

N	S	PM	LDLR	Proteína resultante	APOB	APOE
1	V	9	Negativo	=	Negativo	E3/E4
2	V	9	Negativo	=	Negativo	E3/E3
3	M	9	Negativo	=	Negativo	E3/E3
4	V	8	Negativo	=	Negativo	E3/E3
5	M	9	c.1400C>T	p.(Thr467Ile)	Negativo	E3/E4
6	M	10	Negativo	=	Negativo	n/d
7	V	17	c.284G>A	p.(Cys95Gly)	Negativo	E3/E3
8	M	9	Negativo	=	Negativo	E3/E4
9	V	10	Negativo	=	Negativo	E3/E3
10	M	11	Negativo	=	Negativo	E3/E3
11	M	12	c.1814T>C	p.(Leu605Pro)	Negativo	E3/E3
12	V	8	Negativo	=	Negativo	E3/E4
13	M	8	Negativo	=	Negativo	E3/E4
14	V	8	Negativo	=	Negativo	E3/E3
15	M	8	Negativo	=	Negativo	E3/E3
16	V	8	Negativo	=	Negativo	E3/E4
17	V	12	Negativo	=	Negativo	E3/E3
18	V	13	Negativo	=	Negativo	E3/E3
19	M	11	Negativo	=	Negativo	E3/E3
20	M	8	c.677C>G	p.(Ser226Cys)	Negativo	E3/E3
21	V	10	Negativo	=	Negativo	E3/E3
22	V	8	Negativo	=	Negativo	E3/E3
23	M	11	Negativo	=	Negativo	E3/E3
24	M	8	Negativo	=	Negativo	E3/E3
25	M	9	Negativo	=	Negativo	E3/E3
26	M	8	Negativo	=	Negativo	E3/E3
27	M	15	Negativo	=	Negativo	E3/E3
28	V	19	Negativo	=	Negativo	E3/E3
29	M	8	c.2096C>T [c.148G>T+ c.2282C>T]	p.(Pro699Leu) + [p.(Ala50Ser);p.(Thr761Met)]	Negativo	E3/E3
30	V	8	Negativo	=	Negativo	E2/E3
31	M	18	c.1186+5G>A	p.(Gly337fs*26)	Negativo	E3/E3
32	V	13	c.1587-5_1618del	p.?	Negativo	E3/E3
33	M	8	c.662A>T	p.(Asp221Val)	Negativo	E3/E3
34	M	10	Negativo	=	Negativo	E3/E3 p.Leu167del
35	M	20	c.769C>T	p.(Arg257Trp)	Negativo	E3/E3
36	V	18	c.2389+3A>C	p.?	Negativo	E3/E4
37	V	13	Negativo	=	Negativo	E3/E3

N	S	PM	LDLR	Proteína resultante	APOB	APOE
38	M	11	Negativo	=	Negativo	E3/E3
39	M	8	c.1004G>T	p.(Gly335Val)	Negativo	E3/E3
40	M	14	Negativo	=	Negativo	E3/E3
41	M	16	c.1136G>A	p.(Cys379Tyr)	Negativo	E3/E4
42	M	9	Negativo	=	Negativo	E3/E4
43	M	16	c.2054C>T	p.(Pro685Leu)	Negativo	E3/E4
44	V	10	Negativo	=	Negativo	E3/E3
45	M	8	Negativo	=	Negativo	E3/E3
46	V	11	Negativo	=	Negativo	E3/E3
47	V	9	Negativo	=	Negativo	E2/E3
48	M	10	c.58G>A	p.(Gly20Arg)	Negativo	E3/E3
49	M	8	Negativo	=	Negativo	E3/E4
50	M	12	Negativo	=	Negativo	E3/E4
51	V	13	Negativo	=	Negativo	E3/E3
52	M	8	c.898A>G	p.(Arg300Gly)	Negativo	E3/E3
53	M	11	Negativo	=	Negativo	E3/E3
54	M	9	Negativo	=	Negativo	E3/E3
55	M	9	c.47T>C	p.(Leu16Pro)	Negativo	E3/E3
56	M	10	Negativo	=	Negativo	E3/E3
57	V	8	Negativo	=	Negativo	E3/E3
58	M	8	Negativo	=	Negativo	E3/E3
59	M	12	c.1898G>A	p.(Arg633His)	Negativo	E3/E4
60	M	18	c.283T>G + c.1587-1G>C	p.(Cys95Gly)+p.?	Negativo	E3/E3
61	M	9	c.1749C>A	p.(His583Gln)	Negativo	E2/E3
62	V	9	c.1448G>A	p.(Trp483*)	Negativo	E3/E3
63	M	8	Negativo	=	Negativo	E3/E3
64	V	9	Negativo	=	Negativo	n/d
65	M	12	Negativo	=	Negativo	E3/E3
66	M	8	c.1809G>C	p.(Glu600Asp)	Negativo	E3/E3
67	V	18	c.1136G>A	p.(Cys379Tyr)	Negativo	E3/E4
68	V	12	Negativo	=	Negativo	E3/E3
69	M	16	Negativo	=	Negativo	E3/E3
70	V	15	c.2389+8C>T	p.?	Negativo	E3/E3
71	M	8	Negativo	=	Negativo	E3/E3
72	V	12	Negativo	=	Negativo	E2/E3
73	M	13	Negativo	=	Negativo	n/d
74		11	Negativo	=	Negativo	E3/E3
75	M	13	Negativo	=	Negativo	E3/E4
76	M	11	Negativo	=	Negativo	E3/E3
77	V	17	Negativo	=	Negativo	n/d
78	V	10	c.188G>A	p.(Cys63Tyr)	Negativo	E3/E3
79	M	8	c.283T>G	p.(Cys95Gly)	Negativo	E3/E3
80	V	11	Negativo	=	Negativo	E3/E3
81	V	8	c.1328G>C	p.(Trp443Ser)	Negativo	E2/E4
82	M	8	Negativo	=	Negativo	n/d

N	S	PM	LDLR	Proteína resultante	APOB	APOE
83	V	13	c.313+5G>A	p.(Leu64_Pro105delinsSer)	Negativo	E3/E3
84	M	19	c.2140+5G>A	p.?	Negativo	n/d
85	V	12	Negativo	=	Negativo	E3/E4
86		9	Negativo	=	Negativo	E3/E3
87	V	10	Negativo	=	Negativo	E3/E3
88	M	12	Negativo	=	Negativo	E3/E3
89	V	12	Negativo	=	Negativo	E3/E3
90	V	11	Negativo	=	Negativo	E3/E4
91	V	11	Negativo	=	Negativo	E3/E3
92	V	12	Negativo	=	Negativo	E3/E3
93	M	10	Negativo	=	Negativo	E3/E3
94	V	13	del 7-10 6544pb	p.?	Negativo	n/d
95	V	17	c.969delC	p.(Gly324Alafs*46)	Negativo	E3/E3
96	V	21	c.2119G>T	p.(Asp707Tyr)	Negativo	E2/E4
97	V	21	c.2544dupC	p.(Ser849Leufs*10)	Negativo	E3/E3
98	M	12	c.2360T>A	p.(Val787Glu)	Negativo	E3/E3
99	V	13	Negativo	=	Negativo	E3/E3
100	M	12	Negativo	=	Negativo	E3/E3
101	M	15	Negativo	=	Negativo	E3/E3
102	M	10	Negativo	=	Negativo	E3/E4
103	V	8	Negativo	=	Negativo	E3/E3
104	V	8	Negativo	=	Negativo	E3/E3
105	V	10	Negativo	=	Negativo	n/d
106	V	9	del P-1 4Kb	p.?	Negativo	n/d
107	V	10	Negativo	=	Negativo	E3/E3
108	V	13	Negativo	=	Negativo	n/d
109	V	17	c.1246C>T	p.(Arg416Trp)	Negativo	E3/E4
110	M	11	c.1470G>A	p.(Trp490*)	Negativo	E3/E3
111	V	9	c.884delT	p.(Val295Alafs*75)	Negativo	E3/E3
112	V	10	Negativo	=	Negativo	E3/E3
113	V	9	Negativo	=	Negativo	n/d
114	M	13	c.283T>G	p.(Cys95Gly)	Negativo	E3/E3
115	V	12	Negativo	=	Negativo	n/d
116	F	10	Negativo	=	Negativo	E3/E4
117	V	11	Negativo	=	Negativo	n/d
118	M	11	Negativo	=	Negativo	E3/E4
119	V	9	Negativo	=	Negativo	E3/E3
120	V	12	c.96C>T	p.(Gln33*)	Negativo	E3/E3
121	V	15	c.96C>T	p.(Gln33*)	Negativo	E3/E4
122	M	18	c.96C>T	p.(Gln33*)	Negativo	E3/E4
123	M	8	Negativo	=	Negativo	n/d
124	M	9	Negativo	=	Negativo	n/d
125	V	14	del P-1 4Kb	=	Negativo	n/d

9.2 Listado de mutaciones detectadas en el gen LDLR

Véase tabla adjunta en la siguiente página.

Núm.	Nombre común	Descrita prev	cDNA	Proteína	Exón	Efecto clínico	Referencia publicación
1	L-6P	No	c.47T>C	p.(Leu16Pro)	1	Patológica	(Alonso et al. 2009)
2	G-2R	No	c.58G>A	p.(Gly20Arg)	1	Probablemente sin efecto	(Alonso et al. 2009)
3	Q12X	Si	c.96C>T	p.(Gln33*)	2	Péptido truncado	(Hobbs et al. 1990)
4	A29S	Si	c.148G>T	p.(Ala50Ser)	2	Sin efecto	(Jensen et al. 1994)
5	C42Y	No	c.188G>A	p.(Cys63Tyr)	2	Patológica	(Alonso et al. 2009)
6	C74G	Si	c.283T>G	p.(Cys95Gly)	3	Patológica	(Cenarro et al. 1998)
7	C74Y	No	c.284G>A	p.(Cys95Gly)	3	Patológica	(Junyent et al. 2008)
8	D200V	No	c.662A>T	p.(Asp221Val)	4	Patológica	(Alonso et al. 2009)
9	S205C	No	c.677C>G	p.(Ser226Cys)	4	Patológica	(Alonso et al. 2009)
10	R236W	Si	c.769C>T	p.(Arg257Trp)	5	Sin efecto	(Nauck et al. 2001)
11	R279G	No	c.898A>G	p.(Arg300Gly)	6	Patológica	(Alonso et al. 2009)
12	G314V	Si	c.1004G>T	p.(Gly335Val)	7	Patológica	(Lombardi et al. 2000)
13	C358Y	Si	c.1136G>A	p.(Cys379Tyr)	8	Patológica	(Hirayama et al. 1998)
14	R395W	Si	c.1246C>T	p.(Arg416Trp)	9	Patológica	(Leren et al. 1997)
15	W422S	No	c.1328G>C	p.(Trp443Ser)	9	Patológica	(Humphries et al. 2006)
16	T446I	No	c.1400C>T	p.(Thr467Ile)	10	Probablemente sin efecto	(Alonso et al. 2009)
17	W462X	Si	c.1448G>A	p.(Trp483*)	10	Péptido truncado	(Sun et al. 1994)
18	W469X	Si	c.1470G>A	p.(Trp490*)	10	Péptido truncado	(Hobbs et al. 1992)
19	H562Q	No	c.1749C>A	p.(His583Gln)	12	Patológica	(Alonso et al. 2009)
20	E579D	No	c.1809G>C	p.(Glu600Asp)	12	Probablemente sin efecto	(Junyent et al. 2008)
21	L584P	Si	c.1814T>C	p.(Leu605Pro)	12	Patológica	(Shin et al. 2000)
22	R612H	No	c.1898G>A	p.(Arg633His)	13	Patológica	(Fouchier et al. 2005)
23	P664L	Si	c.2054C>T	p.(Pro685Leu)	14	Patológica	(Sun et al. 1994)
24	P678L	Si	c.2096C>T	p.(Pro699Leu)	14	Patológica	(Schuster et al. 1995)
25	D686N	No	c.2119G>T	p.(Asp707Tyr)	14	Patológica	(Alonso et al. 2009)
26	T740M	No	c.2282C>T	p.(Thr761Met)	15	Patológica	(Leren et al. 2004)

27	V766E	No	c.2360T>A	p.(Val787Glu)	16	Probablemente sin efecto	(Alonso et al. 2009)
28	313+5 G>A	Si	c.313+5G>A	p.(Leu64_Pro105delinsSer)	In. 3	Delección exón 3 en pauta	(Liguori et al. 2001)
29	1186+5 G>A	Si	c.1186+5G>A	p.(Gly337fs*26)	In. 8	Péptido truncado	(Amsellem et al. 2002)
30	1587-1 G>C	No	c.1587-1G>C	p.?	In. 10	Probablemente afecta ajuste	
31	2140+5 G>A	Si	c.2140+5G>A	p.?	In. 14	Sin efecto	(Heath et al. 1999)
32	2389+3 A>C	No	c.2389+3A>C	p.?	In. 16	Desconocido	(Alonso et al. 2009)
33	2389+8 C>T	No	c.2389+8C>T	p.?	In. 16	Probablemente sin efecto	(Junyent et al. 2010)
34	1587-5_1618del36	No	c.1587-5_1618del	p.?	In. 10- ex 11	Patológica	(Junyent et al. 2010)
35	2544dupC	No	c.2544dupC	p.(Ser849Leufs*10)	17	Patológica	(Alonso et al. 2009)
36	884delT	Si	c.884delT	p.(Val295Alafs*75)	6	Patológica	(García-García et al. 2001)
37	969delC	No	c.969delC	p.(Gly324Alafs*46)	7	Patológica	(Junyent et al. 2010)

9.3 Artículos publicados

1. Junyent M, Gilabert R, Zambón D, Pocoví M, **MALLÉN M**, Cofán M, Núñez I, Civeira F, Tejedor D, Ros E. Femoral atherosclerosis in heterozygous familial hypercholesterolemia: influence of the genetic defect. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 580–586.
2. Civeira F, Jarauta E, Cenarro A, García-Otín AL, Tejedor D, Zambón D, **MALLÉN M**, Ros E, Pocoví M. Frequency of low-density lipoprotein receptor gene mutations in patients with a clinical diagnosis of familial combined hyperlipidemia in a clinical setting. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 1546–1553.
3. Junyent M, Gilabert R, Jarauta E, Núñez I, Cofán M, Civeira F, Pocoví M, **MALLÉN M**, Zambón D, Almagro F, Vega J, Tejedor D, Ros E. Impact of low-density lipoprotein receptor mutational class on carotid atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2010; 208: 437–441.
4. García-Rodríguez B, Alfonso P, **MALLÉN M**, Pocoví M, Giraldo P. Gaucher disease: a pyrosequencing frequency analysis of the N370S and L444P mutations in the Spanish population. *Clin Genet* 2012; 81: 495–497.
5. Irun P, **MALLÉN M**, Dominguez C, Rodriguez-Sureda V, Alvarez-Sala LA, Arslan N, Bermejo N, Guerrero C, Pérez de Soto I, Villalón L, Giraldo P, Pocoví M. Identification of seven novel SMPD1 mutations causing Niemann-Pick disease types A and B. *Clin Genet* 2013; 84: 356–361.
6. De Castro-Orós I, Irún P, Cebolla JJ, Rodriguez-Sureda V, **MALLÉN M**, Pueyo MJ, Mozas P, Dominguez C, Pocoví M. Assessment of plasma chitotriosidase activity, CCL18/PARC concentration and NP-C suspicion index in the diagnosis of Niemann-Pick disease type C: a prospective observational study. *J Transl Med* 2017; 15: 43.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology



JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

Femoral Atherosclerosis In Heterozygous Familial Hypercholesterolemia: Influence Of The Genetic Defect

Mireia Junyent, Rosa Gilabert, Daniel Zambón, Miguel Pocoví, Miguel Mallén, Montserrat Cofán, Isabel Núñez, Fernando Civeira, Diego Tejedor and Emilio Ros

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008;28:580-586; originally published online December 20, 2007;

doi: 10.1161/ATVBAHA.107.153841

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2007 American Heart Association, Inc. All rights reserved.

Print ISSN: 1079-5642. Online ISSN: 1524-4636

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/28/3/580>

Data Supplement (unedited) at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/suppl/2008/02/26/ATVBAHA.107.153841.DC1.html>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:
<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* is online at:
<http://atvb.ahajournals.org/subscriptions/>

Femoral Atherosclerosis In Heterozygous Familial Hypercholesterolemia

Influence Of The Genetic Defect

Mireia Junyent, Rosa Gilabert, Daniel Zambón, Miguel Pocoví, Miguel Mallén, Montserrat Cofán, Isabel Núñez, Fernando Civeira, Diego Tejedor, Emilio Ros

Objective—The purpose of this study was to assess femoral atherosclerosis by ultrasound in patients with molecularly defined heterozygous familial hypercholesterolemia (FH) in comparison with matched control subjects and in relation to mutational class in the LDL receptor and apolipoprotein B (APOB) genes.

Methods and Results—Femoral intima-media thickness (IMT) and plaque were evaluated in 146 FH patients carrying null alleles (n=48), defective-receptor alleles (n=62), undetermined-function alleles (n=25), or APOB defects (n=11) and in 193 healthy subjects. Twenty-three patients had coronary heart disease (CHD). The frequency of both tendon xanthomas and CHD was ≈2-fold higher and average LDL cholesterol was 30 mg/dL higher in null-allele genotype compared with receptor-defective mutations. All femoral measurements were increased in FH patients versus controls ($P<0.001$), and null-allele mutations showed higher age-, sex-, and LDL cholesterol-adjusted maximum IMT than receptor-defective or APOB defects (P for trend, 0.001). By multivariate analysis, independent associations of mean IMT, a measure of early atherosclerosis, were age, LDL cholesterol, sex, and systolic blood pressure. Age, null-allele genotype, sex, and smoking explained 42% of the variability of maximum IMT, a measure of advanced atherosclerosis.

Conclusions—FH patients have increased femoral IMT in relation to mutational class. The findings support the usefulness of genetic testing in FH beyond securing the diagnosis. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:580-586)

Key Words: familial hypercholesterolemia ■ femoral atherosclerosis ■ intima-media thickness ■ atheroma plaque ■ low-density lipoprotein receptor mutations ■ apolipoprotein B mutations

Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant disorder characterized by lifelong elevation of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol levels, tendon xanthomas, and early-onset coronary heart disease (CHD).¹ The commonest underlying molecular defects are mutant alleles of the LDL receptor gene (*LDLR*)¹ or of the gene encoding apolipoprotein (apo) B, the ligand for the LDLR in LDL particles.² Recently, defects at a third locus causing monogenic hypercholesterolemia, protein convertase subtilisin/kexin type 9 (*PCSK9*), have been identified.³ Despite the use of stringent clinical criteria, only the detection of molecular defects provides an unequivocal diagnosis of FH.⁴

Heterozygosity for functional mutations of *LDLR* is the most frequent and best characterized cause of FH.^{1,5} More than 900 *LDLR* mutations have been reported to date (<http://www.ucl.ac.uk/ldlr/Current>), and specific defects with a differential effect on residual receptor function affect both the lipid phenotype and CHD risk.^{6,7} In contrast, only a small number of functional mutations have been identified in

APOB, which are usually associated with a milder lipid phenotype.⁸ If the type of genetic defect influences the risk for CHD, it will also affect atherosclerosis in other arterial beds that can be evaluated by imaging techniques.

B-mode ultrasound is a noninvasive imaging technique useful in the assessment of atherosclerosis in large arteries, such as the carotid and femoral arteries.⁹ The pathogenic associations and predictive power of carotid intima-media thickness (IMT) have received much attention, and carotid IMT is an accepted surrogate marker for atherosclerotic disease.¹⁰ Although less investigated than carotid IMT, femoral IMT is also associated with cardiovascular risk factors in different populations^{9,11–13} and can serve as an intermediate phenotype for cardiovascular risk^{14,15} and a surrogate end point for the efficacy of intervention on the arterial wall.¹⁶ In a recent prospective study,¹⁷ femoral plaque, an advanced stage of increased IMT, had predictive value for future cardiovascular events.

There is a paucity of data on sonographic measurements of femoral atherosclerosis in FH. Femoral IMT was increased in

Original received August 14, 2007; final version accepted December 7, 2007.

From the Unitat de Lípids, Servei d'Endocrinologia i Nutrició (M.J., D.Z., M.C., E.R.) and Secció d'Ecografia, Centre de Diagnòstic per l'Imatge (R.G., I.N.), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Hospital Clínic, Barcelona and Ciber Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CB06/03), Instituto de Salud Carlos III, Spain; Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular (M.P., M.M.), Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain; Hospital Universitario Miguel Servet (F.C.), Zaragoza, Spain; and Progenika Biopharma S.A. (D.T.), Derio, Spain.

Correspondence to Dr Emilio Ros, Unitat de Lípids, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail eros@clinic.ub.es

© 2008 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.153841

FH patients when compared with healthy controls^{18,19} or to subjects with non-FH hypercholesterolemia,^{12,20} and was a better predictor of CHD severity than carotid IMT.¹⁵ Also, statin treatment influences femoral IMT to a greater extent than carotid IMT in FH.¹⁶ One study categorized femoral IMT by the type of *LDLR* and *APOB* defects and found no differences among groups with mutations of different severity.²⁰ Plaque burden was not evaluated in this study. To gain more insight into the pathogenic significance of femoral atherosclerosis in FH and the relevance of genetic screening, we performed femoral sonography for evaluation of both IMT and plaque burden in 146 FH patients who were classified according to the severity of the molecular defect and compared the findings with those of a control population.

Methods

Subjects

From March 1998 to April 2006, we assessed 146 consecutive adults in whom a molecular diagnosis of FH was obtained. All patients had been referred by primary care physicians to the Lipid Clinic of Hospital Clínic in Barcelona for diagnosis of severe hypercholesterolemia or because of alleged refractoriness to treatment. Within 2 to 6 weeks of the first visit, subjects underwent sonographic assessment of femoral atherosclerosis according to a protocol approved by the local review board and provided informed consent.

Subjects with clinical FH are recruited into the Spanish FH Register and submitted to DNA testing for identification of *LDLR* and *APOB* mutations following a standard protocol.²¹ During the same period, we evaluated 193 healthy control subjects, who were recruited from hospital personnel and lists of primary health physicians and were matched for sex and age to FH patients.

Clinical and Laboratory Characteristics

All subjects were assessed for family history of early-onset CHD, clinical history, medication use, demographic characteristics, cardiovascular risk factors, and presence of tendon xanthomas. In asymptomatic subjects, fasting blood for baseline biochemical profiles was drawn after at least 4 weeks without hypolipidemic drug treatment. In patients with prior CHD, baseline lipid values were obtained from clinical records. For details in the procedures, please see the supplemental materials (available online at <http://atvb.ahajournals.org>).

Molecular Testing

LDLR gene mutations and the presence of the R3500Q mutation within the putative receptor-binding region of the *APOB* gene were assessed in genomic DNA by standard methods. For details, please see the supplemental materials.

Functional *LDLR* mutations may be classified into different types based on biosynthetic and functional studies of fibroblast cell strains.¹ For the purpose of this study, we classified mutations into 3 groups: (1) null alleles, namely, disruptions of the promoter sequence, large rearrangements, nonsense, frameshift, or mutations resulting in a deletion of the translation initiation signal and early stop codons, which result in no protein synthesis; (2) receptor-defective alleles, that is, transcription and missense defects that do not completely suppress the function of the protein, which has residual receptor activity; and (3) undetermined receptor activity alleles, which are splicing defects with an unknown effect on protein function. *APOB* mutations were analyzed separately of *LDLR* defects because they are known to produce a less severe phenotype,²² which has also been shown in Spanish FH cohorts.²³ The identified mutations are listed in supplemental Table I. A total of 60 different mutations were detected in 146 subjects, resulting in 48 null alleles, 62 receptor-defective alleles, 11 *APOB* mutations, and 25 defects

Table 1. Clinical Characteristics and Lipid Profiles in Patients With a Molecular Diagnosis of FH With and Without CHD and in Healthy Control Subjects

Characteristics	Asymptomatic FH (n=123)	FH With CHD (n=23)	Control Subjects (n=193)
Age, y (range)	40.7 (20–76)	50.7 (28–70)*	49.5 (25–80)
Men/women, n/n	56/67	18/5*	85/108
Family history of CHD, n (%)	76 (62)	12 (52)	19 (10)
Ever smoked, n (%)	38 (31)	12 (52)	54 (28)
Body mass index, kg/m ²	24.7±3.7	25.8±3.3	25.2±3.7
Arterial hypertension, n (%)	9 (7)	7 (30)*	9 (5)
Diabetes mellitus, n (%)	0	1 (4)	0
Total cholesterol, mg/dL	387±84	379±68	202±29
LDL cholesterol, mg/dL	305±83	300±74	128±24
HDL cholesterol, mg/dL	55±15	49±15*	56±15
Cholesterol/HDL ratio	7.7±2.9	7.9±3.1	3.8±0.9
Triglycerides, mg/dL	108 (71–154)	137 (95–181)	92 (64–112)

Values are mean±SD except for triglycerides (median and interquartile range). CHD indicates coronary artery disease. **P*<0.05 vs asymptomatic FH.

with undetermined residual function. We included 2 missense defects (C176 years and G528D) among null alleles because evidences were provided of equivalent and negligible residual receptor activity (<http://www.ucl.ac.uk/ldlr/Current>).

Femoral Ultrasonography

A standardized imaging protocol was used for the IMT measurements. The primary variable was mean common femoral IMT and secondary variables were maximum femoral IMT, plaque presence, and plaque score. For description of the technique, please see the supplemental materials.

Results

Clinical Features and Lipid Profiles

Of the 146 FH subjects, 123 were asymptomatic and 23 had a history of CHD, confirmed in all cases by review of medical records (16 myocardial infarction and 7 angina). No patient had symptoms suggestive of peripheral arterial disease. Table 1 shows the clinical characteristics and lipid levels of the FH and control groups. FH subjects with CHD differed from asymptomatic FH subjects in that they were older, were predominantly male, and had a higher frequency of hypertension. Lipid profiles were similar between groups except for lower HDL cholesterol in patients with CHD. As expected from study design, FH subjects showed a higher number and potency of cardiovascular risk factors than healthy controls.

At the time of referral to our Lipid Clinic, 73 subjects were treatment-naïve and 73 subjects had been treated previously with lipid-lowering drugs, including all 23 patients with prior

Table 2. Clinical Characteristics and Lipid Profiles of FH Patients Depending on Mutational Class

Characteristics	Null Alleles (n=48)	Defective Alleles (n=62)	Undetermined Alleles (n=25)	ApoB 3500 (n=11)
Age, y (range)	42 (21–76)	43 (20–67)	42 (21–64)	43 (25–63)
Men/women, n/n	23/25	33/29	12/13	5/6
Prior hypolipidemic treatment, n (%)	22 (46)	32 (52)	15 (60)	4 (36)
Familial early-onset CHD, n (%)	26 (54)	40 (65)	18 (72)	3 (27)
Prior CHD, n (%)*	13 (27)	8 (13)	1 (4)	1 (9)
Ever smoked, n (%)	16 (36)	32 (52)	7 (28)	4 (36)
Body mass index, kg/m ²	24.6±3.5	25.2±3.9	23.8±3.2	24.5±3.3
Tendon xanthomas, n (%)†	29 (66)	22 (35)	13 (52)	1 (9)
Systolic blood pressure, mm Hg	128±19	123±11	122±14	122±19
Diastolic blood pressure, mm Hg	77±13	76±8	75±10	75±10
Glucose, mg/dL	89±8	92±11	88±13	91±12
Total cholesterol, mg/dL	404±86	379±78	389±89	349±67
LDL cholesterol, mg/dL	326±84	296±79	309±85	263±61
HDL cholesterol, mg/dL‡	51±16 ^a	55±14 ^{ab}	61±19 ^b	59±14 ^{ab}
Total cholesterol/HDL ratio‡	8.6±3.3 ^a	7.4±2.6 ^{abc}	6.9±2.3 ^{bc}	6.6±3.4 ^{bc}
Triglycerides, mg/dL	116 (77–151)	118 (81–167)	100 (82–140)	95 (71–133)
Apolipoprotein B, g/L‡	2.13±0.58 ^a	1.95±0.44 ^{ab}	1.94±0.47 ^{ab}	1.66±0.48 ^b
Apolipoprotein A1, g/L	1.36±0.26	1.39±0.25	1.40±0.25	1.49±0.29
Lipoprotein(a), mg/dL	27 (13–54)	19 (7–53)	29 (11–74)	29 (13–47)

Values are means±SD except for triglycerides and lipoprotein(a) (medians and interquartile ranges). CHD indicates coronary heart disease.

* $P<0.001$ and † $P=0.003$ by chi-square tests. ‡ $P<0.05$ by ANOVA statistics.

Values within a row with different superscript letters are significantly different ($P<0.05$, Bonferroni post-hoc test).

CHD (51 statins, 10 fibrates, 4 resins, and 8 combined treatments), for a median period of 36 months (range, 6 to 72 months). Those treated with statins had received an average daily dose with potency equivalent to 30 mg simvastatin (range, 10 to 80 mg). Such small average doses of statins indicate ineffective cholesterol-lowering treatment.

The clinical features of FH groups by mutational class are shown in Table 2. Subjects with the R3500Q *APOB* mutation showed the least frequency of xanthomas and the mildest lipid phenotype, but there were no significant differences compared with those with defective or undetermined alleles. The frequency of both prior CHD and Achilles tendon xanthomas was ≈2-fold higher in subjects with null alleles than in those with defective alleles. The null-allele genotype showed a more severe lipid phenotype than the defective allele group, without significant differences. Subjects with undetermined alleles and *APOB* mutations had higher HDL cholesterol and lower cholesterol/HDL ratios than those with null alleles. Because of the unknown residual LDLR function in subjects with undetermined alleles, they were excluded from analyses in which the severity of the genetic defect was the variable under consideration.

Associations of Femoral IMT and Plaque

Among both FH subjects and controls, highly significant correlations existed between mean IMT and age for either sex, with r -values ranging from 0.275 to 0.545 ($P<0.001$; all). Therefore, sonographic measurements of femoral atherosclerosis were adjusted for sex and age (Table 3). FH patients

with or without CHD had higher IMT and plaque values than controls, and those with CHD had the highest values. There were also differences in adjusted mean IMT between smokers and nonsmokers ($P=0.033$). Adjusted mean IMT and median plaque score were 1.08 mm and 2.30 mm in patients treated with hypolipidemic drugs and 0.88 mm and 2.69 mm in those who were treatment-naïve, respectively ($P>0.1$; both).

Additional significant ($P<0.001$) correlates of mean IMT in FH were systolic ($r=0.419$) and diastolic blood pressure ($r=0.288$), glucose ($r=0.310$), total cholesterol ($r=0.301$), LDL cholesterol ($r=0.283$), apoB ($r=0.405$), and the cholesterol/HDL ratio ($r=0.281$). For all these variables, the correlations were somewhat attenuated after IMT was corrected for age and sex (data not shown).

Table 3. Age- and Sex-Adjusted Femoral IMT and Plaque Scores in Patients With Molecularly Diagnosed FH and Healthy Subjects

Variables	Asymptomatic FH	FH With Prior CHD	Controls
No.	123	23	193
Mean IMT, mm	0.99±0.71	1.39±0.91*	0.71±0.53†
Maximum IMT, mm	1.50±1.02	2.27±1.14‡	1.20±1.02†
Presence of plaques, n (%)	53 (43)	18 (78)*	63 (33)†
Plaque score, mm	1.1 (0.6–3.1)	5.0 (2.3–9.3)‡	0.7 (0.5–1.9)†

Values are means±SD except for plaque score (median and interquartile ranges). CHD indicates coronary heart disease. † $P<0.001$ vs the 2 FH groups; * $P<0.05$ and ‡ $P<0.001$ vs asymptomatic FH.

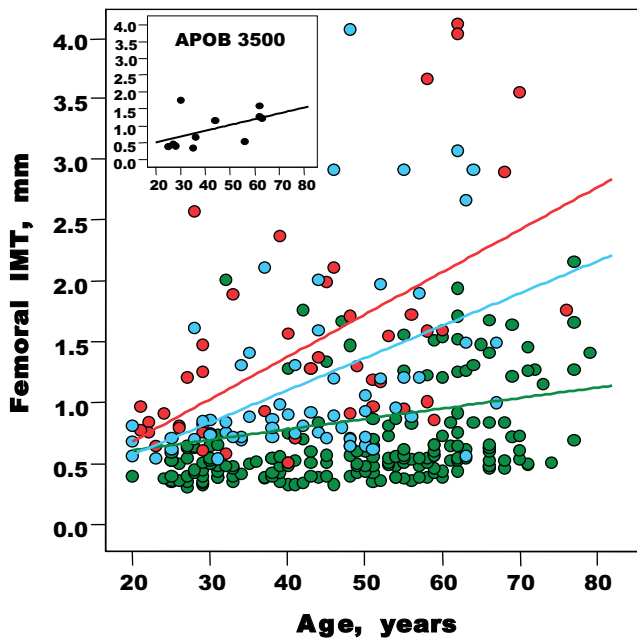


Figure 1. Mean femoral IMT versus age in FH patients with null alleles (red circles) or defective alleles (blue circles), healthy controls (green circles), and APOB 3500 defects (inset). Best-fit regression lines for each group are shown.

Figure 1 shows individual data points of mean femoral IMT versus age in FH subjects according to mutational class and in healthy controls. The progression of IMT with age in subjects with null alleles followed the equation $-0.230 + (\text{age} \times 0.035)$, $r=0.567$, $P<0.001$; in those with defective alleles, $-0.171 + (\text{age} \times 0.026)$, $r=0.439$, $P<0.001$; in APOB mutations, $0.163 + (\text{age} \times 0.017)$, $r=0.506$, $P=0.112$; and in healthy controls, $0.225 + (\text{age} \times 0.009)$, $r=0.405$, $P<0.001$. The slopes of the regression lines indicate that IMT increased with age in the order null alleles >defective alleles >APOB defects >control subjects. IMT increased nonsignificantly ($P=0.230$) more with age in patients with null alleles than in those with defective alleles, whereas the IMT of both groups increased significantly ($P<0.001$) more with age than that of patients with APOB mutations or control subjects.

In patients with null alleles compared with those with defective alleles or APOB mutations, unadjusted mean IMT and plaque scores were nonsignificantly higher, whereas maximum IMT was significantly increased ($P=0.009$). Adjustment for sex and age enhanced the differences, which became significant for mean IMT ($P=0.037$). Differences in IMT, however, were still significant only for maximum IMT after further adjustment for LDL cholesterol (Figure 2). Additional adjustment for HDL cholesterol or the apoB level had little effect on the results (data not shown).

Predictors of Femoral IMT by Multivariate Analyses

After adjustment for various confounders, independent associations of mean IMT by stepwise multiple regression analysis in 121 FH patients (undetermined alleles excluded) were age, LDL cholesterol, systolic blood pressure, and gender (negative for women) in this order (adjusted $R^2=0.311$; Table 4). When maximum IMT was the dependent variable, the

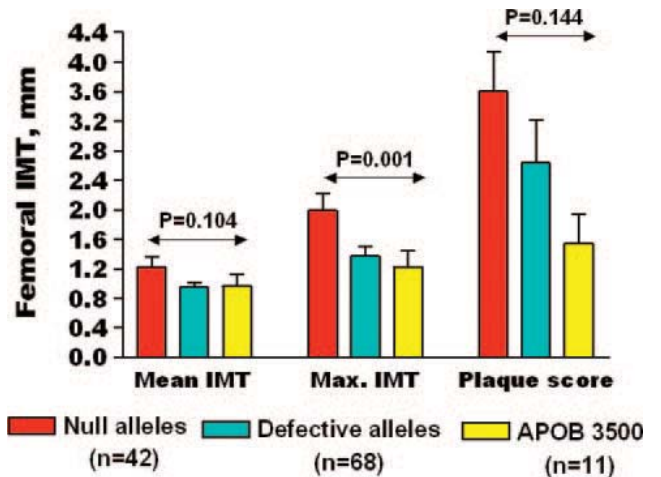


Figure 2. Age-, gender-, and LDL cholesterol-adjusted mean and maximum femoral IMT and plaque score in FH patients depending on mutational class.

factors independently associated were age, presence of null allele, gender, and smoking, explaining together 42% of its variability. Finally, age was the sole independent factor associated with plaque score. When the apoB level was allowed into the model, this variable replaced LDL cholesterol as an association of mean IMT and slightly increased the overall information (adjusted $R^2=0.347$). Also, apoB was associated with maximum IMT and smoking fell off the equation, with adjusted $R^2=0.437$. Finally, apoB was associated with plaque score and increased the information of the model ($R^2=0.272$). Entering the cholesterol/HDL or ApoB/ApoAI ratios into the regression analysis added no more overall information. The results of multivariate analysis did not materially change when CHD patients were excluded.

Discussion

The major novel finding of this study is that patients with a molecular diagnosis of FH characterized by null allele (receptor-negative) mutations of the LDLR gene show more advanced femoral atherosclerosis than those with receptor-defective mutations or APOB defects, independently of gender, age, and untreated LDL cholesterol levels. Inasmuch as femoral atherosclerosis is an intermediate marker of CHD risk^{9,14-16} that has predictive value of future CHD events,¹⁷ these findings have implications for the diagnosis and management of FH. They also support the utility of obtaining a molecular diagnosis in patients with clinical FH.

Several studies in FH cohorts genetically heterogeneous like the present one have shown that LDLR-null allele variants are associated with more severe lipid phenotypes, increased prevalence of xanthomas, and higher CHD risk than receptor-defective mutations.^{6,7,23-25} Few investigations have dealt with the differential effect of LDLR mutational class on carotid IMT in sizeable FH cohorts.^{20,26,27} The studies of Descamps et al²⁰ and Tonstad et al²⁶ found a tendency to higher unadjusted carotid IMT in adult FH patients with null alleles compared with those with defective alleles, whereas the study of Koeijvoets et al,²⁷ with higher statistical power, found significant differences in mean carotid IMT between FH children carriers of null alleles and receptor-defective

Table 4. Independent Associations of Femoral IMT by Stepwise Multiple Regression Analysis

FH With All Mutations Except Undetermined Alleles (n=121)					
Dependent Variable	Variables	B	β	P	Adjusted R ²
Mean IMT	Constant	-1.487		0.011	0.311
	Age \times 10 y	0.209	0.352	<0.001	
	LDL cholesterol, mg/dL \times 10	0.021	0.224	0.007	
	Systolic blood pressure	0.011	0.222	0.010	
	Gender (female)	-0.255	-0.165	0.046	
Maximum IMT	Constant	1.096		0.017	0.421
	Age \times 10 y	0.497	0.583	<0.001	
	Null allele	0.727	0.320	<0.001	
	Gender (female)	-0.434	-0.196	0.011	
	Smoking habit	0.398	0.179	0.022	
Plaque score	Constant	-3.097		0.009	0.204
	Age \times 10 y	1.399	0.460	<0.001	

Variables allowed to enter the model were age, gender, previous cholesterol-lowering treatment, tendon xanthomas, family history of early-onset CHD, smoking habit, body mass index, systolic and diastolic blood pressure, glucose, LDL cholesterol, HDL cholesterol, log triglycerides, log lipoprotein(a), and mutational class.

mutations, independently of the LDL cholesterol level. Descamps et al²⁰ also evaluated allele-specific associations of mean femoral IMT and again found a tendency to higher IMT in null alleles, but only in women. We found a tendency to higher adjusted mean femoral IMT and a significantly higher maximum femoral IMT (namely, worse advanced atherosclerosis) in carriers of null alleles versus receptor-defective or *APOB* defects. Adjusted plaque scores, a measure of the overall atherosclerotic burden not previously investigated in FH, tended to be higher in null alleles. Multivariate analyses with inclusion of LDL cholesterol and apoB levels as confounders also showed that the null-allele genotype was independently associated with advanced femoral atherosclerosis, as assessed by maximum IMT. Although this finding should be confirmed in studies of larger FH cohorts with more statistical power, it suggests that factors beyond a higher load of atherogenic lipoprotein particles are implicated in atherogenesis in this population. Patients with null alleles had nonsignificantly lower HDL cholesterol than those with defective alleles, but the differences persisted after IMT was adjusted for this variable. Possibly lifelong, severely elevated LDL cholesterol levels trigger other self-sustaining atherogenic mechanisms, such as inflammation and immune activation, which begin early in life²⁸ and are enhanced in patients with more severe clinical phenotypes.^{29,30} This is certainly an avenue of research worth pursuing.

The markedly increased femoral IMT and plaque burden observed in asymptomatic FH subjects in comparison to healthy controls is in line with the enhanced risk for CHD of the FH phenotype.^{1,6,7} In proof, FH patients with prior CHD had significantly higher IMT and plaque scores than asymptomatic ones (Table 3). As shown in Figure 1, the annual progression rate of mean femoral IMT in FH subjects with null and defective alleles was nearly 4-fold and 3-fold, respectively, that of sex- and age-matched control subjects. From the slopes of the regression lines of IMT versus age, it can be estimated that on average healthy controls reach an

IMT of 1.0 mm at 65 years of age, whereas FH subjects with null alleles, defective alleles, and *APOB* defects attain this value at ages 30, 40, and 50 years, respectively. De Groot et al¹⁹ also reported that the annual progression rate of averaged carotid and femoral IMT in pooled FH subjects doubled that of healthy controls. As expected, age was a strong independent association of all measurements of femoral atherosclerosis at multivariate analysis. Interestingly, when the apoB level was allowed into the equations in lieu of the LDL cholesterol value it had a strong multivariate association with all femoral IMT measurements and increased the predictive value of each model. This supports the potential of apoB to provide an overall measure of all atherogenic particles. Smoking, a strong risk factor for femoral atherosclerosis,³¹ was weakly associated with maximum IMT but not with mean IMT or the plaque score. A likely reason is that there were few smokers among asymptomatic subjects, thus reducing statistical power. Predictably from the well-known delay in onset of CHD in FH women compared with men,^{1,6} the female gender was independently and inversely associated with IMT.

Our study has the strengths of a cross-sectional design in a large series of molecularly defined FH patients not receiving effective hypolipidemic drug treatment that could have influenced IMT. A limitation of the study is that our cohort is representative of patients with FH as they present to a Lipid Clinic with a severe lipid phenotype, but not of those still undiagnosed within their families or the general population, who may have milder lipid phenotypes and a lower risk for atherosclerosis.³² Another limitation is that the third genetic locus involved in causing the FH phenotype, PCSK9, was not screened for. However, PCSK9 mutations are a rare cause of FH in genetically heterogeneous European populations.^{4,33} Finally, our classification of mutations within the functional categories may be subjected to error when no studies of residual receptor function are available, as the prediction based on specific

disruption of the LDLR protein does not necessarily follow a canonical rule.³⁴ Still, the allocation of genetic defects to functional classes in supplemental Table I is updated to present knowledge (<http://www.ucl.ac.uk/ldlr/Current>).

Several groups have reported the clinical utility of molecular diagnosis in patients with FH.^{7,25,26,35} An important question is whether the genetic diagnosis of FH could help in the selection of patients at greater CHD risk among clinically indistinguishable patients, who therefore deserve more aggressive intervention for risk factor reduction. In agreement with previous data,²⁷ our results suggest that selection of null alleles might identify FH subjects with the highest CHD risk who may then be considered for more aggressive cholesterol-lowering treatment.

In conclusion, FH patients have more femoral atherosclerosis than control subjects in strong association with the presence of null allele mutations. These findings support the usefulness of genetic testing in FH beyond securing the diagnosis.

Acknowledgments

We thank Emili Corbella for expert statistical advice.

Sources of Funding

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Health (RTIC G03/181, PI05/0075, PI05/0134, and PI06/0365) and Fundació Privada Catalana de Nutrició i Lípids, Barcelona, Spain.

Disclosures

Diego Tejedor is employed by Progenika Biopharma, the company that commercializes the microarray (Lipochip) for genetic diagnosis of FH in Spain. None of the other authors has any conflict of interest.

References

- Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill;2001: 2863–2913.
- Soria LF, Ludwig EH, Clarke HRG, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 96:587–591.
- Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derre A, Villegier L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, Boileau C. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*. 2003;34:154–156.
- Aalst-Cohen E, Jansen AC, Tanck M, Defesche JC, Trip M, Lansberg P, Stalenhoef A, Kastelein JJ. Diagnosing familial hypercholesterolaemia: the relevance of genetic testing. *Eur Heart J*. 2006;27: 2240–2246.
- Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review. *Am J Epidemiol*. 2004;160:407–420.
- Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease: a HuGE association. *Am J Epidemiol*. 2004;160:421–429.
- Humphries SE, Whittall RA, Hubbart CS, Maplebeck S, Cooper JA, Soutar AK, Naoumova R, Thompson GR, Seed M, Durrington PN, Miller JP, Betteridge DJB, Neil HAW for the Simon Broome Familial Hyperlipidaemia Register Group and Scientific Steering Committee. Genetic causes of familial hypercholesterolaemia in patients in the UK: relation to plasma lipid levels and coronary heart disease risk. *J Med Genet*. 2006; 43:943–949.
- Fouchier SW, Kastelein JJ, Defesche JC. Update of the molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands. *Hum Mutat*. 2005;26: 550–556.
- Cheng K-S, Mikhailidis D, Hamilton G, Seifalian A. A review of the carotid and femoral intima-media thickness as an indicator of the presence of peripheral vascular disease and cardiovascular risk factors. *Cardiovasc Res*. 2002;54:528–538.
- Bots ML, Baldassarre D, Simon A, de Groot E, O'Leary DH, Riley W, Kastelein JJ, Grobbee DE. Carotid intima-media thickness and coronary atherosclerosis: weak or strong relations? *Eur Heart J*. 2007; 28:398–406.
- Kekäläinen P, Sarlund H, Farin P, Kaikanen E, Yang X, Laakso M. Femoral atherosclerosis in middle-aged subjects: association with cardiovascular risk factors and insulin resistance. *Am J Epidemiol*. 1996;144: 742–748.
- Smilde TJ, van den Berkmoortel F, Boers G, Wollersheim H, De Boo T, Van Langen H, Stalenhoef A. Carotid and femoral artery wall thickness and stiffness in patients at risk for cardiovascular disease, with special emphasis on hyperhomocysteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1958–1963.
- Paul TK, Srinivasan SR, Chen W, Li S, Bond G, Tang R, Berenson G. Impact of multiple cardiovascular risk factors on femoral artery intima-media thickness in asymptomatic young adults (The Bogalusa Heart Study). *Am J Cardiol*. 2005;95:469–473.
- Held C, Hjelmdahl P, Eriksson SV, Björkander I, Forslund L, Rehnqvist N. Prognostic implications of intima-media thickness and plaques in the carotid and femoral arteries in patients with stable angina pectoris. *Eur Heart J*. 2001;22:62–72.
- Wittekoek M, De Groot E, Prins M, Trip M, Büller H, Kastelein JJ. Differences in intima-media thickness in the carotid and femoral arteries in familial hypercholesterolemic heterozygotes with and without clinical manifestations of cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 1999;146: 271–279.
- Nolting PR, de Groot E, Zwinderman AH, Buirma RJ, Trip MD, Kastelein JJ. Regression of carotid and femoral artery intima-media thickness in familial hypercholesterolemia: treatment with simvastatin. *Arch Intern Med*. 2003;163:1837–1841.
- Schmidt C, Fagerberg B, Hulthe J. Non-stenotic echolucent ultrasound-assessed femoral artery plaques are predictive for future cardiovascular events in middle-aged men. *Atherosclerosis*. 2005;181:125–130.
- Wendelhag I, Wiklund O, Wikstrand J. Atherosclerotic changes in the femoral and carotid arteries in familial hypercholesterolemia. Ultrasonographic assessment of intima-media thickness and plaque occurrence. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:1404–1411.
- de Groot E, Hovingh K, Wiegman A, Duriez P, Smit A, Fruchart J-C, Kastelein JJ. Measurement of arterial wall thickness as a surrogate marker for atherosclerosis. *Circulation*. 2004;109(suppl III):III-33–III-38.
- Descamps OS, Gilbeau J-P, Leyssen X, Van Leuven F, Heller FR. Impact of genetic defects on atherosclerosis in patients suspected of familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest*. 2001;31:958–965.
- Pocovi M, Civeira F, Alonso R, Mata P. Familial hypercholesterolemia in Spain: case-finding program, clinical and genetic aspects. *Semin Vasc Med*. 2004;4:67–74.
- Myant NB. Familial defective apolipoprotein B-100: a review, including some comparisons with familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*. 1993;104:1–18.
- Real J, Chaves F, Ejarque I, García-García A, Valldecabres C, Ascaso J, Armengod M, Carmena R. Influence of LDL receptor gene mutations and the R3500Q mutation of the apoB gene on lipoprotein phenotype of familial hypercholesterolemic patients from a South European population. *Eur J Hum Genet*. 2003;11:959–965.
- Bertolini S, Cantafora A, Aversa M, Cortese C, Motti C, Martini S, Pes G, Postiglione A, Stefanutti C, Blotta I, Pisciotto L, Roller M, Langheim S, Ghisellini M, Rabbone I, Calandra S. Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:e41–e52.
- Umans-Eckenhausen MA, Sijbrands EJ, Kastelein JJ, Defesche JC. Low-density lipoprotein receptor gene mutations and cardiovascular risk in a large genetic cascade screening population. *Circulation*. 2002;106: 3031–3036.
- Tonstad S, Joakimsen O, Stensland Bugge E, Ose L, Bonna KH, Leren TP. Carotid intima-media thickness and plaque in patients with familial hypercholesterolemia mutations and control subjects. *Eur J Clin Invest*. 1998;28:971–979.

27. Koeijvoets KC, Rodenburg J, Hutten BA, Wiegman A, Kastelein JJ, Sijbrands EJ. Low-density lipoprotein receptor genotype and response to pravastatin in children with familial hypercholesterolemia. Substudy of an intima-media thickness trial. *Circulation*. 2005;112:3168–3173.
28. Ueland T, Vissers MN, Wiegman A, Rodenburg J, Hutten B, Gullestad L, Ose L, Rifai N, Ridker PM, Kastelein JJ, Aukrust P, Semb AG. Increased inflammatory markers in children with familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest*. 2006;36:147–152.
29. Holven KB, Myhre AM, Aukrust P, Hagve TA, Ose L, Nenseter MS. Patients with familial hypercholesterolaemia show enhanced spontaneous chemokine release from peripheral blood mononuclear cells ex vivo. Dependency of xanthomas/xanthelasms, smoking and gender. *Eur Heart J*. 2003;24:1756–1762.
30. Artieda M, Cenarro A, Junquera C, Lasierra P, Martínez-Lorenzo MJ, Pocoví M, Civeira F. Tendon xanthomas in familial hypercholesterolemia are associated with a differential inflammatory response of macrophages to oxidized LDL. *FEBS Lett*. 2005;579:4503–4512.
31. Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease. An update. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:1731–1737.
32. Tybjærg-Hansen A, Jensen HK, Benn M, Steffensen R, Jensen G, Nordestgaard BG. Phenotype of heterozygotes for low-density lipoprotein receptor mutations identified in different background populations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:211–215.
33. Damgaard D, Jensen JM, Larsen ML, Soerensen VR, Jensen HK, Gregersen N, Jensen LG, Faergeman O. No genetic linkage or molecular evidence for involvement of the PCSK9, ARH or CYP7A1 genes in the familial hypercholesterolemia phenotype in a sample of Danish families without pathogenic mutations in the LDL receptor and apoB genes. *Atherosclerosis*. 2004;177:415–422.
34. Sun XM, Patel DD, Bhatnagar D, Knight BL, Soutar AK. Characterization of a splice-site mutation in the gene for the LDL receptor associated with an unpredictably severe clinical phenotype in English patients with heterozygous FH. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:219–227.
35. Damgaard D, Larsen ML, Nissen PH, Jensen JM, Jensen HK, Soerensen VR, Jensen LG, Faergeman O. The relationship of molecular genetic to clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia in a Danish population. *Atherosclerosis*. 2005;180:155–160.

Supplementary material to:

FEMORAL ATHEROSCLEROSIS IN HETEROZYGOUS FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA. INFLUENCE OF THE GENETIC DEFECT.

Authors: Mireia Junyent, Rosa Gilabert, Daniel Zambón, Miguel Pocoví, Miguel Mallén, Montserrat Cofán, Isabel Núñez, Fernando Civeira, Diego Tejedor, and Emilio Ros.

From Unitat de Lípids, Servei d'Endocrinologia i Nutrició (M.J., D.Z., M.C., E.R.) and Secció d'Ecografia, Centre de Diagnòstic per l'Imatge (R.G., I.N.), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Hospital Clínic, Barcelona and Ciber Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CB06/03), Instituto de Salud Carlos III, Spain; Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular (M.P., M.M.), Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain; Hospital Universitario Miguel Servet (F.C.), Zaragoza, Spain; and Progenika Biopharma S.A. (D.T.), Derio, Spain.

METHODS

Clinical and laboratory characteristics. Cardiovascular risk factors and clinical chemistry variables were determined by standard methods. History of smoking was established if the subject reported smoking ever ≥ 3 cigarettes per day for at least 5 years. Weight and height were measured with calibrated scales and a wall-mounted stadiometer, respectively. Body mass index was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in centimeters. Blood pressure was measured in duplicate with a validated semi-automatic oscillometer (Omron HEM-705CP). Hypertension was defined as systolic blood pressure ≥ 140 mm Hg, diastolic blood pressure ≥ 90 mm Hg, or current use of antihypertensive medication. Diabetes mellitus was defined as fasting glucose level ≥ 126 mg/dL or treatment with antidiabetic agents.

Blood glucose was measured by the glucose-oxidase method. Cholesterol and triglycerides were determined by standard enzymatic methods. HDL cholesterol was measured by a precipitation technique. LDL cholesterol was estimated with the Friedewald equation. ApoAI, apoB and lipoprotein(a) were determined by using immunoturbidimetry (Unimate 3, Roche, Basel, Switzerland).

Femoral ultrasonography. B-mode ultrasound imaging of the right and left femoral arteries was performed by using Powervision and Applio instruments (Toshiba, Nasu, Japan) equipped with 7-10 MHz broadband linear array transducers. Mean common femoral IMT was defined as the average of 4 to 8 distances between the far wall lumen-intima and media-adventitia ultrasound interfaces taken bilaterally in the 1-cm segment proximal to the bifurcation. Maximum IMT was defined as the highest distance in the same 1-cm segments at any of the two sites. Plaques were sought by using B-mode and color Doppler examinations in both longitudinal and transverse planes to take into consideration circumferential asymmetry and were defined as focal intrusions into the lumen ≥ 1.2 mm thick. A plaque score was constructed as the sum of maximum heights of all plaques present or maximum IMT when there were no plaques. IMT and plaque height were measured online with electronic calipers by two experienced sonographers (RG and IN). Interobserver variability was examined in 15 subjects. The CVs of paired readings of mean IMT, maximum IMT, and plaque score were 5.6%, 7.1%, and 9.5%, respectively.

Molecular testing

The methods used to screen genomic DNA for *LDLR* gene mutations and the R3500Q mutation in the *APOB* gene have been described previously.^{1,2} For assessing *LDLR* gene mutations, the promoter region, the translated exon sequences, the exon-intron boundaries, and short proximal intronic sequences of the *LDLR* gene were individually amplified by PCR, and subsequently analyzed by SSCP. Purified PCR products from DNA samples with abnormal SSCP patterns were directly sequenced. Mutation nomenclature followed present HGVS recommendations (<http://www.hgvs.org>). Nucleotide numbering was based on the cDNA sequence, with position +1 being the A of the ATG translation initiation codon and aminoacid numbering with position +1 being the translation initiator methionine. Large rearrangements in the *LDLR* gene were analyzed using a method based on quantitative fluorescent multiplex PCR.

Since early 2004, DNA was screened for *LDLR* and *APOB* gene defects by using a microarray (Lipochip®, Progenika Biopharma, Derio, Spain) designed to detect the more prevalent mutations in the Spanish population, which is periodically updated as new mutations are identified.³ When no mutations were detected, the *LDLR* gene was sequenced as described above to search for mutations not included in the microarray design.

Statistical analyses

Data are presented as means (\pm SD) for continuous variables (medians and interquartile ranges for variables with a skewed distribution) and as frequencies or percentages for categorical variables. Differences in mean values were assessed using analyses of variance and t-tests. Categorical variables were compared using chi-square tests. Pearson correlation coefficients were constructed to test for relationships between continuous variables. Because predictably IMT was strongly related to age and showed sex differences, age and sex-adjusted IMT values were used when examining associations with other variables. ANOVA statistics were used to test adjusted femoral measurements depending on the type of mutation, using post-hoc Bonferroni testing for assessment of group differences. We used stepwise multiple regression analyses to test the associations of various cofactors with IMT and plaque scores. Two-sided $P < 0.05$ was considered significant. SPSS software (version 12.0) was used.

REFERENCES

1. Mozas P, Castillo S, Tejedor D, Reyes G, Alonso R, Franco M, Saenz P, Fuentes F, Almagro F, Mata P, Pocoví M, on behalf of Spanish Group of FH. Molecular characterization of Familial Hypercholesterolemia in Spain: identification of 39 novel and 77 recurrent mutations in LDLR. *Hum Mutat.* 2004;24:187.
2. Castillo S, Tejedor D, Mozas P, Reyes G, Civeira F, Alonso R, Ros E, Pocoví M, Mata P. The apolipoprotein B R3500Q gene mutation in Spanish subjects with a clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2002;165:127-35.
3. Tejedor D, Castillo S, Mozas P, Jiménez E, Lopez M, Tejedor MT, Artieda M, Alonso R, Mata P, Simon L, Martinez A, Pocovi M. Comparison of DNA array platform vs. DNA sequencing as genetic diagnosis tools for familial hypercholesterolemia. *Clin Chem.* 2006;52:1971-1972.

Table I. LDL receptor and apo B gene mutations in patients with familial hypercholesterolemia.

Location	cDNA	Mutation name	Usual Name	Type	Previously described	n
Null alleles						
exon 1	c.1-?_67+?del4kb		del4Kb	rearrangement	No	3
exon 2	c.91G>T	p.Glu31X	E10X	nonsense	Yes	2
exon 2	c.97C>T	p.Gln33X	Q12X	nonsense	Yes	2
exon 3	c.214delG	p.Asp72ThrfsX132	211delG	frameshift	Yes	1
exon 4	c.304C>T	p.Gln102X	Q81X	nonsense	Yes	1
exon 4	c.460C>T	p.Gln154X	Q133X	nonsense	Yes	1
exon 4	c.518delG	p.Cys173SerfsX31	518delG	frameshift	Yes	2
exon 4	c.590G>A	p.Cys197Tyr	C176Y	missense	Yes	1
exon 5	c.732delT	p.Asp245MetfsX19	732delT	frameshift	No	1
exon 6	c.884delT	p.Val295AlafsX73	884delT	frameshift	Yes	1
exon 7	c.1045delC	p.Gln349SerfsX19	1045delC	frameshift	Yes	14
exon 7	c.1045_1046insA	p.Gln349ThrfsX7	1045insA	frameshift	No	1
exon 7	c.1054_1060+4del11		1054del11	small rearrangement	Yes	1
exon 8	c.1176C>A	p.Cys392X	C371X	nonsense	Yes	3
exon 9	c.1200C>A	p.Tyr400X	Y379X	nonsense	Yes	1
exon 9	c.1342C>T	p.Gln448X	Q427X	nonsense	Yes	1
exon 11	c.1646G>A	p.Gly549Asp	G528D	missense	Yes	2
exon14	c.2085del19	p.Cys696SerfsX6	2085del19	frameshift	Yes	1
exon 15	c.2183delG	p.Arg728SerfsX1	2183delG	frameshift	Yes	2
exon 15	c.2207_2208insT	p.Val736ValfsX44	2207insT	frameshift	Yes	1
exon 1 + exon 6	c.[11G>A(+)]829G>A]	p.[Trp4X(+)]Glu277Lys]	W(-18)X + E256K	nonsense + missense	Yes	4
exon 4 + exon 9	c.[460C>T(+)]1247G>A]	p.[Gln154X(+)]Arg416Gln]	Q133X + R395Q	nonsense + missense	Yes	1
exon 5 + exon 7	c.(806G>A(+)]1045delC)	p.(Gly269Asp(+)]Gln349SerfsX19)	G248D + 1045delC	missense + frameshift	Yes	1
Receptor-defective mutations						48
promoter	c.-142C>T		(-49) C/T	transcription	Yes	4
promoter	c.-135C>G		(-42) C>G	transcription	Yes	1
exon 3	c.284G>A	p.Cys95Tyr	C74Y	missense	No	3
exon 3	c.301G>A	p.Glu101Lys	E80K	missense	Yes	1
exon 4	c.362G>A	p.Cys121Tyr	C100Y	missense	No	1
exon 4	c.464G>A	p.Cys155Tyr	C134Y	missense	No	1
exon 4	c.530C>T	p.Ser177Leu	S156L	missense	Yes	8
exon 4	c.646T>C	p.Cys216Arg	C195R	missense	Yes	2
exon 4	c.654_656delTGG	p.Gly218_Gly219delin	dG197	in-frame deletion	Yes	3
exon 6	c.826T>G	p.Cys276Gly	C255G	missense	Yes	2
exon 6	c.829G>A	p.Glu277Lys	E256K	missense	Yes	3
exon 6	c.895G>C	p.Ala299Ser	A278S	missense	No	7
exon 6	c.920A>G	p.Asp307Gly	D286G	missense	No	1
exon 7	c.1027G>A	p.Gly343Ser	G322S	missense	Yes	2
exon 8	c.1136G>A	p.Cys379Tyr	C358Y	missense	Yes	1
exon 9	c.1301C>A	p.Thr424Lys	T413K	missense	Yes	1
exon 11	c.1664T>C	p.Leu555Pro	L534P	missense	Yes	3
exon 12	c.1800G>C	p.Glu600Asp	E579D	missense	No	1
exon 13	c.1963T>C	p.Phe655Leu	F634L	missense	Yes	2
exon 14	c.2054C>T	p.Pro685Leu	P664L	missense	Yes	1
exon 16	c.2375T>C	p.Ile792Thr	I771T	missense	No	2
exon 17	c.2475C>TG	p.Asn825Lys	N804K	missense	Yes	1
exon 3 + intron 3	c.[274C>G(+)]313-1G>C]	p.[Gln92Glu(+)]?	Q71E + 313+1G>C	missense + splicing	Yes	6
exon 11 + exon 17	c.[1690A>C(+)]2393_2401del9]	p.[Asn564His(+)]Leu798_Phe801delinsLeu]	N543H + 2393del9	frameshift + missense	Yes	2
exon 4 + intron 6	c.(676T>C(+)]931-39C>T)	p.(Ser226Pro(+)]?	S205P+931-39C>T	missense	Yes	1
intron 6 + exon 8	c.(931-39C>T(+)]1103G>A)	p.(?+)]Cys368Tyr)	941-39C>T+C347Y	missense	Yes	2
Splicing mutations. Undetermined receptor activity						62
intron 6	c.941-39C>T		941-39C>T	splicing	Yes	3
intron 8	c.1186+5G>A		1186+5G>A	splicing	No	1
intron 9	c.1358+1G>A		1358+1G>A	splicing	Yes	2
intron 11	c.1706-10G>A		1706-10G>A	splicing	Yes	1
intron 12	c.1845+1G>C		1845+1G>C	splicing	Yes	4
intron 14	c.2140+5G>A		2140+5G>A	splicing	Yes	2
intron 15	c.2311+2T>G		2311+2T>G	splicing	No	2
intron 15	c.2312-47G>A		2312-47G>C	splicing	No	3
intron 16	c.2389+8C>T		2389+8C>T	splicing	No	1
intron 16	c.2390-1G>C		2390-1G>C	splicing	Yes	6
APOB 3500 mutations						25
ApoB gene	c.10580G>A	p.Arg3527Gln	R3500Q	missense	Yes	11
Total						146

Frequency of Low-Density Lipoprotein Receptor Gene Mutations in Patients With a Clinical Diagnosis of Familial Combined Hyperlipidemia in a Clinical Setting

Fernando Civeira, MD, PHD,* Estibaliz Jarauta, MD,* Ana Cenaarro, PHD,*
Angel L. García-Otín, PHD,* Diego Tejedor, PHD,† Daniel Zambón, MD, PHD,‡
Miguel Mallen, BSc,§ Emilio Ros, MD, PHD,‡ Miguel Pocoví, PHD§

Zaragoza and Derio, Spain

Objectives	The purpose of this study was to determine the frequency of mutations in the low-density lipoprotein receptor (<i>LDLR</i>) and apolipoprotein B (<i>APOB</i>) genes in consecutive patients with a clinical diagnosis of familial combined hyperlipidemia (FCH) in a nonresearch setting.
Background	The lipid phenotype frequently overlaps in familial hypercholesterolemia (FH) and FCH. Detection of causative mutations in <i>LDLR</i> or <i>APOB</i> provides an unequivocal diagnosis of FH, but such genetic testing has not been systematically performed in FCH.
Methods	We used Lipochip (Progenika, Derio, Spain), a microarray that includes 203 causative mutations in <i>LDLR</i> and 4 <i>APOB</i> defects, to investigate 143 unrelated FCH patients.
Results	Mutations of <i>LDLR</i> were found in 28 patients (overall prevalence, 19.6%). No <i>APOB</i> defects were found. Compared with patients who had a normal <i>LDLR</i> gene, patients with mutations had lower waist circumference ($p = 0.02$); significantly ($p < 0.005$) higher total cholesterol, non-high-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, and apoB; nonsignificantly ($p = 0.063$) lower triglycerides; and a lower frequency of diabetes mellitus (22% vs. 0%, respectively; $p = 0.002$). Total cholesterol and apoB levels showed the best receiver-operator characteristics curves in the prediction of <i>LDLR</i> mutations, with areas under the curve (95% CI: of 0.750 (95% confidence interval [CI]: 0.647 to 0.853) and 0.744 (95% CI: 0.636 to 0.851), respectively. Total cholesterol of 335 mg/dl and apoB of 185 mg/dl were the best thresholds for diagnosis of <i>LDLR</i> mutations.
Conclusions	Screening for <i>LDLR</i> defects is advisable for patients with a clinical diagnosis of FCH showing high total cholesterol or apoB levels. Diagnostic criteria for FH should not exclude patients whose personal and familial lipid values appear to fit the clinical criteria of FCH. (J Am Coll Cardiol 2008;52:1546-53) © 2008 by the American College of Cardiology Foundation

The low-density lipoprotein receptor (LDLR) is a cellular surface protein that recognizes and internalizes low-density

lipoprotein (LDL) particles. Dysfunction of the LDLR causes familial hypercholesterolemia (FH), one of the most common inherited metabolic diseases in humans (1). Homozygous FH is a very rare condition, but the frequency of heterozygous FH is close to 1 in 500 persons in most

See page 1554

populations. Elevated blood concentrations of LDL-cholesterol, a high risk of early-onset coronary heart disease, and extravascular lipid deposits such as arcus cornealis and tendon xanthomas characterize FH (1). Blood triglycerides in FH usually are in the normal range; thus, the typical lipid abnormality is an isolated elevation of LDL-cholesterol.

From the *Unidad de Lípidos and Laboratorio de Investigación Molecular, Hospital Universitario Miguel Servet, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (I+CS), Zaragoza, Spain; †Progenika Biopharma S.A., Derio, Spain; ‡Unitat de Lípids, Servei d'Endocrinologia i Nutrició, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi Sunyer, Hospital Clínic, and Ciber Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Spain; and the §Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain. Supported by grants from the Spanish Ministry of Health FISS PI05/0247, PI06/0365, PI06/1402, and RTIC C06/01 (RECAVA), and the Spanish Ministry of Education and Science (SAF2005-07042). Dr. Tejedor is employed by Progenika Biopharma, the company that commercializes the microarray (Lipochip) for genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia in Spain.

Manuscript received January 9, 2008; revised manuscript received May 6, 2008, accepted June 2, 2008.

However, patients with FH disclose higher triglyceride levels than do their unaffected relatives and/or age-matched subjects from the general population (2,3); and as many of 25% of heterozygous FH patients present a mixed hyperlipidemia phenotype, with elevation of both LDL-cholesterol and triglycerides (4). This subgroup of hypertriglyceridemic FH represents a diagnostic challenge, because mixed hyperlipidemia with familial presentation is characteristic of familial combined hyperlipidemia (FCH), another common inherited lipid abnormality characterized by premature coronary heart disease (5). In fact, the usual diagnostic criteria for FH contemplate that either serum triglycerides should be normal (<200 mg/dl) (6) or the diagnosis must be considered with caution in patients with hypertriglyceridemia (7). The problem is compounded by the equivocal diagnostic criteria for FCH. This disorder is associated with variable lipid phenotypes, both in affected persons and family members, with a clinical expression that is closely related to visceral fat accumulation, and the recently proposed FCH criterion of an elevated apolipoprotein (apo) B level (8) is also present in FH. Moreover, tendon xanthomas, a key diagnostic feature, are clinically detectable in only ≈40% of FH patients after the fourth decade of life (9,10).

The overlapping clinical presentation of FCH and FH with high triglycerides has been previously suspected in the Simon Broome Registry in the United Kingdom (11), wherein patients with a clinical diagnosis of FH but no tendon xanthomas disclosed lower blood cholesterol and higher triglycerides, blood pressure, and body mass index than did patients with tendon xanthomas. These differences suggested to the authors that the diagnostic criteria used in that cohort misclassified as FH cases some patients with FCH (11). Evidence of such misclassification was reported in a 3-generation pedigree with an apparent diagnosis of FCH in whom a defective *LDLR* allele was shown to cause the familial hypercholesteromic phenotype (12).

A definitive diagnosis of FH can be made by molecular testing showing a pathogenic defect in the *LDLR* or *APOB* genes. Such an approach should unequivocally clarify the diagnosis between FH and FCH in doubtful cases. To our knowledge, the *LDLR* and *APOB* genes have not been systematically screened in subjects with a clinical diagnosis of FCH. The aim of this study was to describe the frequency of *LDLR* and *APOB* mutations in a large group of unrelated subjects who had received a diagnosis of FCH, based on the presence of mixed hyperlipidemia in the index case, a variable lipid phenotype in first-degree relatives, and absence of tendon xanthomas.

Methods

Study subjects. From October 2005 to June 2007, consecutive patients ages ≥25 years with a clinical diagnosis of FCH attending 2 lipid clinics in Spain were recruited into a protocol approved by the local review boards and provided

informed consent. The diagnosis of FCH was based on the presence of primary combined hyperlipidemia, with off-treatment serum cholesterol and triglyceride levels above the gender- and age-adjusted 90th percentile for the Spanish population (13), serum total apoB levels ≥120 mg/dl, and at least 1 first-degree relative with hyperlipidemia (total cholesterol and/or triglycerides >90th percentile). Off-treatment lipid values of first-degree family members were obtained from clinical records, and they were classified into the following categories: 1) normolipidemic (<90th percentile for total cholesterol and triglycerides); 2) type 2a (≥90th percentile total cholesterol and <90th percentile triglycerides); 3) type 2b (≥90th percentile total cholesterol and ≥90th percentile triglycerides); and 4) type 4 (<90th percentile total cholesterol and ≥90th percentile triglycerides). Gender- and age-adjusted 90th percentile cutpoints for the Spanish population were used (13). For the purpose of this study, additional inclusion criteria were serum LDL-cholesterol ≥190 mg/dl or non-high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol ≥220 mg/dl when serum triglycerides were ≥400 mg/dl. Exclusion criteria were secondary causes of hyperlipidemia, presence of tendon xanthomas in the proband or in any family member, a previous clinical or molecular diagnosis of FH in a first-degree relative, or very high triglycerides level (>1,000 mg/dl). To exclude the presence of xanthomas uncovered by physical examination, Achilles tendons were examined by sonography with a standard protocol shared by the 2 clinics, as described (14).

Clinical and laboratory determinations. All subjects were assessed for family history of early-onset coronary heart disease, clinical history, medication use, demographic characteristics, adiposity measures, cardiovascular risk factors, and presence of tendon xanthomas. Diabetes mellitus was defined as fasting glucose level ≥126 mg/dl or treatment with antidiabetic agents.

In asymptomatic subjects, fasting blood for baseline biochemical profiles was drawn after at least 4 weeks without hypolipidemic drug treatment. In patients with prior coronary heart disease, baseline lipid values were obtained from clinical records. Cholesterol and triglycerides were determined by standard enzymatic methods. HDL-cholesterol was measured by a precipitation technique. LDL-cholesterol was estimated with the Friedewald equation when serum triglycerides were <400 mg/dl. Non-HDL-cholesterol was calculated as total cholesterol minus HDL-cholesterol. Both apoB and lipoprotein(a) were determined by using immunoturbidimetry (Unimate 3, Roche, Basel, Switzerland).

Abbreviations and Acronyms

Apo	= apolipoprotein
CI	= confidence interval
FCH	= familial combined hyperlipidemia
FH	= familial hypercholesterolemia
LDL	= low-density lipoprotein
LDLR	= low-density lipoprotein receptor gene
ROC	= receiver-operator characteristic

Genetic studies. The screening of mutations in *LDLR* and *APOB* genes was performed with LipoChip, version 4 (Progenika, Derio, Spain). This platform is a microarray device that includes the diagnosis of 203 different causative mutations in the *LDLR* gene and 4 mutations in the binding domain of apoB. The microarray design, fabrication, and quality controls, the target deoxyribonucleic acid preparation and hybridization, the microarray scanning and quantification, and the genotyping software have been previously described in detail (15). LipoChip version 4 recognizes 88% of the 230 different *LDLR* mutations detected in Spain thus far. The overall specificity and sensitivity obtained for all mutations tested was 99.7% and 99.9%, respectively (16). Because the most common mutations are included in the array, after testing $\approx 5,000$ deoxyribonucleic acid samples from patients with a clinical diagnosis of FH, we can be confident that LipoChip version 4 identifies $\approx 95\%$ of genetic defects causing FH in Spain (D. Tejedor, personal communication, December 2007). Large rearrangements in the *LDLR* gene were analyzed using a method based on quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction (17).

The *APOE* genotype, defined by the common polymorphisms p.Cys130Arg (C112R) and p.Arg176Cys (R158C), and the 2 rare variants p.Arg154Ser (R136S) and p.Lys167del (L149del), was determined by specific pyrosequencing reactions on a PSQ96MA instrument (Biotage AB, Uppsala, Sweden).

Statistical analyses. Data are presented as means (\pm SD) for continuous variables (medians and interquartile ranges for variables with a skewed distribution) and as frequencies or percentages for categorical variables. Differences in mean values were assessed using *t* tests or the Mann-Whitney *U* test, as appropriate. Categorical variables were compared using chi-square tests. Univariate logistic regression was used to determine the ability of clinical variables and lipid and apo concentrations to discriminate between cases with and without *LDLR* defects, and crude odds ratios with 95% confidence intervals (CIs) were calculated. Because of a skewed distribution, triglyceride levels were transformed to their natural logarithm for analyses. We determined the threshold values of these variables for best diagnostic performance of the presence of a *LDLR* defect based on analysis of receiver-operator characteristic (ROC) curves. The ROC curves were constructed by using mutation carriers as the disease group and the subjects without mutations as the nondisease group. Because all cases of diabetes mellitus occurred in subjects without genetic defects, the odds ratios calculated in the logistic regression analysis gave inconsistent results and very large CIs. For this reason, the odds ratio for diabetes was calculated by using the 2-tailed Fisher exact test.

Multivariate logistic regression analysis with the forward selection based on likelihood ratio was used to examine the independent association of different variables with the presence of FH-causing genetic defects. The independent

variables used in this model were as follows: gender, age, body mass index, waist circumference, the serum levels of total cholesterol, LDL-cholesterol (or non-HDL-cholesterol), apoB, and natural logarithm triglycerides, and presence or absence of a total cholesterol level above the gender- and age-specific 95th percentile for the Spanish population (13). Diabetic subjects and subjects disclosing the *APOE* 2/2 genotype or rare *APOE* variants were excluded from the multivariate analysis. All statistical analyses were performed with SPSS software (version 13.0, SPSS, Inc., Chicago, Illinois), with significance set at $p < 0.05$.

Results

Clinical characteristics. A total of 143 unrelated FCH subjects, 93 men and 50 women ages 51 ± 11 years, were included in the study. A personal history of coronary heart disease and a family history of early-onset coronary heart disease were present in 30 (21%) patients and 44 (31%) patients, respectively. Mean plasma total cholesterol, triglycerides, and HDL-cholesterol levels were 326 ± 57 mg/dl, 352 ± 175 mg/dl, and 42 ± 14 mg/dl, respectively.

Frequency of *LDLR* mutations. A functional *LDLR* mutation was found in 28 (19.6%) patients. No *APOB* mutations were detected. The clinical and biochemical characteristics of patients with (*LDLR*+) and without (*LDLR*-) mutations are shown in Table 1. In comparison with *LDLR*- patients, patients shown to be *LDLR*+ disclosed higher serum levels of total cholesterol, LDL-cholesterol, non-HDL-cholesterol, and apoB. In contrast, triglyceride levels were higher, although not reaching statistical significance, in *LDLR*- patients compared with those in *LDLR*+ patients ($p = 0.059$). The frequency of mutations in women (28%) was nonsignificantly ($p = 0.063$) higher than in men (15%). The *LDLR*- patients also had a higher waist circumference, even after adjustment for gender. Diabetes was present in 26 *LDLR*- patients (22.6%) and was absent in *LDLR*+ patients.

***APOE* genotype.** The *APOE* genotype of 2 patients in the *LDLR*- group was E2/E2, indicating that their combined hyperlipidemia phenotype was due to dysbetalipoproteinemia. In addition, 1 E3/E3 woman and 1 E3/E3 man in the *LDLR*- group were heterozygous for the rare alleles L149del and S136, respectively. Both mutations have been shown to be associated with dyslipidemia (18,19). No rare *APOE* variants were present in the *LDLR*+ group.

Types of *LDLR* mutations. The clinical and biochemical characteristics, *APOE* genotype, and *LDLR* defect of the 28 *LDLR*+ patients is shown in Table 2. A total of 22 different mutations distributed along the whole gene were found, indicating high molecular heterogeneity. Three subjects were heterozygous for the double defect 1061-8T>C/T726I; the mutations 91G>T, 518delG, 829G>A, and 1133A>C were found in 2 subjects each. The 2 mutations (1255T>C and 1359-3C>T) have not been previously reported, although they have been found in the Spanish FH

Table 1 Characteristics of Patients With a Clinical Diagnosis of FCH According to Presence of *LDLR* Mutations

	<i>LDLR</i> ⁻ (n = 115)	<i>LDLR</i> ⁺ (n = 28)	p Value
Age, yrs	51.5 ± 10.8	49.4 ± 12.9	0.388
Gender, men/women	79/36	14/14	0.063
Smokers, n (%)			0.443
Never	48 (41.7)	14 (50.0)	
Current	28 (24.3)	8 (28.6)	
Former	39 (33.9)	6 (21.4)	
Prior coronary heart disease, n (%)	26 (22.6)	4 (14.3)	0.332
Diabetes mellitus, n (%)	26 (22.6)	0 (0)	0.002
Hypertension, n (%)	45 (39.1)	9 (32.1)	0.494
Body mass index, kg/m ²	28.2 ± 3.75	27.2 ± 3.44	0.168
Waist circumference, cm	97.3 ± 10.2	92.1 ± 9.6	0.020
Achilles tendon thickness, mm*	4.84 ± 0.64	4.81 ± 0.65	0.804
Lipids and lipoproteins, mg/dl			
Total cholesterol	318 ± 56	357 ± 54	0.001
LDL-cholesterol (78/23)†	226 ± 56	268 ± 56	0.002
Non-HDL-cholesterol	277 ± 53	310 ± 4	0.003
HDL-cholesterol	41 ± 12	47 ± 18	0.129
Triglycerides	301 (226–464)	248 (217–361)	0.059
ApoA1	127 ± 23	126 ± 32	0.863
ApoB	167 ± 30	199 ± 41	<0.001
Lipoprotein(a)	23.0 (7.20–70.0)	20.4 (4.87–68.6)	0.737

Data are means ± SD or medians (interquartile ranges). *Maximum thickness of bilateral tendons measured at sonography. †Numbers of measurements available for *LDLR*⁻ and *LDLR*⁺ patients, respectively, are shown in parentheses where values were missing because the Friedewald equation was inadequate to estimate LDL-cholesterol (i.e., serum triglycerides ≥400 mg/dl). Missing values for LDL-cholesterol did not differ between groups, p = 0.136.

Apo = apolipoprotein; FCH = familial combined hyperlipidemia; HDL = high-density lipoprotein; LDL = low-density lipoprotein; *LDLR* = low-density lipoprotein receptor; *LDLR*⁻ = absence of *LDLR* mutation; *LDLR*⁺ = presence of *LDLR* mutation.

population. The proportion between negative-receptor and defective-receptor mutations was 1:3 (5 subjects had negative alleles, 16 subjects had defective alleles, and 7 patients had splicing mutations with undetermined effect on LDL receptor activity) (Online Table).

Predictors of *LDLR* mutations by logistic regression and ROC analyses. Crude odds ratios associated with the presence of a *LDLR* mutation are shown in Table 3. The variables that contributed positively were absence of diabetes, total cholesterol >95th percentile, and serum concentrations of total cholesterol, LDL-cholesterol, non-HDL-cholesterol, and apoB. Waist circumference was negatively associated with presence of a *LDLR* mutation. The best area under the curve in the ROC analysis was given by apoB, although without significant differences from the values obtained for total cholesterol and LDL-cholesterol.

To assess whether any combination of variables could improve the prediction of having a *LDLR* defect, independent associations were sought by multivariate logistic regression. The concentration of apoB was the sole independent factor associated with a *LDLR* mutation, with odds ratio 1.028 (95% CI: 1.013 to 1.044; p < 0.001). The area under the curve of apoB in the ROC analysis was 0.744 (95% CI: 0.636 to 0.851; p < 0.001). When apoB was excluded from the model, total cholesterol was the independent associa-

tion, with odds ratio 1.019 (95% CI: 1.009 to 1.030; p < 0.001), and the area under the curve in the ROC analysis was 0.750 (95% CI: 0.647 to 0.853; p < 0.001). The ROC statistics were also used to evaluate sensitivity and specificity of thresholds for these variables. The optimal threshold was chosen so that the sum of the sensitivity and the specificity to discriminate *LDLR*⁺ from *LDLR*⁻ subjects was maximal. A total cholesterol level ≥335 mg/dl and apoB ≥185 mg/dl provided the best cutoff values, with sensitivities and specificities of 61% and 72% and 61% and 74%, respectively.

Considering the association of *LDLR* mutations with clinical characteristics and serum cholesterol and apoB values, we calculated their frequency in various subgroups. As shown in Figure 1, the prevalence of *LDLR* mutations increased from 19.6% in the overall series to 41.7% among nondiabetic subjects with normal *APOE* genotype and a total cholesterol level ≥335 mg/dl or apoB ≥185 mg/dl.

Discussion

This study shows that a substantial number of patients with a clinical diagnosis of FCH disclose a functional mutation in the *LDLR* gene and thus should be classified as FH bearers. These results are novel and firmly support the previously suspected notion that patients with clinical FH who present with hypertriglyceridemia and a lipid phenotype overlapping that of FCH may be misdiagnosed as having FCH (11). They also suggest that FCH is a phenotype rather than a disease, and that FH could be considered as one of its causes.

Hypertriglyceridemia is a not uncommon feature of FH that may have several causes. First, LDL particles carry small amounts of triglycerides; therefore, if there is a large number of circulating LDL particles, some degree of triglyceride elevation might be expected. Second, in addition to clearing LDL from the circulation, the *LDLR* removes some triglyceride-carrying very low-density and intermediate-density lipoproteins (I), and it has been clearly demonstrated that severe *LDLR* protein defects, especially those affecting repeat 5 of the binding domain, can interfere with intermediate-density lipoprotein uptake by liver cells (20). Third, the coexistence in the same patient of FH with other genetic lipid abnormalities, such as FCH or dysbetalipoproteinemia (21), could explain the concomitant and severe increases of cholesterol and triglycerides observed in some patients with a molecular diagnosis of FH. Lastly and probably more important, many common genetic and environmental factors contribute to triglyceride elevations in the population (22), and their influence could be magnified in the presence of *LDLR* defects. For example, the hypertriglyceridemic effect of a frequent functional mutation in the lipoprotein lipase gene (D9N) is higher in FH patients than in the general population (23). Our results support the existence of common polygenic and environmental triglyceride-raising factors for several reasons: the *LDLR* mutations found are also present in normotriglyceridemic FH; all types of mutations, not only severe ones, occurred in our FCH patients; and the

Table 2 Clinical and Biochemical Characteristics, APOE Genotype, LDLR Mutation, and Lipoprotein Phenotype of First-Degree Family Members of the 28 Subjects With Mixed Hyperlipidemia and Presence of LDLR Mutation

Gender	Age, yrs	BMI, kg/m ²	CVD (Age of Onset, yrs)	Total Cholesterol, mg/dl	Triglycerides, mg/dl	Non-HDL-Cholesterol, mg/dl	HDL-Cholesterol, mg/dl	ApoB, mg/dl	APOE Genotype	LDLR Mutation*	Lipoprotein Phenotype of First-Degree Family Members, Normal/Ia/1Ib/IV
Male	61	26.8	Yes (59)	401	221	368	33	217	E3/E3	-135C>G	3/1/0/0
Male	39	30.7	No	423	379	385	38	256	E3/E3	E31X	1/1/1/0
Male	38	22.4	No	437	219	401	36	304	E3/E4	E31X	3/1/0/0
Male	30	29.9	No	273	506	248	25	143	E3/E3	E31X+1061-8T>C + T726I	1/0/1/1
Male	34	25.7	No	317	483	286	31	163	E3/E3	313+1_313+2insT	4/2/2/0
Female	39	20.9	No	336	159	290	46	191	E3/E3	313+1G>A	4/1/1/0
Female	47	23.1	No	398	167	349	49	189	E3/E3	C95G + 1587-1G>C	0/0/1/0
Male	43	33.4	No	368	275	333	35	188	E3/E4	Asp168Asn	1/1/2/0
Female	27	28.1	No	359	362	307	52	234	E3/E3	C173SfsX33	1/1/1/0
Female	73	31.0	No	438	218	384	54	272	E3/E3	C173SfsX33	3/1/2/0
Male	54	26.0	No	307	810	270	37	170	E3/E3	E277K	4/2/0/0
Female	67	26.1	No	345	360	304	41	224	E3/E3	E277K	1/0/1/1
Female	62	26.9	No	304	250	254	50	178	E3/E3	941-39 C/T	2/0/1/0
Male	56	31.4	Yes (54)	360	330	319	41	160	E3/E3	1061-8T>C + T726I	4/1/1/0
Female	65	31.2	No	377	210	331	46	201	E3/E3	1061-8T>C + T726I	2/0/1/0
Female	72	27.8	No	294	217	225	69	139	E3/E3	1061-8T>C + T726I	6/1/1/0
Female	59	31.0	No	311	309	255	56	249	E3/E4	Q378P	2/1/2/0
Female	37	24.5	No	326	147	229	97	145	E3/E3	Q378P	3/1/1/0
Female	45	19.6	No	398	169	311	87	225	E2/E3	T454N	3/1/1/0
Male	44	27.4	No	453	217	405	48	179	E3/E3	A540T	1/3/1/0
Male	46	26.6	Yes (45)	444	258	409	35	176	E3/E3	N564H + c.2393_2401del9	3/1/1/0
Male	48	22.5	Yes (47)	275	247	250	25	154	E3/E3	1706-10 G>A	3/2/0/0
Female	63	28.3	No	365	251	326	39	202	E3/E3	P655L	1/1/1/0
Female	52	29.1	No	323	450	283	40	158	E3/E3	G701S	2/2/0/0
Male	40	24.5	No	310	203	277	33	213	E3/E3	c.2390-1G/C	1/0/4/0
Female	59	29.6	No	386	247	304	82	217	E3/E3	c.1359-3C>T	3/2/1/0
Male	32	29.1	No	292	219	265	27	201	E3/E4	Y419H	1/0/1/0
Male	51	29.1	No	387	636	323	64	212	E3/E3	1705+56C>T	2/0/1/0

*A further description of the LDLR mutations can be found at <http://www.ucl.ac.uk/ldlr>.

APO = apolipoprotein; BMI = body mass index; CVD = cardiovascular disease; HDL = high-density lipoprotein; LDLR = low-density lipoprotein receptor.

Table 3 Factors Associated With Presence of *LDLR* Mutations in Patients With Clinical Diagnosis of FCH

Variables in Univariate Logistic Regression Model	Odds Ratio (95% Confidence Interval)	p Value	Area Under the Curve in ROC Analysis
Gender, female versus male	2.194 (0.948-5.077)	0.067	0.593
Age, yrs	0.984 (0.948-1.021)	0.386	0.554
Waist circumference, cm	0.951 (0.910-0.993)	0.023	0.630
Diabetes mellitus, absence versus presence	17.1 (1.01-289)	0.002	—
CHD, absence versus presence	1.751 (0.557-5.502)	0.337	0.542
Total cholesterol, mg/dl	1.011 (1.004-1.018)	0.003	0.721
Ln triglycerides, mg/dl	0.083 (0.006-1.059)	0.055	0.615
Non-HDL-cholesterol, mg/dl	1.010 (1.003-1.017)	0.008	0.700
LDL-cholesterol, mg/dl	1.011 (1.003-1.020)	0.007	0.730
ApoB, mg/dl	1.027 (1.013-1.041)	0.000	0.735
Total cholesterol >95th percentile, yes versus no	4.795 (1.075-21.399)	0.040	0.599

CHD = coronary heart disease; Ln = natural logarithm; ROC = receiver-operator characteristic; other abbreviations as in Tables 1 and 2.

observed 1 to 3 proportion of negative- to defective-receptor alleles was similar to that reported for the overall Spanish FH population (24).

LDLR mutations are rare in subjects with mixed hyperlipidemia and diabetes. One important observation of our study is the striking difference in the frequency of type 2 diabetes mellitus between the groups with and without *LDLR* mutations. Clearly, FCH is closely linked with obesity, insulin resistance, and diabetes (25); and the presence of these meta-

bolic abnormalities coexisting with elevated blood cholesterol and triglycerides levels is highly predictive of the absence of *LDLR* defects in patients with combined hyperlipidemia.

APOE mutations. The results of *APOE* genotyping are interesting, inasmuch as 4 of 115 patients (3.5%) with a clinical diagnosis of FCH and no *LDLR* mutations had molecular defects in *APOE* that are characteristic of type III hyperlipidemia or dysbetalipoproteinemia, which also presents with combined hyperlipidemia overlapping that of

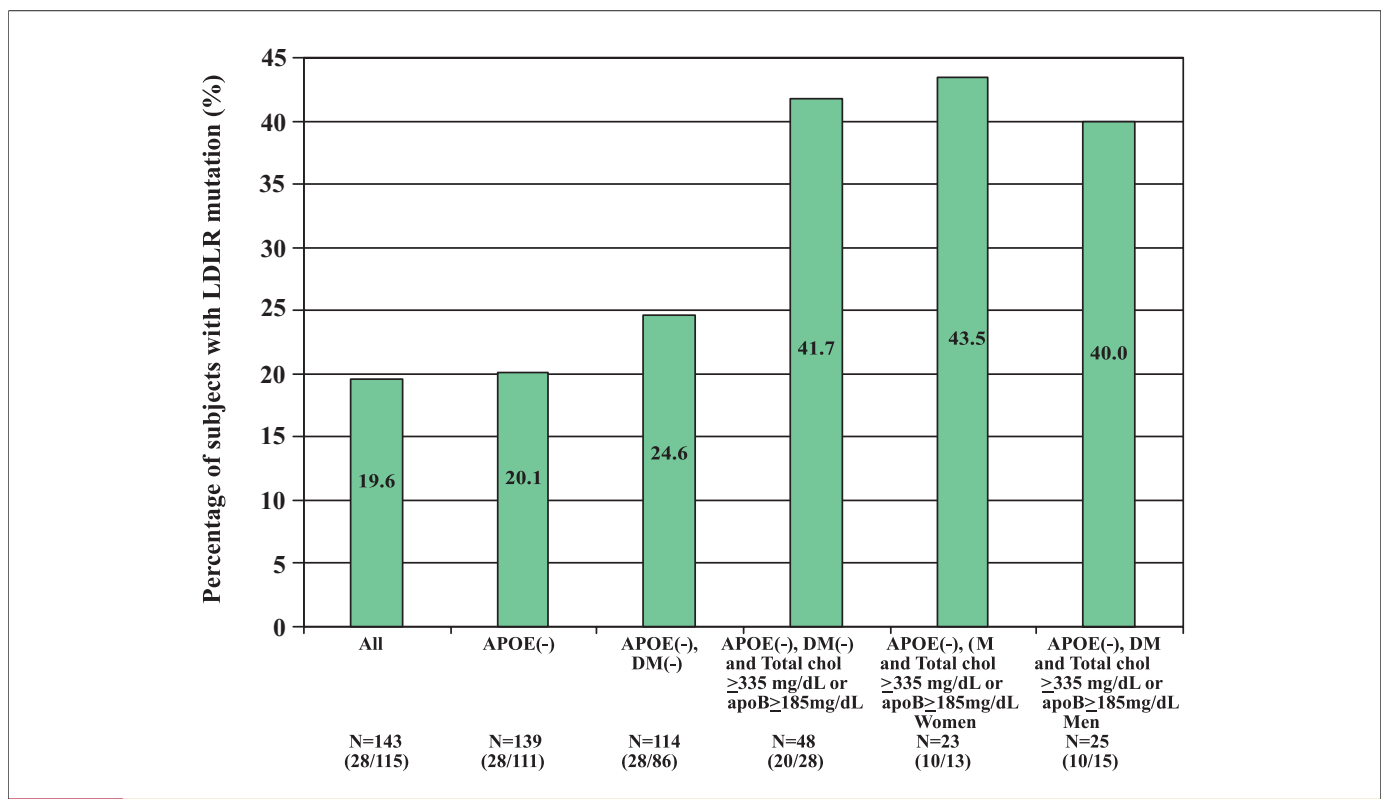


Figure 1 Percentage of Subjects With Clinical Diagnosis of FCH and With *LDLR* Mutation

Percentage of subjects with clinical diagnosis of familial combined hyperlipidemia (FCH) and with low-density lipoprotein receptor (*LDLR*) gene mutation. **Columns** represent the percentage in the whole group and in several subgroups. Subgroups have been defined according to the factors independently associated with the presence of *LDLR* mutation in the regression analysis. apoB = apolipoprotein B; *APOE*(-) = subjects without the *APOE* E2/E2 genotype or other rare *APOE* allele associated with hyperlipidemia; chol = cholesterol; DM(-) = subjects without diabetes mellitus.

FCH (21). These findings indicate that *APOE* genotyping is mandatory before a diagnosis of FCH is considered.

Strengths and limitations. This study has the strengths of a cross-sectional design in a sizeable cohort of FCH patients defined by strict clinical criteria and assessed for *LDLR* defects with up-to-date techniques of molecular testing. There are also limitations to our study. One limitation is that we did not perform family studies to examine segregation and genotype–phenotype interactions of the detected *LDLR* mutations. Another limitation is that the observed frequency of *LDLR* defects may not be extrapolated to other FCH cohorts showing less severe lipid phenotypes. The present series has an inherent selection bias toward more severe lipid abnormalities and may not be representative of FCH patients within the general population because patients are referred to our lipid clinics mainly by general practitioners because of severe dyslipidemia or refractoriness to hypolipidemic treatment. The frequency of *LDLR* mutations in FCH patients with milder lipid phenotypes is probably lower than that reported here. An alternative explanation for the relatively high frequency of *LDLR* mutations in our FCH patients could be that the genetic defects were not pathogenic. However, this is highly improbable for several reasons: most of the detected *LDLR* defects have been previously reported as causative mutations in FH; some of them generate truncated proteins and/or their deleterious effects have been confirmed “in vitro”; the loss of receptor function has been demonstrated in family studies for many of them; and none of the mutations found have been observed in normolipidemic populations.

Conclusions

Two important conclusions can be derived from this work. First, pending the availability of a genetic or biochemical marker for a reliable diagnosis of FCH, the exclusion of *LDLR* gene defects is highly recommended for patients with this clinical diagnosis who present with severe elevations of total cholesterol or apoB levels. This exclusion could be particularly important for research purposes and to limit the heterogeneity observed in many biochemical and genetic studies of FCH cohorts. Second, the diagnostic criteria for FH should not exclude patients with combined hyperlipidemia. In this situation, the total cholesterol or apoB level might be a better diagnostic tool than LDL-cholesterol, and values above 335 or 185 mg/dl, respectively, should raise the suspicion of FH and prompt a search for *LDLR* mutations.

Reprint requests and correspondence: Dr. Fernando Civeira, Hospital Universitario Miguel Servet, Avda. Isabel La Católica 1-3, Zaragoza 50009, Spain. E-mail: civeira@unizar.es.

REFERENCES

- Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, NY: McGraw-Hill, 2001:2863–913.
- Kwiterovich PO Jr., Fredrickson DS, Levy RI. Familial hypercholesterolemia (one form of familial type II hyperlipoproteinemia). A study of its biochemical, genetic and clinical presentation in childhood. *J Clin Invest* 1974;53:1237–49.
- Alonso R, Castillo S, Civeira F, et al. [Heterozygous familial hypercholesterolemia in Spain. Description of 819 non related cases.] *Med Clin (Barc)* 2002;118:487–92.
- Bujo H, Takahashi K, Saito Y, et al. Clinical features of familial hypercholesterolemia in Japan in a database from 1996–1998 by the Research Committee of the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. *J Atheroscler Thromb* 2004;11:146–51.
- Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1973;52:1544–68.
- Defesche J. Familial hypercholesterolemia. In: Betteridge J, editor. *Lipids and Vascular Disease*. London: Martin Dunitz, 2000;6:65–76.
- Williams RR, Hunt SC, Schumacher MC, et al. Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *Am J Cardiol* 1993;72:171–6.
- Veerkamp MJ, de Graaf J, Hendriks JC, Demacker PN, Stalenhoef AF. Nomogram to diagnose familial combined hyperlipidemia on the basis of results of a 5-year follow-up study. *Circulation* 2004;109:2980–5.
- Descamps OS, Leysen X, Van Leuven F, Heller FR. The use of Achilles tendon ultrasonography for the diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2001;157:514–8.
- Civeira F, Castillo S, Alonso R, et al. Tendon xanthomas in familial hypercholesterolemia are associated with cardiovascular risk independently of the low-density lipoprotein receptor gene mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1960–5.
- Neil HA, Huxley RR, Hawkins MM, et al. Comparison of the risk of fatal coronary heart disease in treated xanthomatous and nonxanthomatous heterozygous familial hypercholesterolemia: a prospective registry study. *Atherosclerosis* 2003;170:73–8.
- Wu LL, Hopkins PN, Xin Y, et al. Co-segregation of elevated LDL with a novel mutation (D92K) of the LDL receptor in a kindred with multiple lipoprotein abnormalities. *J Hum Genet* 2000;45:154–8.
- Gomez-Gerique JA, Gutierrez-Fuentes JA, Montoya MT, et al. Lipid profile of the Spanish population: the DRECE (Diet and Risk of Cardiovascular Disease in Spain) study. DRECE Study Group. *Med Clin (Barc)* 1999;113:730–5.
- Junyent M, Gilibert R, Zambón D, et al. The use of Achilles tendon sonography to distinguish familial hypercholesterolemia from other genetic dyslipidemias. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2203–8.
- Tejedor D, Castillo S, Mozas P, et al. Reliable low-density DNA array based on allele-specific probes for detection of 118 mutations causing familial hypercholesterolemia. *Clin Chem* 2005;51:1137–44.
- Tejedor D, Castillo S, Mozas P, et al. Comparison of DNA array platform vs. DNA sequencing as genetic diagnosis tools for familial hypercholesterolemia. *Clin Chem* 2006;52:1971–2.
- Heath K, Day IN, Humpries SE. Universal primer quantitative fluorescent multiplex (UPQFM) PCR: a method to detect major and minor rearrangements of the low density lipoprotein receptor gene. *J Med Genet* 2000;37:272–80.
- Faivre L, Saugier-Verber P, Pais de Barros JP, et al. Variable expressivity of the clinical and biochemical phenotype associated with the apolipoprotein E p.Leu149del mutation. *Eur J Hum Genet* 2005;13:1186–91.
- Pocovi M, Cenarro A, Civeira F, et al. Incomplete dominance of type III hyperlipoproteinemia is associated with the rare apolipoprotein E2 (Arg136->Ser) variant in multigenerational pedigree studies. *Atherosclerosis* 1996;122:33–46.
- Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. Different combinations of cysteine-rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins. *J Biol Chem* 1989;264:21682–8.
- Carmena R, Roy M, Roederer G, Minnich A, Davignon J. Coexisting dysbetalipoproteinemia and familial hypercholesterolemia. Clinical and laboratory observations. *Atherosclerosis* 2000;148:113–24.

22. Talmud PJ. Genetic determinants of plasma triglycerides: impact of rare and common mutations. *Curr Atheroscler Rep* 2001;3:191–9.
23. Wittekoek ME, Moll E, Pimstone SN, et al. A frequent mutation in the lipoprotein lipase gene (D9N) deteriorates the biochemical and clinical phenotype of familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2708–13.
24. Pocovi M, Civeira F, Alonso R, Mata P. Familial hypercholesterolemia in Spain: case-finding program, clinical and genetic aspects. *Semin Vasc Med* 2004;4:67–74.
25. Carr MC, Brunzell JD. Abdominal obesity and dyslipidemia in the metabolic syndrome: importance of type 2 diabetes and familial

combined hyperlipidemia in coronary artery disease risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2601–7.

Key Words: familial combined hyperlipidemia ■ familial hypercholesterolemia ■ LDLR mutations.

 **APPENDIX**

For a supplemental table on the description of the *LDLR* mutations found in subjects with mixed hyperlipidemia, please see the online version of this article.

Online Appendix for the following November 4 JACC article

TITLE: Frequency of Low-Density Lipoprotein Receptor Gene Mutations in Patients With a Clinical Diagnosis of Familial Combined Hyperlipidemia in a Clinical Setting

AUTHORS: Fernando Civeira, MD, PHD, Estibaliz Jarauta, MD, Ana Cenarro, PHD, Angel L. García-Otín, PHD, Diego Tejedor, PHD, Daniel Zambón, MD, PHD, Miguel Mallen, BSc, Emilio Ros, MD, PHD, Miguel Pocoví, PHD

APPENDIX

Supplemental Table Description of the *LDLR* Mutations Found in Subjects With Mixed Hyperlipidemia

<i>LDLR</i> Mutation Nomenclature	Protein Change	Nomenclature as Published	<i>LDLR</i> Location	Allele Type	Predicted Effect	Supplemental References
-135C>G		-42C>G	Promoter	Defective	5-15% LDLR activity in homozygotes	1,2
91G>T	Glu31X	E10X	Exon 1	Negative	Truncated peptide	3
91G>T/1061-8T>C/2177C>T	Glu31X	E10X/1061-8T>C/2177C>T	Exon 1+ Intron 7 + Exon 15	Negative	Truncated peptide	3,4
283T>G/1587-1G>C	Cys95Gly	C74G + 1587-1G>C	Exon 3 + Intron 10	Defective	LDL binding defect for Cys95Gly and splicing mutation for 1587-1G>C	5
313+1_313+2insT		313+1insT	Intron 3	Undetermined	Splicing mutation	4
313+1G>A			Intron 3	Undetermined	Splicing mutation	6
502G>A	Asp168Asn	D147N	Exon 4	Defective	LDL binding defect	7
518delG	Cys173SerfsX33	518delG	Exon 4	Negative	Truncated peptide	3
829G>A	Glu277Lys	E256K	Exon 6	Defective	Little effect on LDLR activity	8
941-39C>T		941-39 C/T	Intron 6	Undetermined	Splicing mutation	2
1061-8T>C/2177C>T	Thr726Ile	1061-8T>C + T705I	Intron 7 + Exon 15	Defective	Unlikely to affect splicing for 1061-8T>C and 15-30% LDLR activity for 2177C>T	9

1133A>C	Gln378Pro	Q357P	Exon 8	Defective	LDL binding defect	10.2
1255 T>C	Tyr419His	Y398H	Exon 9	Defective	LDL binding defect	Not previously reported
1359-3C>T		1359-3C>T	Intron 9	Undetermined	Splicing mutation	Not previously reported
1361C>A	Thr454Asn	T433N	Exon 10	Defective	Epidermal growth factor spacer defect	2
1618G>A	Ala540Thr	A519T	Exon 11	Defective	Epidermal growth factor spacer defect	11,2
1690A>C/2393_2401del	Asn564His/ Leu799_Phe801del	N543H + 2393del 9	Exons 11+ 17	Defective	LDLR activity 20% in homozygotes with 2393_2401del9	12,13
1705+56C>T		1705+56C>T	Intron 11	Undetermined	Splicing mutation	14
1706-10 G>A		1706-10 G>A	Intron 11	Undetermined	Splicing mutation	5
1965C>G	Phe655Leu	F634L	Exon 13	Defective	Epidermal growth factor spacer defect	15
2101G>A	Gly701Ser	G680S	Exon 14	Defective	Epidermal growth factor spacer defect	16
2390-1G/C		2390-1G/C	Intron 16	Undetermined	Splicing mutation	5

LDL = low density lipoprotein; LDLR = low-density lipoprotein receptor.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

1. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445–66.
2. Mozas P, Castillo S, Tejedor D, et al. Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain: identification of 39 novel and 77 recurrent mutations in LDLR. *Hum Mutat* 2004;24:187.
3. Cenarro A, Jensen HK, Civeira F, et al. Two novel mutations in the LDL receptor gene: common causes of familial hypercholesterolemia in a Spanish population. *Clin Genet* 1996;49:180–5.
4. Mozas P, Cenarro A, Civeira F, Castillo S, Ros E, Pocovi M. Mutation analysis in 36 unrelated Spanish subjects with familial hypercholesterolemia: identification of 3 novel mutations in the LDL receptor gene. *Hum Mutat* 2000;15:483–4.
5. Cenarro A, Jensen HK, Casao E, et al. Identification of recurrent and novel mutations in the LDL receptor gene in Spanish patients with familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1998;11:413.
6. Leren TP, Solberg K, Radningen OK, Tonstad S, Ose L. Two founder mutations in the LDL receptor gene in Norwegian familial hypercholesterolemia subjects. *Atherosclerosis* 1994;111:175–82.
7. Day IN, Whittall RA, O'Dell SD, et al. Spectrum of LDL receptor gene mutations in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1997;10:116–27.

8. Pereira E, Ferreira R, Hermelin B, et al. Recurrent and novel LDL receptor gene mutations causing heterozygous familial hypercholesterolemia in La Habana. *Hum Genet* 1995;96:319–22.
9. Jensen HK, Jensen LG, Hansen PS, Faergeman O, Gregersen N. High sensitivity of the single-strand conformation polymorphism method for detecting sequence variations in the low-density lipoprotein receptor gene validated by DNA sequencing. *Clin Chem* 1996;42:1140–6.
10. Callis M, Jansen S, Thiaart R, de Villiers JN, Raal FJ, Kotze MJ. Mutation analysis in familial hypercholesterolemia patients of different ancestries: identification of three novel LDLR gene mutations. *Mol Cell Probes* 1998;12:149–52.
11. Sun XM, Patel DD, Knight BL, Soutar AK. Comparison of the genetic defect with LDL-receptor activity in cultured cells from patients with a clinical diagnosis of heterozygous familial hypercholesterolemia. The Familial Hypercholesterolaemia Regression Study Group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3092–101.
12. Tricot-Guerber F, Saint-Jore B, Valenti K, Foulon T, Bost M, Hadjian AJ. Identification of a mutation, N543H, in exon 11 of the low-density lipoprotein receptor gene in a French family with familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1995;6:87–8.
13. Jensen HK, Jensen TG, Faergeman O, et al. Two mutations in the same low-density lipoprotein receptor allele act in synergy to reduce receptor function in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1997;9:437–44.
14. Amsellem S, Briffaut D, Carrie A, et al. Intronic mutations outside of Alu-repeat-rich domains of the LDL receptor gene are a cause of familial hypercholesterolemia. *Hum Genet* 2002;111:501–10.

15. Cenarro A, Jensen HK, Casao E, et al. Identification of a novel mutation in exon 13 of the LDL receptor gene causing familial hypercholesterolemia in two Spanish families. *Biochim Biophys Acta* 1996;1316:1–4.
16. Fouchier SW, Kastelein JJ, Defesche JC. Update of the molecular basis of familial hypercholesterolemia in the Netherlands. *Hum Mutat* 2005;26:550–6.



Impact of low-density lipoprotein receptor mutational class on carotid atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolemia

Mireia Junyent^{a,b}, Rosa Gilabert^c, Estíbaliz Jarauta^d, Isabel Núñez^{b,c}, Montserrat Cofán^{a,b}, Fernando Civeira^d, Miguel Pocoví^{e,f}, Miguel Mallén^{e,f}, Daniel Zambón^{a,b}, Fátima Almagro^g, Juan Vega^h, Diego Tejedorⁱ, Emilio Ros^{a,b,*}

^a Unitat de Lípids, Servei d'Endocrinologia, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic, Villarroel 160, 08036 Barcelona, Spain

^b CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spain

^c CDI, IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

^d Lipid Clinic and Laboratorio de Investigación Molecular, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain

^e Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

^f CIBER Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Spain

^g Servicio de Medicina Interna, Hospital Donostia, San Sebastián, Spain

^h Servicio de Radiología, Hospital Donostia, San Sebastián, Spain

ⁱ Progenika Biopharma S.A., Derio, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 May 2009

Received in revised form 23 July 2009

Accepted 31 July 2009

Available online 8 August 2009

Keywords:

Familial hypercholesterolemia
Low-density lipoprotein receptor mutations
Carotid atherosclerosis
Intima-media thickness
Atheroma plaques

ABSTRACT

Background and objectives: Defects in the low-density lipoprotein receptor (*LDLR*) gene cause familial hypercholesterolemia (FH), a highly atherogenic condition. The effect of different *LDLR* mutations on coronary heart disease (CHD) risk is insufficiently defined. We assessed carotid intima-media thickness (IMT), a surrogate marker of CHD, in relation to *LDLR* mutational class in FH.

Methods: In 436 Spanish FH patients (223 men and 213 women, age 44 ± 14 years) with known *LDLR* mutations, alleles were classified by standard criteria as null ($n = 269$), defective ($n = 162$), or undetermined ($n = 5$). *LDLR* defects were detected using a microarray (Lipochip[®]) designed to uncover prevalent mutations in Spain and gene sequencing when no mutations were detected. Carotid IMT and plaque were assessed in FH patients and 268 healthy subjects.

Results: All carotid measurements were increased in FH patients versus controls ($p < 0.05$), irrespective of genotype. After adjustment for gender and age, patients with null alleles compared with defective alleles had similar mean and maximum common carotid artery (CCA) IMT, but higher maximum IMT at any carotid segment, with median values (95% confidence interval) of 1.25 mm (1.19–1.31) and 1.11 mm (1.05–1.18), respectively. Multivariate analysis showed that null alleles were independently associated with maximum CCA-IMT ($\beta = 0.09$, $p = 0.033$) with an impact similar to that of gender ($\beta = 0.10$, $p = 0.035$).

Conclusions: FH patients show advanced carotid atherosclerosis in relation to *LDLR* mutational class. The findings support the utility of genetic testing in FH beyond providing a secure diagnosis.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant disorder characterized by lifelong elevation of LDL-cholesterol concentrations, tendon xanthomas, and early-onset of coronary heart disease (CHD) [1]. The underlying molecular defect consists of mutations in the gene encoding for the LDL receptor (*LDLR*) pro-

tein. Detection of functional mutations of the *LDLR* gene provides an unequivocal diagnosis of the condition [2].

Despite its strong genetic background, FH shows a great variability in phenotypic expression in terms of the lipid profile, frequency of xanthomas, and onset and severity of CHD [1,3,4]. To date, more than 1000 *LDLR* mutations have been reported [5] (<http://www.ucl.ac.uk/ldlr/Current>), and differences between null allele and defective allele mutations have been found for the lipid phenotype, response to statins, and CHD risk, as reviewed up to 2004 [4] and confirmed by more recent reports of large series of molecularly diagnosed FH children [6,7] and adults [7–10]. Regarding the association between *LDLR* mutation type and CHD risk, most studies reviewed by Austin et al. [4] involved small patient groups.

* Corresponding author at: Unitat de Lípids, Servei d'Endocrinologia, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic, Villarroel 160, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932279383; fax: +34 934537829.
E-mail address: eros@clinic.ub.es (E. Ros).

Recent reports of large series of molecularly diagnosed FH patients from different geographical locations have provided inconsistent results, as both null [7,9] and positive associations [8,10] have been described.

Sonographically defined carotid intima-media thickness (IMT) is a well-established surrogate marker for cardiovascular risk [11] that was shown to be significantly higher in FH patients than in both age- and sex-matched normolipidemic [12,13] and hypercholesterolemic [14,15] controls. In FH, IMT was associated with family history of early-onset CHD [15], presence of CHD [16,17], and lipoprotein concentrations [13,15,16,18]. Carotid IMT was categorized by the type of *LDLR* defect in two studies of 79 [13] and 122 [14] FH adults and one study of 193 FH children [6]. A trend towards an increased unadjusted IMT was reported in FH patients carrying null alleles compared to those with defective alleles [13,14], while FH children with null alleles had significantly higher IMT than those with defective alleles, independently of LDL-cholesterol levels [6]. Carotid plaque burden was evaluated in one study [13] and found to be unrelated to *LDLR* mutational class. Thus, similarly to its influence on CHD risk [7–10], the effect of mutation severity on carotid atherosclerosis is insufficiently defined.

In a study of 146 adult FH patients, we recently showed that femoral IMT is increased in relation to mutational class [19]. We hypothesized that a similar association would be detected for carotid IMT in a sufficiently powered study. Thus, we evaluated both carotid IMT and plaque in 436 FH patients carrying functional *LDLR* mutations.

2. Methods

2.1. Subjects

In a cross-sectional study, 436 consecutive patients (223 men and 213 women, mean age 44 ± 14 years) with a molecular diagnosis of FH underwent carotid ultrasound according to a predefined protocol in three Lipid Clinics in Northern Spain during a 5-year period (March 2003 to April 2008). All patients were referred by primary care physicians to their reference Lipid Clinic for diagnosis of severe hypercholesterolemia and were recruited at Hospital Miguel Servet in Zaragoza ($n = 180$), Hospital Clinic in Barcelona ($n = 174$), and Hospital Donostia in San Sebastian ($n = 82$). The FH series from Barcelona includes 146 patients previously reported in relation to ultrasound-assessed femoral atherosclerosis [19]. During the same period, 268 healthy control subjects, recruited from hospital personnel and lists of primary health physicians, had carotid sonography performed at the Barcelona centre. All participants provided informed consent to the study, which was approved by the ethical review boards of each participating hospital.

2.2. Clinical and laboratory characteristics

All study subjects were assessed for family history of early-onset CHD, clinical history, medication use, anthropometric characteristics, cardiovascular risk factors, and tendon xanthomas. In asymptomatic subjects, fasting blood for baseline biochemical profiles was drawn after at least 4 weeks without hypolipidemic drug treatment. In patients with prior CHD, baseline lipid values were obtained from clinical records. Treatment of FH patients with statins may induce regression of carotid IMT [6,20]. As described by Hoeg et al. [21], the cholesterol \times years score (CYS), the sum of average on-treatment and off-treatment cholesterol levels for the lifetime of each subject, provides an estimation of overall exposure to elevated blood cholesterol in FH, thus accounting for the effects of prior lipid-lowering therapy. We calculated CYS for each patient and used this variable to adjust IMT for assessment of the effects of other covariates. See Supplementary file for further details.

2.3. Molecular testing

Patients with clinical FH were submitted to DNA testing for identification of *LDLR* mutations following a standard protocol, as described [22,23]. Mutation nomenclature followed Human Genome Variation Society recommendations (<http://www.hgvs.org>). DNA was screened for *LDLR* gene defects by using a microarray (Lipochip[®], Progenika Biopharma, Derio, Spain) designed to detect prevalent mutations in the Spanish population, which is periodically updated as new mutations are identified [24]. When no mutations were detected, the *LDLR* gene was sequenced to search for mutations not included in the microarray design. Lipochip[®] can also detect 3 common mutations of the *APOB* gene and 6 gain-of-function mutations of the *PCSK9* gene. *APOB* defects were not considered in this report and thus far *PCSK9* mutations have not been detected with this microarray in Spain.

Functional *LDLR* mutations may be classified into different types based on biosynthetic and functional studies of fibroblast cell strains [1]. For the purpose of this study, we classified mutations into 3 groups: (1) null alleles, namely, disruptions of the promoter sequence, large rearrangements, nonsense, frameshift, or mutations resulting in a deletion of the translation initiation signal and early stop codons, which result in no protein synthesis; (2) defective alleles, that is, transcription and missense defects that do not completely suppress the function of the protein, which has residual receptor activity; and (3) undetermined alleles, which are intronic variations with an unknown effect on protein function. As recently reported by Holla et al. [25], many *LDLR* intronic variations are predicted to be deleterious by *in silico* splice tools, and wet-lab analyses confirm pre-mRNA splicing alterations with exon skipping, intron inclusion, or activation of a cryptic splice site severely affecting function (i.e., null alleles). We applied bioinformatic tools to predict splicing alterations in 9 intronic variations and considered those for which the results of computational analyses were consistent as null alleles (see Supplementary Table 1).

The identified *LDLR* defects are listed in Supplementary Table 2. A total of 113 different mutations were detected in 436 patients, resulting in 269 null alleles, 162 defective alleles, and 5 undetermined alleles. Because of their small number, undetermined alleles are not further considered for phenotype comparisons among alleles of different severity.

2.4. Carotid ultrasonography

A standardized imaging protocol was used for the IMT measurements, as described [18]. Main outcome measurements were mean and maximum common carotid artery IMT (maxCCA-IMT), maximum carotid IMT at any carotid segment (maxCIMT), and frequency of plaques. See Supplementary file for technical details.

2.5. Statistical analyses

Data are presented as means \pm SD for non-adjusted continuous variables, medians (95% confidence intervals) for adjusted variables, and frequencies for categorical variables. Continuous variables with a skewed distribution, such as lipoprotein(a) levels, CYS and IMT, were log-transformed (Ln) for analyses. Differences in mean values were assessed by using analysis of variance (ANOVA or ANCOVA, as appropriate) with post hoc Bonferroni multiple comparisons, or the *U*-Mann–Whitney test, as appropriate. Categorical variables were compared by using the chi-square test. Pearson correlation coefficients were constructed to test for relationships between continuous variables, which were log-transformed when appropriate. Because carotid atherosclerosis is strongly related to age and shows gender differences, IMT was adjusted for these factors for between-allele comparisons. We used stepwise multiple

Table 1

Clinical characteristics and lipid profiles in patients with a molecular diagnosis of FH and in control subjects.

Characteristics	FH (n=436)	Control subjects (n=268)
Age in years, mean (range) [†]	44 (18–82)	49 (20–81)
Male gender, n (%)	223 (51)	140 (52)
Clinical variables, n (%)		
Family history of early-onset CHD [*]	198 (47)	24 (9)
Prior CHD [*]	60 (14)	0
Ever smoked [*]	193 (44)	81 (30)
Tendon xanthomas [*]	207 (48)	0
Body mass index (kg/m ²)	25.3 ± 4.0	25.4 ± 3.8
Hypertension, n (%) [†]	68 (16)	24 (9)
Systolic blood pressure (mmHg) [*]	127 ± 17	121 ± 13
Diastolic blood pressure (mmHg)	76 ± 10	76 ± 10
Diabetes mellitus, n (%) [†]	8 (2)	0
Serum lipids (mg/dl)		
Total cholesterol	381 ± 73	204 ± 31
LDL-cholesterol [†]	302 ± 71	130 ± 26
HDL-cholesterol [†]	52 ± 14	57 ± 14
Triglycerides [*]	117 ± 63	92 ± 36
Total cholesterol/HDL ratio [*]	7.9 ± 2.5	3.8 ± 0.9
Lipoprotein(a) (mg/dl) (n=410, n=174) ^a	24.0 (10.0–55.0)	11.0 (7.0–28.8)
Cholesterol × years score (× 10 ⁻³)	15.4 (11.5–20.0)	–

Values are means ± SD except for lipoprotein(a) and cholesterol × years score (median and interquartile range) or when stated otherwise. CHD indicates coronary heart disease.

^{*} p < 0.001 for between-group differences.

[†] p < 0.01 for between-group differences.

^a Numbers of measurements available for cases and controls, respectively, are shown in parentheses where values were missing.

regression analyses to test the influence of various confounders on IMT. SPSS software (version 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL) was used for statistical analyses, with significance set at p < 0.05.

3. Results

3.1. Clinical features and lipid profiles

Of the 436 FH patients, 376 were asymptomatic and 60 had a documented history of CHD (45 myocardial infarction and 15 angina). Table 1 shows the clinical characteristics and lipid concentrations of the FH and control groups. Predictably, FH subjects showed a higher number and potency of cardiovascular risk factors than healthy controls.

At the time of carotid ultrasound, 86 patients were treatment-naïve and 350 patients (80%) had been treated previously with lipid-lowering drugs (348 statins, 2 resins alone, 136 combination treatment with ezetimibe, 55 combination treatment with resins or fibrates, and 26 triple therapy) for a median period of 6 years (range, 6 months to 27 years). Those treated with statins had received an average daily dose equivalent to 40 mg simvastatin (range, 10–160 mg).

Table 3

Carotid IMT adjusted by gender and age and plaque frequency in patients with FH by genotype and healthy controls.

Variables	Null alleles (n=269)	Defective alleles (n=162)	Healthy controls (n=268)
Mean CCA-IMT (mm) [*]	0.70 (0.68–0.71) ^a	0.68 (0.66–0.70) ^a	0.61 (0.59–0.62) ^b
Maximum CCA-IMT (mm) [*]	0.85 (0.83–0.87) ^a	0.82 (0.79–0.84) ^a	0.73 (0.71–0.74) ^b
Maximum carotid IMT (mm) [*]	1.25 (1.19–1.31) ^a	1.11 (1.05–1.18) ^b	0.79 (0.75–0.82) ^c
Presence of plaques, n (%) [†]	149 (55)	76 (47)	75 (28)

Values are adjusted medians (95% confidence intervals).

CCA, Common carotid artery.

Statistical analyses made after log-transformation, with data shown as anti-logarithm.

^{*} p < 0.05 by ANCOVA. Values within a row with different superscript letters are significantly different (p < 0.05 by Bonferroni post hoc test).

[†] p < 0.001 by chi-square test (p = 0.088 for between-allele differences).

Table 2

Clinical characteristics and lipid profiles of FH patients depending on LDLR mutational class.

Characteristics	Null alleles (n=269)	Defective alleles (n=162)
Age in years, mean (range)	43 (18–82)	46 (18–79)
Male gender, n (%)	134 (50)	76 (52)
Clinical variables, n (%)		
Family history of CHD	118 (45)	76 (48)
Prior CHD	42 (16)	17 (11)
Ever smoked	116 (43)	76 (47)
Tendon xanthomas [*]	140 (52)	64 (40)
Body mass index (kg/m ²)	25.1 ± 4.0	25.6 ± 4.0
Hypertension, n (%)	42 (16)	24 (15)
Systolic blood pressure (mmHg)	126 ± 17	128 ± 15
Diastolic blood pressure (mmHg)	76 ± 11	77 ± 9
Diabetes mellitus, n (%)	5 (2)	3 (2)
Serum lipids (mg/dl)		
Total cholesterol [†]	393 ± 76	361 ± 60
LDL-cholesterol [†]	314 ± 73	282 ± 61
HDL-cholesterol	52 ± 14	52 ± 14
Triglycerides	118 ± 61	116 ± 67
Total cholesterol/HDL ratio [*]	8.1 ± 2.5	7.4 ± 2.3
Lipoprotein(a) (mg/dl) (n=252, n=153) ^a	22.0 (10.0–51.4)	30.0 (10.7–60.9)
Prior statin treatment, n (%)	217 (81)	128 (79)
Cholesterol × years score (× 10 ⁻³)	15.2 (11.1–20.3)	15.5 (11.8–19.5)

Values are means ± SD except for lipoprotein(a) and cholesterol × years score (median and interquartile range) or when stated otherwise. CHD indicates coronary heart disease.

^{*} p < 0.05 for between-group differences.

[†] p < 0.001 for between-group differences.

^a Numbers of measurements available for null and defective alleles, respectively, are shown in parentheses where values were missing.

The characteristics of FH groups by LDLR mutational class are shown in Table 2. The two groups had similar demographic and anthropometric characteristics, family or personal history of CHD, and blood pressure. The null allele genotype showed a higher frequency of tendon xanthomas and a more severe lipid phenotype than the defective allele one, with higher total cholesterol, LDL-cholesterol and cholesterol/HDL ratios.

3.2. Carotid IMT and plaque frequency

Table 3 shows that FH patients had higher adjusted IMT values and plaque frequency than controls, irrespective of genotype. Patients with null alleles compared to those with defective alleles displayed similar values of adjusted mean and maxCCA-IMT but higher maxCIMT. Null alleles tended to have a higher frequency of plaques than defective alleles.

Besides the predictable correlations with age, the three IMT outcomes of both FH patients considered as a single group and controls correlated significantly (p < 0.05) with the variables BMI, systolic and diastolic blood pressure, fasting blood glucose, total and LDL-cholesterol, and Ln CYS. Triglycerides and the cholesterol/HDL ratio

Table 4
Independent associations of Ln carotid IMT by stepwise multiple regression analysis.

FH with all mutations except 5 undetermined alleles (n = 431)					
Dependent variable	Variables	B	β	p	Adjusted R ²
Ln mean CCA-IMT	Constant	-0.98		<0.001	0.323
	Age \times 10 years	0.08	0.49	<0.001	
	Smoking	0.08	0.17	<0.001	
	Gender (female)	-0.06	0.12	0.006	
	Systolic BP (\times 10 mmHg)	0.02	0.12	0.013	
Ln maxCCA-IMT	Constant	-0.77		<0.001	0.285
	Age \times 10 years	0.08	0.47	<0.001	
	Smoking	0.07	0.15	0.001	
	Body mass index	0.01	0.12	0.014	
	Null allele	0.05	0.09	0.033	
	Gender (female)	-0.05	-0.10	0.035	
Ln maxCIMT	Constant	-0.85		<0.001	0.364
	Age \times 10 years	0.17	0.51	<0.001	
	Cholesterol/HDL ratio	0.02	0.12	0.007	
	Smoking	0.12	0.13	0.002	
	Tendon xanthomas	0.11	0.12	0.007	
	Gender (female)	-0.11	-0.12	0.009	

CCA, Common carotid artery; maxCIMT, maximum IMT at any carotid segment; BP, blood pressure.

Variables allowed to enter the models were age, sex, tendon xanthomas, smoking, BMI, systolic BP, fasting blood glucose, LDL-cholesterol, triglycerides, cholesterol/HDL ratio, Ln lipoprotein(a), Ln CYS, and mutational class. Ln lipoprotein(a) showed insignificant associations in all models, a reason why it was excluded from the final analyses to avoid the loss of data from patients with missing values.

correlated to all IMT measurements only in the FH group. HDL-cholesterol correlated (negatively) with maxCIMT only in FH. Ln lipoprotein(a) showed no significant correlations with IMT in either group.

3.3. Predictors of carotid IMT by multivariate analyses

After adjustment for various confounders (Table 4), independent associations of mean CCA-IMT by stepwise multiple regression analysis in 431 FH patients (undetermined alleles excluded) were age, smoking, gender (negative for women), and systolic blood pressure, in this order (adjusted R² = 0.323). When maxCCA-IMT was the dependent variable, the factors independently associated were age, smoking, BMI, the null allele genotype and gender, explaining together 28.5% of its variability. Finally, age, the cholesterol/HDL ratio, smoking, tendon xanthomas and gender were independent associations of maxCIMT (adjusted R² = 0.364). The null allele genotype barely failed to enter the equations of mean CCA-IMT and maxCIMT (β = 0.08, p = 0.071 and β = 0.07, p = 0.079, respectively).

4. Discussion

The major novel finding of this study is that adults with a molecular diagnosis of FH characterized by null allele (receptor-negative) mutations of the *LDLR* gene show a more severe clinical phenotype and worse advanced carotid atherosclerosis than those with receptor-defective mutations, independently of age, gender, lipid and nonlipid risk factors, and the CYS. Inasmuch as sonographically assessed carotid atherosclerosis is an intermediate marker that has predictive value of future CHD events [11,26], these findings have implications for the diagnosis and management of FH. They also support the utility of obtaining a molecular diagnosis in FH patients.

Studies in FH cohorts genetically heterogeneous like the present one have shown that *LDLR* null allele variants are associated with more severe lipid phenotypes than receptor-defective mutations [4,6–10], but associations with CHD risk have been inconsistent [4,7–10]. Probably because of lack of statistical power, no clear associations of *LDLR* genotype with unadjusted IMT were detected in two small studies in FH adults [13,14], while Koeijvoets et al. [6] found significant differences in adjusted IMT between children

carriers of null alleles and receptor-defective alleles. Our results in a large series of FH adults are in line with the findings in children. However, mean carotid IMT, a measure of early atherosclerosis, was reported to differ between mutational classes in the Dutch study [6], while we found significant differences for maxCIMT (Table 3), which is a measure of advanced disease. This is plausible, given the age-related progression of atherosclerosis [27]. Thus, early stages of atherosclerosis in children (fatty streaks) would translate into higher mean IMT, while adults with long-life elevation of blood cholesterol would have more advanced disease (raised lesions), as shown by elevated maxCCA-IMT and maxCIMT. Notably, by multivariate analysis the null allele genotype was independently associated with maxCCA-IMT with potency similar to that of gender (Table 4). We recently reported similar findings in the femoral arteries of a smaller cohort of FH adults [19], thus attesting to the paradigm of atherosclerosis as a systemic disease similarly affecting different arterial beds. Therefore, it appears that comparable information on the severity of atherosclerosis is obtained from carotid and femoral sonography in FH.

The independent association of the null allele genotype with advanced carotid atherosclerosis suggests that factors other than the lipid phenotype and nonlipid risk factors are implicated in atherogenesis in this population. Lifelong, severely elevated LDL-cholesterol concentrations probably trigger other self-sustaining atherogenic mechanisms, such as inflammation and immune activation, which are enhanced in patients with more severe clinical phenotypes [28,29].

As recently underlined [30], obtaining a molecular diagnosis in patients with FH has clinical utility in providing an unequivocal diagnosis and in identifying affected relatives at an early age so that they can be offered lifestyle advice and appropriate lipid-lowering therapies. An important question is whether the genetic diagnosis of FH could help in the selection of patients at greater CHD risk among clinically indistinguishable patients, who therefore might need upgraded cholesterol-lowering treatment beyond conventional lipid targets. In agreement with prior data [6], the present results and those of our earlier study of femoral atherosclerosis [19] suggest that selection of null alleles might identify FH patients with the highest risk of atherosclerosis.

A limitation of our study is that the cohort is representative of FH patients who are referred for specialist care because of a severe

lipid phenotype, but not of those still undiagnosed within their families or the general population, who may have milder phenotypes and a lower risk for atherosclerosis [31]. Also, our classification of mutations within the functional categories may be subjected to error when no studies of residual receptor function are available. However, the allocation of genetic defects to functional classes in Supplementary Tables 1 and 2 is updated to present knowledge (<http://www.ucl.ac.uk/ldlr/Current> and 5, 25). The study also has strengths, such as the cross-sectional design in a large series of well-phenotyped FH patients carrying functional *LDLR* mutations.

In conclusion, molecularly defined FH patients show higher carotid IMT and plaque frequency than control subjects, and FH patients bearing null allele mutations of the *LDLR* gene have a more severe clinical phenotype and advanced carotid atherosclerosis than those carrying defective allele mutations. These findings support the usefulness of genetic testing in FH beyond providing an unequivocal diagnosis of the condition.

Conflicts of interest

None.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Health (RTIC G03/181, PI05/0075, PI05/0134, and PI06/0365) and Fundació Privada Catalana de Nutrició i Lípids, Barcelona, Spain. Mireia Junyent is supported by a Fulbright grant from the Spanish Ministry of Education and Science (reference 2007–1086). We thank Emili Corbella for expert statistical advice. CIBEROBN is an initiative of ISCIII, Spain.

Disclosures: Diego Tejedor is employed by Progenika Biopharma, the company that commercializes the microarray (Lipochip[®]) for genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia in Spain.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.07.058.

References

- Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 2863–913.
- Aalst-Cohen E, Jansen AC, Tanck M, et al. Diagnosing familial hypercholesterolemia: the relevance of genetic testing. *Eur Heart J* 2006;27:2240–6.
- Jansen AC, van Wissen S, Defesche JC, Kastelein JJ. Phenotypic variability in familial hypercholesterolemia: an update. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:165–71.
- Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease: a HuGE association. *Am J Epidemiol* 2004;160:421–9.
- Leigh SE, Foster AH, Whittall RA, Hubbard CS, Humphries SE. Update and analysis of the University College London low density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia database. *Ann Hum Genet* 2008;72:85–498.
- Koeijvoets KC, Rodenburg J, Hutten BA, Wiegman A, Kastelein JJ, Sijbrands EJ. Low-density lipoprotein receptor genotype and response to pravastatin in children with familial hypercholesterolemia. Substudy of an intima-media thickness trial. *Circulation* 2005;112:3168–73.
- Koeijvoets KC, Wiegman A, Rodenburg J, Defesche JC, Kastelein JJ, Sijbrands EJ. Effect of low-density lipoprotein receptor mutation on lipoproteins and cardiovascular disease risk: a parent-offspring study. *Atherosclerosis* 2005;180:93–9.
- Humphries SE, Whittall RA, Hubbard CS, et al. Genetic causes of familial hypercholesterolemia in patients in the UK: relation to plasma lipid levels and coronary heart disease risk. *J Med Genet* 2006;43:943–9.
- Souverain OW, Defesche JC, Zwiderman AH, Kastelein JJ, Tanck MW. Influence of LDL-receptor mutation type on age at first cardiovascular event in patients with familial hypercholesterolemia. *Eur Heart J* 2007;28:299–304.
- Alonso R, Mata N, Castillo S, et al. Cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia: influence of low-density lipoprotein receptor mutation type and classic risk factors. *Atherosclerosis* 2008;200:315–21.
- Bots ML, Baldassarre D, Simon A, et al. Carotid intima-media thickness and coronary atherosclerosis: weak or strong relations? *Eur Heart J* 2007;28:398–406.
- Wendelhag I, Wiklund O, Wikstrand J. Arterial wall thickness in familial hypercholesterolemia. Ultrasound measurement of intima-media thickness in the common carotid artery. *Arterioscler Thromb* 1992;12:70–7.
- Tonstad S, Joakimsen O, Stensland-Bugge E, Ose L, Bonna KH, Leren TP. Carotid intima-media thickness and plaque in patients with familial hypercholesterolemia mutations and control subjects. *Eur J Clin Invest* 1998;28:971–9.
- Descamps OS, Gilbeau JP, Leysen X, Van Leuven F, Heller FR. Impact of genetic defects on atherosclerosis in patients suspected of familial hypercholesterolemia. *Eur J Clin Invest* 2001;31:958–65.
- Taira K, Bujo H, Kobayashi J, Takahashi K, Miyazaki A, Saito Y. Positive family history for coronary heart disease and 'midband lipoproteins' are potential risk factors of carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2002;160:391–7.
- Sidhu PS, Naoumova RP, Maher VM, et al. The extracranial carotid artery in familial hypercholesterolemia: relationship of intimal-medial thickness and plaque morphology with plasma lipids and coronary heart disease. *J Cardiovasc Risk* 1996;3:61–7.
- Wittekoek ME, de Groot E, Prins MH, Trip MD, Büller HR, Kastelein JJ. Differences in intima-media thickness in the carotid and femoral arteries in familial hypercholesterolemic heterozygotes with and without clinical manifestations of cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 1999;146:271–9.
- Junyent M, Cofán M, Núñez I, Gilabert R, Zambón D, Ros E. Influence of the HDL cholesterol level on preclinical carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1107–13.
- Junyent M, Gilabert R, Zambón D, et al. Femoral atherosclerosis in heterozygous familial hypercholesterolemia. Influence of the genetic defect. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:580–6.
- Smilde TJ, van Wissen S, Wollersheim H, Trip MD, Kastelein JJ, Stalenhoef AF. Effect of aggressive versus conventional lipid lowering on atherosclerosis progression in familial hypercholesterolemia (ASAP): a prospective, randomized, double-blind trial. *Lancet* 2001;357:577–81.
- Hoeg JM, Feuerstein IM, Tucker EE. Detection and quantitation of calcific atherosclerosis by ultrafast computed tomography in children and young adults with homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1066–74.
- Pocovi M, Civeira F, Alonso R, Mata P. Familial hypercholesterolemia in Spain: case-finding program, clinical and genetic aspects. *Semin Vasc Med* 2004;4:67–74.
- Mozas P, Castillo S, Tejedor D, et al. Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain: identification of 39 novel and 77 recurrent mutations in *LDLR*. *Hum Mutat* 2004;24:187.
- Tejedor D, Castillo S, Mozas P, et al. Comparison of DNA array platform vs. DNA sequencing as genetic diagnosis tools for familial hypercholesterolemia. *Clin Chem* 2006;52:1971–2.
- Holla ØL, Nakken S, Mattingsdal M, et al. Effects of intronic mutations in the *LDLR* gene on pre-mRNA splicing: comparison of wet-lab and bioinformatics analyses. *Mol Genet Metab* 2009;96:245–52.
- Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 2007;115:459–67.
- Stary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994;89:2462–78.
- Holven KB, Myhre AM, Aukrust P, Hagve TA, Ose L, Nenseter MS. Patients with familial hypercholesterolemia show enhanced spontaneous chemokine release from peripheral blood mononuclear cells *ex vivo*. Dependency of xanthomas/xanthelasma, smoking and gender. *Eur Heart J* 2003;24:1756–62.
- Artieda M, Cénarro A, Junquera C, et al. Tendons xanthomas in familial hypercholesterolemia are associated with a differential inflammatory response of macrophages to oxidized LDL. *FEBS Lett* 2005;579:4503–12.
- Humphries SE, Norbury G, Leigh S, Hadfield SG, Nair D. What is the clinical utility of DNA testing in patients with familial hypercholesterolemia? *Curr Opin Lipidol* 2008;19:362–3.
- Tybjærg-Hansen A, Jensen HK, Nenn M, Steffensen R, Jensen G, Nordestgaard BG. Phenotype of heterozygous for low-density lipoprotein receptor mutations identified in different background populations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:211–5.

Supplementary material to:

Impact of Low-Density Lipoprotein Receptor Mutational Class on Carotid Atherosclerosis in Patients with Familial Hypercholesterolemia

Mireia Junyent, Rosa Gilabert, Estíbaliz Jarauta, Isabel Núñez, Montserrat Cofán, Fernando Civeira, Miguel Pocoví, Miguel Mallén, Daniel Zambón, Fátima Almagro, Juan Vega, Diego Tejedor, and Emilio Ros.

Methods

Clinical and laboratory characteristics

Cardiovascular risk factors and clinical chemistry variables were determined by standard methods. History of smoking was established if the subject reported smoking ever ≥ 3 cigarettes per day for at least 5 years. Hypertension was defined as systolic blood pressure ≥ 140 mm Hg, diastolic blood pressure ≥ 90 mm Hg, or use of antihypertensive medication. Diabetes mellitus was defined as a fasting glucose level ≥ 126 mg/dl or treatment with antidiabetic agents.

Blood glucose was measured by the glucose-oxidase method. Cholesterol and triglycerides were determined by standard enzymatic methods. High-density lipoprotein (HDL)-cholesterol was measured by a precipitation technique. LDL-cholesterol was estimated with the Friedewald equation. Lipoprotein(a) was determined by using immunoturbidimetry (Unimate 3, Roche, Basel, Switzerland).

Carotid ultrasonography

B-mode ultrasound imaging of bilateral carotid arteries was performed with 7-10 MHz broadband linear array transducers. The ultrasound equipments used in the study were both Applio (Toshiba, Nasu, Japan) and Sequoia (Siemens, Mountainview, CA) in the Barcelona centre, Sequoia in the Zaragoza centre, and Phillips IU-22 (Philips Medical Systems, Best, The Netherlands) in the San Sebastián centre. Mean common carotid artery (CCA) IMT was defined as the average distance between the far wall lumen–intima and media–adventitia ultrasound interfaces taken bilaterally in the 1-cm segment proximal to the carotid bulb; maximum CCA-IMT was defined as the highest distance in the same 1-cm segments at any of the two sites; maximum carotid IMT (maxCIMT) was the maximum distance in the far wall of any of the three available carotid segments of each side; and plaques were defined as focal intrusions into the lumen ≥ 1.2 mm thick. Plaques were sought by using B-mode and color Doppler examinations in both longitudinal and transverse planes to take into consideration circumferential asymmetry. When plaques were present in the far wall, maxCIMT equaled the highest plaque height.

All procedures were performed by 4 certified sonographers (R.G. and I.N., Barcelona; F.C., Zaragoza; and J.V., San Sebastián) who were blinded to clinical information. The ultrasound scans obtained in Zaragoza were analyzed by a certified ultrasound reader (E.J.) with semiautomatic edge-tracking software (eTRACK, The Netherlands). IMT measurements were performed manually with calipers in scans obtained in Barcelona and San Sebastián.

To correct for variability of IMT measurement among the three centres, CD-stored scans of 35 patients previously assessed in Barcelona were read with the eTRACK software in Zaragoza and had manual measurements at the workstation of San Sebastián. From the comparison of IMT measurements obtained in the three centres, regression equations were obtained and used to correct IMT so that data could be pooled for statistical treatment.

Supplementary Table 1. Bioinformatics analyses of 9 intronic mutations in the *LDLR* gene identified among 436 Spanish FH heterozygotes.

Mutation	NNSplice 0.9			MaxEntScan			NetGene 2			Human Splicing Finder			Conclusion*
	Natural splice site	Mutant splice site	Natural splice site	Mutant splice site	Natural splice site	Mutant splice site	Natural splice site	Mutant splice site	Natural splice site	Mutant splice site	Natural splice site	Mutant splice site	
Intron 3 c.313+1_313+2insT	0,95	Not detected	9,9	-23,2	0,975	Not detected	82,48	63,35	82,48	63,35	82,48	63,35	Damaging
Intron 3 c.313+1G>C	0,95	Not detected	9,9	1,63	0,975	Not detected	82,48	55,64	82,48	55,64	82,48	55,64	Damaging
Intron 8 c.1186+5G>A	0,69	Not detected	7,23	-0,26	0,937	0,019	88,93	77,66	88,93	77,66	88,93	77,66	Damaging
Intron 9 c.1359-3C>T	0,90	0,92	6,76	7,1	0,668	0,606	87,14	79,46	87,14	79,46	87,14	79,46	Benign
Intron 11 c.1706-10G>A	0,34	0,41	7,93	7	0,211	0,106	79,67	79,55	79,67	79,55	79,67	79,55	Benign
Intron 12 c.1845+1G>C	0,50	Not detected	4,48	-3,79	0,782	Not detected	86,34	59,51	86,34	59,51	86,34	59,51	Damaging
Intron 15 c.2311+2T>G	0,99	Not detected	9,06	1,42	0,974	Not detected	84,95	58,11	84,95	58,11	84,95	58,11	Damaging
Intron 16 c.2389+8C>T	1	1	9,86	9,86	0,998	0,995	91,09	91,09	91,09	91,09	91,09	91,09	Benign
Intron 16 c.2390-1G>C	0,57	Not detected	8,21	0,14	0,013	Not detected	92,59	63,64	92,59	63,64	92,59	63,64	Damaging

*Conclusions are based upon consistency of the majority of software programs used. The score of the mutant splice site should be at least 20% lower than the score of the corresponding natural splicing site for the mutation to be considered deleterious to normal splicing, except for Human Splicing Finder where the software itself predicts the effect.

NNSplice 0.9: http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html

MaxEntScan: http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html

NetGene2: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>

Human Splicing Finder: <http://www.umd.be/HSF>

Supplementary Table 2. *LDLR* gene mutations in 436 Spanish FH heterozygotes.

1

Location	cDNA	Mutation name	Usual Name	Type	n
Null alleles					269
exon 1	c.1-?_67+?del4kb	p.?	del4Kb	rearrangement	8
exon 2	c.91G>T	p.Glu31X	E10X	nonsense	42
exon 2	c.97C>T	p.Gln33X	Q12X	nonsense	1
exon 3	c.191-?_313+?dup	p.?	dupEx3	rearrangement	2
exon 3	c.214delG	p.Asp72ThrfsX132	211delG	frameshift	1
exon 3	c.261G>A	p.Trp87X	W66X	frameshift	6
exon 4	c.304C>T	p.Gln102X	Q81X	nonsense	1
exon 4	c.460C>T	p.Gln154X	Q133X	nonsense	1
exon 4	c.518delG	p.Cys173SerfsX31	518delG	frameshift	22
exon 4	c.530C>T	p.Ser177Leu	S156L	missense	20
exon 4	c.590G>A	p.Cys197Tyr	C176Y	missense	1
exon 4	c.654_656delTGG	p.Gly218del	G197del	in-frame deletion	3
exon 4	c.676T>C	p.Ser225Pro	S205P	missense	2
exon 5	c.732delT	p.Asp245MetfsX19	732delT	frameshift	1
exon 6	c.884delT	p.Val295AlafsX73	884delT	frameshift	5
exon 6	c.916_919dupTCAG	p.Asp307ValfsX2	920ins4	frameshift	2
exon 7	c.969delC	p.Gly324AlafsX46	969delC	frameshift	1
exon 7	c.1045delC	p.Gln349SerfsX19	1045delC	frameshift	18
exon 7	c.1054_1060+4del11	p.?	1054del11	small rearrangement	1
exon 8	c.1132C>T	p.Gln378X	Q357X	nonsense	2
exon 8	c.1176C>A	p.Cys392X	C371X	nonsense	3
exon 9	c.1200C>A	p.Tyr400X	Y379X	nonsense	1
exon 9	c.1285G>A	p.Val429Met	V408M	missense	1
exon 9	c.1326C>G	p.Tyr442X	Y421X	nonsense	1
exon 9	c.1342C>T	p.Gln448X	Q427X	nonsense	9
exon 10	c.1434delG	p.Lys479TrpfsX28	1432delG	frameshift	2
exon 10	c.1448G>A	p.Trp483X	W462X	nonsense	1
exon 10	c.1498_1499delGT	p.Val500CysfsX35	1498delGT	frameshift	1
exon 11	c.1587-5_1618del36	p.?	del36pb	rearrangement	1
exon 11	c.1646G>A	p.Gly549Asp	G528D	missense	4
exon 11	c.1705delG	p.Asp569IlefsX96	1705delG	frameshift	1
exon 14	c.2000G>A	p.Cys667Tyr	C646Y	missense	2
exon 14	c.2085del19	p.Cys696SerfsX6	2085del19	frameshift	4
exon 15	c.2184delG	p.Arg728SerfsX1	2184delG	frameshift	3
exon 15	c.2207_2208insT	p.Arg737LysfsX45	2207insT	frameshift	1
exon 17	c.2439G>A	p.Trp813X	W792X	nonsense	1
intron 3	c.313+1G>A	p.Leu64_Pro105delinsSer	313+1G>A	splicing	5
intron 3	c.313+1_313+2insT	p.?	313+1insT	splicing*	2
intron 8	c.1186+5G>A	p.?	1186+5G>A	splicing*	1
intron 9	c.1358+1G>A	p.?	1358+1G>A	splicing	2
intron 12	c.1845+1G>C	p.?	1845+1G>C	splicing*	6
intron 14	c.2140+1G>A	p.Glu714fsX34	2140+1G>A	splicing	2
intron 15	c.2311+2T>G	p.?	2311+2T>G	splicing*	2
intron 16	c.2390-1G>C	p.?	2390-1G>C	splicing*	15
exon 1 + exon 6	c.[12G>A(+)+829G>A]	p.[Trp4X(+)+Glu277Lys]	W(-18)X + E256K	nonsense + missense	10
exon 1 + exon 2	c.[12G>A(+)+97C>T]	p.[Trp4X(+)+Gln33X]	W(-18)X + Q12X	nonsense + nonsense	1
exon 4 + exon 5	c.[460C>T(+)+806G>A]	p.[Gln154X(+)+Gly269Asp]	Q133X + G248D	nonsense + missense	1
exon 4 + exon 9	c.[460C>T(+)+1247G>A]	p.[Gln154X(+)+Arg416Gln]	Q133X + R395Q	nonsense + missense	1
exon 5 + exon 7	c.[806G>A(+)+1045delC]	p.[Gly269Asp(+)+Gln349SerfsX19]	G248D + 1045delC	missense + frameshift	2
exon 5 + intron 9	c.[806G>A(+)+1358+1G>A]	p.[Gly269Asp(+)+?]	G248D + 1358+1G>A	missense + splicing	1
exon 6 + exon 9	c.[829G>A(+)+1326C>G]	p.[Glu277Lys(+)+Tyr442X]	E256K + Y421X	missense + nonsense	1
intron 1 + exon 7	c.[67+18C>A(+)+969delC]	p.[?(+)+Gly324AlafsX46]	67+18C>A + 971delC	splicing* + frameshift	1
intron 3 + exon 3	c.[313+1G>C(+)+274C>G]	p.[?(+)+Gln92Glu]	313+1G>C + Q71E	splicing* + missense	28
intron 3-intron 6	c.[314-?_940(+)?del]	p.?	del5kb	rearrangement	3
intron 3 + intron 11	c.[313+1G>C(+)+1706-10G>A]	p.?	313+1insT + 1706-10G>A	splicing* + splicing	1
intron 6-intron10	c.[941-?_1586(+)?del]	p.?	del7Kb	rearrangement	3
intron11-intron12	c.[1706-?_1845(+)?del]	p.?	del-ex12	rearrangement	1
intron12-intron15	c.[1846-?_2311(+)?del]	p.?	del11kb	rearrangement	4

Supplementary Table 2. *LDLR* gene mutations in 436 Spanish FH heterozygotes (cont.).

2

Location	cDNA	Mutation name	Usual Name	Type	n
Receptor-defective mutations					
promoter	c.-142C>T		(-49) C>T	transcription	5
promoter	c.-135C>G		(-42) C>G	transcription	6
exon 2	c.185C>T	p.Thr62Met	T41M	missense	1
exon 3	c.283T>G	p.Cys95Gly	C74G	missense	10
exon 3	c.284G>A	p.Cys95Tyr	C74Y	missense	3
exon 3	c.301G>A	p.Glu101Lys	E80K	missense	2
exon 4	c.346T>C	p.Cys116Arg	C95R	missense	1
exon 4	c.362G>A	p.Cys121Tyr	C100Y	missense	1
exon 4	c.442T>C	p.Cys148Arg	C127R	missense	4
exon 4	c.626G>A	p.Cys209Tyr	C188Y	missense	1
exon 4	c.646T>C	p.Cys216Arg	C195R	missense	2
exon 4	c.662A>G	p.Asp221Gly	D200G	missense	2
exon 4	c.665G>A	p.Cys222Tyr	C201Y	missense	1
exon 4	c.681_682ins18	p.Asp227_Glu228insSGKPCD	681ins18	in-frame insertion	1
exon 4	c.682G>A	p.Glu228Lys	E207K	missense	4
exon 5	c.737G>A	p.Gly246Glu	G225E	missense	1
exon 5	c.782G>T	p.Cys261Phe	C240F	missense	1
exon 5	c.806G>A	p.Gly269Asp	G248D	missense	4
exon 6	c.826T>G	p.Cys276Gly	C255G	missense	5
exon 6	c.829G>A	p.Glu277Lys	E256K	missense	11
exon 6	c.895G>T	p.Ala299Ser	A278S	missense	9
exon 6	c.920A>G	p.Asp307Gly	D286G	missense	1
exon 6	c.938G>A	p.Cys313Tyr	C292Y	missense	2
exon 7	c.953G>T	p.Cys318Phe	C297F	missense	5
exon 7	c.1027G>A	p.Gly343Ser	G322S	missense	3
exon 7	c.1055G>A	p.Cys352Tyr	C331Y	missense	1
exon 8	c.1072T>C	p.Cys358Arg	C337R	missense	1
exon 8	c.1103G>A	p.Cys368Tyr	C347Y	missense	2
exon 8	c.1130G>A	p.Cys377Tyr	C356Y	missense	4
exon 8	c.1133A>C	p.Gln378Pro	Q357P	missense	1
exon 8	c.1136G>A	p.Cys379Tyr	C358Y	missense	1
exon 9	c.1197_1205delCTACCTCTT	p.Tyr400_Phe402del	1197del9	in-frame deletion	7
exon 9	c.1246C>T	p.Arg416Trp	R395W	missense	1
exon 9	c.1247G>A	p.Arg416Gln	R395Q	missense	1
exon 9	c.1255T>C	p.Tyr419His	Y398H	missense	1
exon 9	c.1301C>A	p.Thr434Lys	T413K	missense	2
exon 10	c.1361C>A	p.Thr454Asn	T433N	missense	3
exon 10	c.1475A>G	p.Asp492Gly	D471G	missense	1
exon 11	c.1618G>A	p.Ala540Thr	A519T	missense	1
exon 11	c.1664T>C	p.Leu555Pro	L534P	missense	4
exon 12	c.1729T>C	p.Trp577Arg	W556R	missense	1
exon 11	c.1749G>A	p.His583Gln	H562Q	missense	1
exon 12	c.1783C>T	p.Arg595Trp	R574W	missense	3
exon 12	c.1800G>C	p.Glu600Asp	E579D	missense	1
exon 13	c.1871_1873delITCA	p.Ile624del	1871del3	in-frame deletion	4
exon 13	c.1965C>G	p.Phe655Leu	F634L	missense	4
exon 14	c.2054C>T	p.Pro685Leu	P664L	missense	7
exon 14	c.2093G>A	p.Cys698Tyr	C677Y	missense	2
exon 14	c.2101G>A	p.Gly701Ser	G680S	missense	1
exon 16	c.2375T>C	p.Ile792Thr	I771T	missense	4
exon 17	c.2475C>G	p.Asn825Lys	N804K	missense	3
exon 2 + exon 15	c.[148G>T(+)+2282C>T]	p.[Ala50Ser(+)+Thr761Met]	A29S + T740M	missense + missense	3
exon 4 + intron 12	c.[665G>A(+)+1706-10G>A]	p.[Cys222Tyr(+)?]	C201Y + 1706-10G>A	missense + splicing	1
exon 11 + exon 17	c.[1690A>C(+)+2393_2401del9]	p.[Asn564His(+)+Leu799_Phe801del]	N543H + 2393del9	missense + in-frame deletion	10
Intronic variants - alleged splicing mutations (undetermined receptor activity)					
intron 9	c.1359-3C>T	p.?	1359-3C>T	splicing	1
intron 11	c.1706-10G>A	p.?	1706-10G>A	splicing	3
intron 16	c.2389+8C>T	p.?	2389+8C>T	splicing	1
Total					436

All mutations were described according to HGVS recommendations (<http://www.hgvs.org>) as well as the commonly used nomenclature (usual name) for the *LDLR* gene for compatibility purposes. Nucleotide numbering was based on the cDNA sequence, with position +1 being the A of the ATG translation initiation codon (cDNA) and aminoacid numbering with position +1 being the translation initiator methionine (mutation name). Reference sequences: GenBank Accession NM_000527.2 for the *LDLR* gene.

*Intronic mutations consistently predicted to cause abnormal splice sites resulting in null alleles by bioinformatics analyses, with abnormal scores in all 4 programs MaxEntScan, NetGene2, NNSplice 0.9, and Human Splicing Finder (see foot of [Supplementary Table 1](#) for references).



Letter to the Editor

Gaucher disease: a pyrosequencing frequency analysis of the N370S and L444P mutations in the Spanish population

To the Editor:

Gaucher disease (GD), the most prevalent lysosomal storage disease is caused by a deficiency in the enzyme glucocerebrosidase (1). To date, approximately 350 different mutations have been identified (<http://www.hgmd.org>; April, 2011) in the glucocerebrosidase gene (*GBA*).

In 1993, the Spanish Gaucher Disease Registry (SGDR) began collecting clinical and genetic data of patients with GD in Spain (2). Data from the SGDR revealed that N370S and L444P were the most prevalent *GBA* mutations (68.7% of mutated alleles) (3). The high prevalence of the N370S and L444P mutation has been previously reported in Portugal and Greece and in several cohorts of subjects with and without Parkinson disease (4–9). Nevertheless in Spain, there is a lack of information on the frequencies of both mutations.

Knowledge of the allele frequencies of common mutations in *GBA* in specific populations can provide estimates of the expected number of patients that carry a specific genotype and reveal areas of potential underdiagnosis. It is important to point out that, despite the imperfect relationship between genotype and phenotype, the homozygous N370S genotype is associated with the mildest form of the disease; the heterozygous N370S/L444P genotype is associated with intermediate disease severity; and the homozygous L444P mutation is associated with the most severe forms, including neurological manifestations. However, other more mild or severe genotypes exist.

In order to establish the allele frequencies of N370S and L444P in the Spanish population, we analyzed a cohort of 991 apparently unrelated subjects from different Spanish regions. This series included 647 anonymous newborns (twins were excluded from this study; 350 males and 297 females), recorded sequentially from different Spanish hospitals, and a sample of 344 healthy adults (176 males and 168 females), with a mean age of 55.1 ± 20.54 years.

The research protocol was approved by the Ethical Committee of Aragon Health Sciences Institute (CEICA), and the study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration of 1975, revised in 1983.

Genomic DNA was isolated with standard procedures. Screening for both mutations was performed by pyrosequencing with the PSQ 96MA pyrosequencer (Biotage, Uppsala, Sweden). In order to avoid amplification of the *GBA* pseudogene, we amplified a fragment of 1954 bp from the *GBA* gene (genomic position g.5719 to g.7671) with the following primers: forward (5'-GGGGGTGGTGGTTCATGTAT-3') and reverse (5'-CCTGCTGTGCCCTCTTTAGTCAC-3'). This amplicon was used to perform a nested multiplex PCR assay, with the following primers: N370S-F 5'-TCTTTGCCTTTGTCCTTACCC-3'; N370S-R 5'-AAGTGGCCAAGGTGGTAGAA-3'; L444P-F 5'-GTTCCCA CATT CAGCAAGTTCA-3'; and L444P-R 5'-CACCGGTTTAGCACGAC-3'. Reverse primers were labeled with biotin at the 5' position. PCR conditions were: one cycle at 94°C for 2 min; 40 cycles at 94°C for 20 s, 60°C for 10 s, and 72°C for 15 s.

Probes used for pyrosequencing were: N370S-P 5'-TTGTCCTTACCCTAG-3' and L444P-P 5'-GGGCTGGTTGCCAGT-3'. The nucleotide addition sequence for the pyrosequencing reaction was: TAGACAGTA GACGTACTCGAT. This strategy had the advantage of identifying true N370S homozygotes. The main criticism for previous reports has been that it was not clear whether the patients were true homozygotes, because the PCR reaction had been performed with a primer site within the 55 bp region of *GBA* that is commonly deleted (10, 11). The results of pyrosequencing were validated by DNA sequencing in a total of 110 DNA samples.

We found a total of eight carriers of N370S and one carrier of L444P. These included nonhomozygotes and compound heterozygotes of both mutations. The allele frequencies, confidence intervals, and gene frequencies are detailed in Table 1. The sum of N370S and L444P alleles represented 0.9% of the total allele frequencies in the Spanish population.

The current Spanish population comprises 46,256,319 (www.ine.es; April 2011) inhabitants, this population is shared ancestry of several lineages (12,13). According to our results, there should be at least 67 individuals homozygous for N370S, based on the Hardy–Weinberg equation (range: 67–2139). However, only 38 patients with GD have been identified as

Letter to the Editor

Table 1. Allele and gene frequencies of N370S and L444P mutations in the *GBA* gene in the general population of Spain

Mutation	Homozygous	Heterozygous	Allele frequency ($n = 1982$)	95% CI	Gene frequency ($n = 991$)
L444P (c.1448 T>C)	0	1	0.0005	0.0001–0.0015	0.001
N370S (c.1226 A>G)	0	8	0.0040	0.0012–0.0068	0.008

CI, confidence interval.

homozygous for the N370S mutation in the SGDR. This suggested that the homozygous N370S genotype has been underdiagnosed. Therefore, when the allele frequency of the N370S mutation is based on the number of diagnosed GD patients, it may be an underestimation, because some carriers may be asymptomatic and escape detection (14). According to the same calculation, there should be about 12 individuals homozygous for L444P in Spain (range: 0–104) and 185 with heterozygous N370S/L444P alleles (range: 0–944). Nevertheless, the SRGD has registered only 6 individuals homozygous for L444P/L444P and 97 heterozygous with the N370S/L444P allele. However, screening for the N370S and L444P mutations alone can miss about 30–40% of mutant alleles.

The N370S allele frequency observed in the Spanish population was consistent with previous published studies in other Mediterranean countries (4–6). On the other hand, it is difficult to estimate the allele frequency for the L444P mutation, because this variant can be a point mutation or part of a recombinant allele. Nevertheless, according to our results, the estimated allele frequency for the L444P mutation in our country is quite low.

In conclusion, based on our estimates of the frequencies of N370S and L444P in the general population of Spain, the number of patients with GD that are homozygous for N370S and heterozygous for N370S/L444P were below the expected numbers. However, the number of patients homozygous for L444P that are registered in the SGDR was in accordance with the estimated frequency. A potential explanation for these results could involve the differential severity of the clinical manifestations related to these three genotypes. This assumption has several limitations because very mild alleles may not result in disease that reaches medical attention, and thus the SGDR would be skewed to individuals with severe mutations. In addition, recombinant alleles may be classified as L444P, rather than Rec alleles.

Acknowledgements

This work was supported by grants 09/02556 from Fondo de Investigación Sanitaria and CIBERER. Additional support was received from the Fundación Ramón Areces and The Spanish Foundation for the Study and Treatment of Gaucher Disease (Fundación Española para el Estudio y Terapéutica de la Enfermedad de Gaucher, FEETEG). The authors thank the subjects for their participation in this study.

B García-Rodríguez^{a,b}

P Alfonso^{a,b,c,d}

M Mallén^e

M Pocovi^{b,c,d,e}

P Giraldo^{a,b,c,d,f}

^aTranslational Research Unit, Miguel Servet University Hospital, Zaragoza, Spain

^bFundación Española para el Estudio y la Terapéutica de la Enfermedad de Gaucher (FEETEG), Zaragoza, Spain

^cCentro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Zaragoza, Spain

^dAragon Health Sciences Institute (I+CS), Zaragoza, Spain

^eDepartment of Biochemistry, Molecular and Cellular Biology, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain, and

^fDepartment of Haematology, Miguel Servet University Hospital, Zaragoza, Spain

References

1. Beutler E, Grabowski GA. Gaucher disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York, NY: McGraw-Hill, 2001: 3635–3668.
2. Giraldo P, Pocovi M, Pérez-Calvo J, Rubio-Félix D, Giralto M. Report of the Spanish Gaucher's disease registry: clinical and genetic characteristics. *Haematologica* 2000; 85: 792–799.
3. Alfonso P, Aznarez S, Giralto M, Pocovi M, Giraldo P. Mutation analysis and genotype/phenotype relationships of Gaucher disease patients in Spain. *J Hum Genet* 2007; 52: 391–396.
4. Lacerda L, Amaral O, Pinto R, Oliveira P, Aerts J, Sa Miranda MC. The N370S mutation in the glucocerebrosidase gene of Portuguese type 1 Gaucher patients: linkage to the PvuII polymorphism. *J Inherit Metab Dis* 1994; 17: 85–88.
5. Dimitriou E, Moraitou M, Troungos C, Schulpis K, Michelakakis H. Gaucher disease: frequency of the N370S mutation in the Greek population. *Clin Genet* 2010; 78: 195–196.
6. Lesage S, Anheim M, Condroyer C et al. French Parkinson's Disease Genetics Study Group. Large-scale screening of the Gaucher's disease-related glucocerebrosidase gene in Europeans with Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2011; 20: 202–210.
7. Beutler E, Nguyen NJ, Henneberger MW et al. Gaucher disease: gene frequencies in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 85–88.
8. Horowitz M, Pasmanik-Chor M, Borochowitz Z et al. Prevalence of glucocerebrosidase mutations in the Israeli Ashkenazi Jewish population. *Hum Mutat* 1998; 12: 240–244.
9. Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2009; 361: 1651–1661.
10. Beutler E, Gelbart T. Erroneous assignment of Gaucher disease genotype as a consequence of a complete gene deletion. *Hum Mutat* 1994; 4: 212–216.
11. Torralba MA, Alfonso R, Perez-Calvo JI et al. High prevalence of the 55-bp deletion (c.1263del55) in exon 9 of the glucocerebrosidase gene causing misdiagnosis (for homozygous N370S (c.1226A>G) mutations) in Spanish Gaucher disease patients. *Blood Cell Mol Dis* 2002; 29: 35–40.

12. Arnaiz-Villena A, Martínez-Laso J, Alonso-García J. Iberia: population genetics, anthropology, and linguistics. *Hum Biol* 1999; 71: 725–743.
13. Côte-Real HB, Macaulay VA, Richards MB et al. Genetic diversity in the Iberian Peninsula determined from mitochondrial sequence analysis. *Ann Hum Genet* 1996; 60: 331–350.
14. Mistry PK, Sadan S, Yang R, Yee J, Yang M. Consequences of diagnostic delays in type 1 Gaucher disease: the need for greater awareness among hematologists-oncologists and an opportunity for early diagnosis and intervention. *Am J Hematol* 2007; 82: 697–701.

Correspondence:
Pilar Giraldo, MD, PhD
Traslational Research Unit
Hospital Universitario Miguel Servet
P^o Isabel La Católica 1-3
50009 Zaragoza
Spain
Tel.: +34 670285339
Fax: +34 976468041
e-mail: giraldo.p@gmail.com



Short Report

Identification of seven novel *SMPD1* mutations causing Niemann–Pick disease types A and B

Irun P, Mallén M, Dominguez C, Rodriguez-Sureda V, Alvarez-Sala LA, Arslan N, Bermejo N, Guerrero C, Perez de Soto I, Villalón L, Giraldo P, Pocovi M. Identification of seven novel *SMPD1* mutations causing Niemann–Pick disease types A and B. *Clin Genet* 2013; 84: 356–361. © John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd, 2012

Niemann–Pick disease (NPD) types A and B are autosomal, recessively inherited, lysosomal storage disorders caused by deficient activity of acid sphingomyelinase (E.C. 3.1.4.12) because of mutations in the sphingomyelin phosphodiesterase-1 (*SMPD1*) gene. Here, we present the molecular analysis and clinical characteristics of 15 NPD type A and B patients. Sequencing the *SMPD1* gene revealed eight previously described mutations and seven novel mutations including four missense [c.682T>C (p.Cys228Arg), c.1159T>C (p.Cys387Arg), c.1474G>A (p.Gly492Ser), and c.1795C>T (p.Leu599Phe)], one frameshift [c.169delG (p.Ala57Leufs*20)] and two splicing (c.316+1G>T and c.1341delG). The most frequent mutations were p.Arg610del (21%) and p.Gly247Ser (12%). Two patients homozygous for p.Arg610del and initially classified as phenotype B showed different clinical manifestations. Patients homozygous for p.Leu599Phe had phenotype B, and those homozygous for c.1341delG or c.316+1G>T presented phenotype A. The present results provide new insight into genotype/phenotype correlations in NPD and emphasize the difficulty of classifying patients into types A and B, supporting the idea of a continuum between these two classic phenotypes.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests related to this study.

**P Irun^{a,b,c}, M Mallén^a,
C Dominguez^{c,d},
V Rodriguez-Sureda^{c,d},
LA Alvarez-Sala^{e,f}, N Arslan^g,
N Bermejo^h, C Guerreroⁱ,
I Perez de Soto^j, L Villalón^k,
P Giraldo^{b,c,l} and M Pocovi^{a,b,c}**

^aDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain, ^b Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (IIS), Zaragoza, Spain, ^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Zaragoza (U752), Barcelona (U719), Spain, ^d Biochemistry and Molecular Biology Research Centre for Nanomedicine, Area T2 Nanomedicina, Vall Hebron University Hospital, Barcelona, Spain, ^e Lipids Unit, Medicina Interna, Gregorio Marañón University Hospital, Madrid, Spain, ^f Medicine Faculty, Complutense Madrid University, Madrid, Spain, ^g Department of Pediatrics, Division of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Metabolism, Dokuz Eylül University Medical Faculty, Alsancak, Izmir, Turkey, ^h Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital San Pedro de Alcántara, Complejo Hospitalario de Cáceres, Cáceres, Spain, ⁱ Servicio de Pediatría, Hospital de Alcañiz, Alcañiz, Spain, ^j Servicio de Hematología, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain, ^k Servicio de Hematología, Hospital Universitario Fundación Alcorcón, Madrid, Spain, and ^l Departamento de Hematología, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain

Key words: chitotriosidase – genotype/phenotype correlations – genotyping – Niemann–Pick disease – *SMPD1* – sphingomyelinase

Corresponding author: Dr Pilar Irún, Departamento de Bioquímica y Biología, Molecular y Celular, Facultad

Identification of mutations causing NPA and NPB

de Ciencias, Universidad de Zaragoza,
C. Pedro, Cerbuna 12, 50009
Zaragoza, Spain.
Tel.: +34 976761224;
fax: +34 976762123;
e-mail: mpirun@unizar.es

Received 27 September 2012, revised
and accepted for publication 10
December 2012

Niemann–Pick disease types A (NPA) and B (NPB) are caused by deficient activity of acid sphingomyelinase (ASM; E.C. 3.1.4.12). NPA (MIM# 257200) is a fatal infantile neurodegenerative disorder characterized by massive hepatosplenomegaly and a rapidly progressive neurologic course. NPB (MIM# 607616) is a non-neuronopathic disorder characterized by hepatosplenomegaly and pulmonary involvement. Broad phenotypic variability has been reported within both types, with the recognition of a continuum between them; a large number of patients have been classified as ‘intermediate or atypical type’ (IT) (1).

ASM or sphingomyelin phosphodiesterase-1 is encoded by *SMPDI* (MIM# 607608, GenBank accession number M81780.1) (2). To date, more than 100 mutations causing NPD have been reported (Human Gene Mutation Database: <http://www.hgmd.org>). Most mutations are ‘private’, occurring in one or a few families; however, some mutations have been reported to occur with substantial frequencies in certain ethnic groups (3, 4).

This study reports the molecular and enzymatic characterization of 15 NPD patients, as well as an analysis of the genotype/phenotype relationship.

Materials and methods

We studied 15 patients (12 apparently unrelated) from different parts of Spain; three were immigrants from North Africa and two were of Turkish origin. Patients 7, 10, and 12 were siblings of Patients 8, 11, and 13, respectively. All patients or their guardians gave informed consent. The study protocol was approved by the Aragon Experimental Ethical Committee (CEICA), Spain, and developed following the ethical standards of the Helsinki declaration of 1975, as revised in 2000. Patients were classified as type A, B or IT according to Pavlů-Pereira et al. (1). NPD diagnosis was established by the analysis of sphingomyelinase activity in leukocytes and/or cultured skin fibroblasts using C14:choline-methyl-[14C]sphingomyelin (5) or the fluorimetric enzyme assay (6). Plasma chitotriosidase (CT) activity was measured as previously described (7). Plasma pulmonary and activation regulated chemokine (CCL18/PARC) concentration was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (R&D Systems, Minneapolis, MN) (8). Genomic DNA was extracted from peripheral blood using a standard protocol; the *SMPDI* fragments were amplified by

using the polymerase chain reaction (PCR) and sequenced on a MegaBACE 500 DNA Analysis System (GE Healthcare, Amersham, UK). Figure 1 presents the amplification strategy. Mutations were confirmed with two independent PCR products and with parental DNA when available. Hundred control alleles from the general healthy Spanish population were also sequenced. All mutations were described according to the Human Genome Variation Society (HGVS) recommendations (<http://www.hgvs.org/mutnomen>). Several software tools were used to predict the effects of amino acid changes on protein function and HUMAN SPLICING FINDER (<http://www.umd.be/HSF/>), NETGENE2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>) and NNSPLICE (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) to analyze potential splicing mutations. Total RNA was extracted from cultured fibroblasts using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Chatsworth, CA), treated with RNase-Free DNase Set (Qiagen, Chatsworth, CA) to remove the genomic DNA and reverse transcribed using random hexamer primers and the RevertAid H minus first strand cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). The *SMPDI* cDNA was amplified by PCR using specific primers and sequenced. Primers used are listed in Table S1, Supporting Information. Genotyping for c.1049_1072dup24 in *CHIT1* was performed as previously described (9).

Statistical analysis was carried out using the SPSS software package (SPSS Inc., Chicago, IL). Variable distribution normality was analyzed by the Kolmogorov–Smirnov test and mean comparison by non-parametric Mann–Whitney *U* test. Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Clinical and biochemical data of patients at baseline are presented in Table 1.

We sequenced *SMPDI* in 15 NPD patients identifying 15 different mutations, 7 of them were previously undescribed (Table 2). The most prevalent mutations were p.Arg610del and p.Gly247Ser, accounting for 21% (5/24) and 12% (3/24) of total alleles, respectively. None of the novel mutations was found in any of the 100 control alleles. Parental genotyping was possible in all cases except for Patients 2, 8, 11 and 14 in order to ensure that the mutations were located in different alleles.

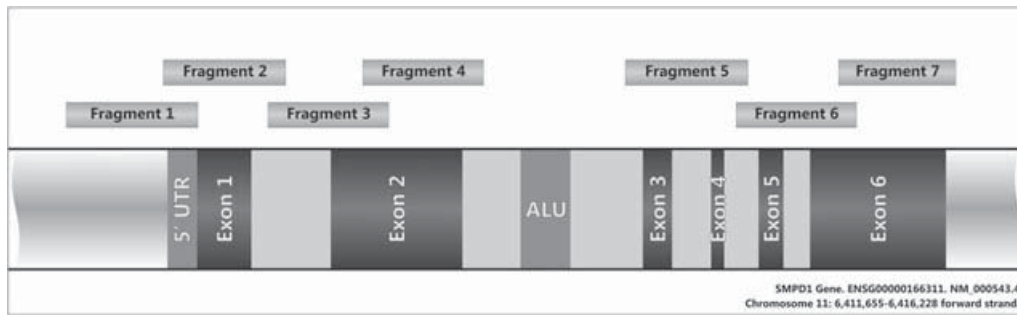


Fig. 1. The amplification strategy. The *SMPD1* gene was amplified by polymerase chain reaction in a group of four overlapping fragments (comprising 983 nucleotides of promoter zone, exons 1 and 2, intron 1, and partial intron 2) and a second group of three overlapping fragments (comprising exons 3, 4, 5, and 6, 447 bp into the 3' untranslated region (UTR), partial intron 2, and full introns 3, 4, and 5).

Table 1. General characteristics of patients at baseline

Patient number	Onset age (years)	Sex	NPD type	% ASM ^a (L/Fb)	<i>SMPD1</i> genotype	CT activity (nmol/ml/h)	CT genotype dup 24 bp	CCL18 (ng/ml)
1	34	F	B	15%/0.5 ^d	p.[Gly29Aspfs*48];[Trp32*]	0	Homo	862
2	57	F	B	15 ^c /0.4 ^d	p.[Arg610del];[Arg610del]	455	Neg	1024
3	61	F	B	9%/ND	p.[Gly247Ser];[Arg610del]	1666	Neg	645
4	5	M	B	17%/ND	p.[Phe333Serfs*52];[Arg476Trp]	1410	Neg	719
5	0.5 ^b	M	A	0 ^d /3.2 ^d	p.[Gly247Ser];[Cys387Arg]	520	Het	ND
6	39	M	B	0 ^d /4.8 ^d	p.[Gly247Ser];[Gly492Ser]	48	Neg	ND
7	37	M	B	0 ^d /ND	p.[Gly247Ser];[Gly492Ser]	96	Neg	ND
8	0.5 ^b	F	A	ND/4.4 ^d	p.[Cys228Arg];[Ala57Leufs*20]	ND	Het	ND
9	11	M	B	22%/ND	p.[Leu599Phe];[Leu599Phe]	112	ND	ND
10	15	F	B	20%/ND	p.[Leu599Phe];[Leu599Phe]	ND	ND	ND
11	3	F	IT	ND/5.2 ^d	p.[Arg610del];[Arg610del]	ND	Neg	ND
12	1 ^b	F	A	0 ^d /1.5 ^d	c.[1341delG];[1341delG]	855	Neg	ND
13	0.5 ^b	F	A	2.8%/ND	c.[1341delG];[1341delG]	878	Neg	1417
14	2	F	IT	ND/2.6 ^d	p.[Arg230Cys];[Arg378His]	ND	Het	ND
15	1.1	M	A	4 ^d /ND	c.[316+1G>T];[316+1G>T]	792	ND	ND

CT, chitotriosidase; F, female; IT, intermediate or atypical type; M, male; ND, not determined; NPD, Niemann–Pick disease.

^aResidual enzymatic activity determined in either fibroblasts (Fb) or leukocytes (L) and expressed as the percentage of normal values.

^bDeceased patient.

^cUsing the fluorimetric enzyme assay described by van Diggelen et al. (6).

^dUsing C14:choline-methyl-[14C]sphingomyelin (52 mCi/mmol; Perkin Elmer, Waltham, MA) as a substrate with the method described by Vanier et al. (5).

Patients 9 and 10, homozygous for the novel mutation p.(Leu599Phe), presented a moderate splenomegaly but no hepatomegaly, ocular manifestations, or pulmonary or neurological symptoms. Patients 12 and 13, homozygous for the novel mutation c.1341delG, exhibited hepatosplenomegaly, pulmonary involvement, failure to thrive, deafness, feeding difficulties, lack of concentration, and cherry red maculae (CRM). Patient 15, homozygous for the novel mutation c.316+1G>T, presented hepatosplenomegaly, pulmonary involvement, coarse facial appearance, mild hypotonia, delayed development and CRM. Patients homozygous for p.Arg610del presented with diverse symptoms. Patient 2 had only a severe splenomegaly. In contrast, Patient 11 showed hepatosplenomegaly, gastrointestinal symptoms, delayed development, and after an initial period of normal neurologic development presented with regression and neurological signs (hypotonia and convergent squint).

The remaining mutations appeared as compound heterozygous. Patient 5, heterozygous for p.Gly247Ser and the novel p.(Cys387Arg) mutations, displayed hepatosplenomegaly, failure to thrive, vomiting, axial hypotonia and CRM. In contrast, p.Gly247Ser in heterozygosis with the novel p.(Gly492Ser) mutation (Patients 6 and 7) caused a mild phenotype. One of them was asymptomatic and the other had been splenectomized. The combination of p.Gly247Ser and p.Arg610del (Patient 3) caused splenomegaly, mild dyspnea, headache and dizziness. Patient 1, heterozygous for p.Trp32* and the frameshift mutation p.Gly29Aspfs*48, showed splenomegaly and interstitial pulmonary infiltration. Patient 4, heterozygous for p.Arg476Trp and p.Phe333Serfs*52, suffered from organomegaly. Patient 8, heterozygous for two novel mutations, p.(Ala57Leufs*20) and p.(Cys228Arg), presented hepatosplenomegaly, coarse facial appearance, development delay, axial hypotonia,

Identification of mutations causing NPA and NPB

Table 2. Mutations in SMPD1 encountered in 12 unrelated Niemann–Pick disease patients^a

Mutation	Predicted coding effect	Usual name ^b	Exon/Intron	Number of alleles ^c	References
c.84delC	p.Gly29Aspfs*48	G29fsX74	1	1	Sikora et al. (10)
c.96G>A	p.Trp32*	W32X	1	1	Pittis et al. (15)
c.169delG	p.(Ala57Leufs*20)	A55fsX74	2	1	This report
c.316+1G>T	p.?	–	In1	2	This report
c.682T>C	p.(Cys228Arg)	C226R	2	1	This report
c.688C>T	p.Arg230Cys	R228C	2	1	Simonaro et al. (18)
c.739G>A	p.Gly247Ser	G245S	2	3	Simonaro et al. (18)
c.996delC	p.Phe333Serfs*52	fsP330	2	1	Levrán et al. (16)
c.1133G>A	p.Arg378His	R376H	3	1	Simonaro et al. (18)
c.1159T>C	p.(Cys387Arg)	C385S	3	1	This report
c.1341delG	p.?	–	5	2	This report
c.1426C>T	p.Arg476Trp	R474W	5	1	Simonaro et al. (18)
c.1474G>A	p.(Gly492Ser)	G490S	5	1	This report
c.1795C>T	p.(Leu599Phe)	L597F	6	2	This report
c.1828_1830delCGC	p.Arg610del	ΔR608	6	5	Levrán et al. (11)

^aAll mutations were described according to the latest HGVS recommendations (<http://www.hgvs.org/mutnomen>). Nucleotide numbering was based on the *SMPD1* cDNA sequence (RefSeq NM_000543.4) with nucleotide +1 being the A of the first ATG translation initiation codon. Amino acid numbering was based on the ASM protein precursor sequence NP_000534.3, with +1 being the translation initiator methionine.

^bNumbered according to Schuchman et al. (2) for compatibility with previous papers.

^cNumber of alleles in unrelated patients.

decreased muscle bulk, absent deep tendon reflexes in lower extremities and CRM. Patient 14, heterozygous for p.Arg230Cys and p.Arg378His, presented a large hepatosplenomegaly and pulmonary involvement during her first 5 years of life, with neurological regression causing inability to walk. Bronchitis and recurrent pneumonia were present until their disappearance at the age of 14. The spleen size reduced in puberty and since then she has had normal development.

Mean plasma CT activity was significantly higher in NPD patients than controls (683 ± 550 vs 58 ± 33 nmol/ml/h; $p=0.001$) but there was no relationship between CT activity and clinical severity (Table 1). The available CCL18/PARC plasma concentrations showed a marked elevation for patients (933 ± 307 ng/ml) vs controls (64 ± 33 ng/ml), $p=0.001$.

Discussion

The mutational analysis of 15 NPD patients using overlapping fragments was a good approach to identify all the mutant alleles. The p.Arg610del mutation was the most frequent in our cohort as previously reported (3, 4), followed by the p.Gly247Ser mutation. Surprisingly, the p.Ala484Glu mutation, previously reported as the second most frequent in Spain (3), was not found in any patient.

We found two patients homozygous for p.Arg610del. Patient 2 presented a mild NPB in agreement with previous studies (10, 11) and with previous results of *in vitro* expression (3). In contrast, Patient 11 showed a more severe phenotype and was reclassified as an IT because of the onset of neurological signs. However, a patient with similar symptoms classified as NPB (12) and other intermediate cases have also been reported

(1, 13). The fact that patients with the same genotype showed different symptoms indicates that there is not a clear genotype/phenotype association, and suggests that there must be other factors that modify the clinical presentation.

The novel mutation p.(Leu599Phe) found in homozygosis was associated with a mild NPB with significant residual ASM activity (approximately 20%), in agreement with the predicted effect on protein function (Table 3). Another novel mutation found in homozygosis, c.1341delG, was associated with a severe NPA. The sequence of the mutant fibroblasts c-DNA showed that this deletion produced an alternative splicing with the introduction of the 3' thirty nucleotides of intron 4. The novel mutation c.316+1G>T in homozygosis was associated with a severe NPA. The splicing analysis tools each consistently identified the donor splicing site in the wild-type sequence but not in the mutated sequence. The compound genotype of two novel mutations, p.(Ala57Leufs*20) and p.(Cys228Arg), resulted in a severe NPA. The latter mutation affects a disulfide bond, which may lead to misfolding or decreased protein stability. The predicted effect of this combination (frameshift + folding/stability problems) was consistent with the observed phenotype. The p.Gly247Ser mutation was found in heterozygosis with three different mutations. Homozygosis for Gly247Ser has previously been unequivocally associated with NPA (14); the same phenotype was observed in heterozygosis with the novel p.(Cys387Arg), which seems to affect a disulfide bond, leading to misfolding or impaired protein stability. In contrast, the heterozygosis for p.Gly247Ser and p.Arg610del mutations was associated with NPB, in agreement with the mild effect previously described for p.Arg610del. The heterozygosis for p.Gly247Ser and the novel p.(Gly492Ser) mutation is intriguing

Table 3. Prediction of the effect of new mutations on protein function

Mutation	Predicted coding effect	Structural motifs on ASM protein	PantherPSEC ^a $P_{deleterious}$	SNPs3D SVM score ^b	PMut			Degree of conservation (%)	Predicted effect
					Prediction ^c (reliability)	SIFT Score ^d	Polyphen Score ^e		
c.682T>C	p.(Cys228Arg)	Disulfide bond	0.9099	-2.56	0.7696 (5)	0	1 (PrD)	90–100	Highly damaging
c.1159T>C	p.(Cys387Arg)	Disulfide bond	0.92246	-2.44	0.7668 (5)	0	1 (PrD)	90–100	Highly damaging
c.1474G>A	p.(Gly492Ser)	–	0.45334	0.85	0.5082 (0)	0.43	0.007 (B)	30–35	Tolerated
c.1795C>T	p.(Leu599Phe)	–	0.71405	-0.48	0.4956 (0)	0.12	0.998 (PrD)	70–80	Damaging

^aPantherPSEC (<http://www.pantherdb.org/tools/csnpScoreForm.jsp>): $P_{deleterious}$ estimates the probability that a given variant will cause a deleterious effect on protein function.

^bSNPs3D (<http://www.snps3d.org>): a positive SVM score indicates a variant classified as non-deleterious, and a negative score indicates a deleterious case. The larger the score, the more confident the classification.

^cPMut (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>): values larger than 0.5 are predicted as pathological, otherwise neutral. Reliability ranges from 0 (low reliable) to 9 (very reliable).

^dSIFT (<http://sift.jcvi.org>): score ranges from 0 to 1. The amino acid substitution is predicted as damaging if the score is ≤ 0.05 , and tolerated if the score is > 0.05 .

^ePolyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>): score ranges from 0 to 1. Mutation is qualitatively appraised as PrD (probably damaging), PoD (possibly damaging), or B (benign).

because p.(Gly492Ser) was predicted to be benign, patients showed a mild NPB and normal CT activity but, contrary to expectations, they showed no residual ASM activity measured *in vitro*. Heterozygosis for p.Gly29Aspfs*48 and p.Trp32* was associated with a mild NPB according to a previous report indicating that p.Trp32* mutation had a mild effect in combination with other severe mutations (15). Heterozygosis for p.Phe333Serfs*52 and p.Arg476Trp was also associated with a mild NPB. Homoallelism for p.Phe333Serfs*52 has been associated with NPA, but the clinical outcome of heteroallelic patients depends on the nature of the other allele (16, 17). The p.Arg476Trp mutation in heterozygosis with others has been previously associated with mild forms of NPB (18). Heterozygosis for p.Arg230Cys and p.Arg378His mutations caused an IT phenotype. In contrast, the homozygosity for p.Arg230Cys has been associated with a severe NPB (19).

Our analysis of plasma specimens showed elevated levels of CT activity (Table 1) in almost all patients in agreement with previous studies (20), supporting the idea that Niemann–Pick storage cells, like Gaucher cells, secrete CT (7) into circulation.

In conclusion, we have found a large heterogeneity of *SMPD1* mutations in NPD patients. Plasma CT activity and CCL18 concentration were significantly elevated in patients compared with controls, indicating that they can be used as biomarkers (20). The most prevalent mutations were p.Arg610del and p.Gly247Ser accounting for 33% of the total alleles. In contrast with previous studies, our results for patients homozygous for p.Arg610del showed an unclear genotype/phenotype relationship. Further molecular characterizations of NPD patients are needed in order to establish a clear genotype/phenotype correlation.

Supporting Information

The following Supporting information is available for this article:

Table S1. List of primers designed for amplification of *SMPD1* gene.

Additional Supporting information may be found in the online version of this article.

Acknowledgements

This work has been supported by the grants FIS PS09/02556 and FIS 10/01605 from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias, and by the Ramon Areces Foundation, the Fundación para el Estudio y Terapéutica de la Enfermedad de Gaucher (FEETEG), and the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), which is an initiative of the Carlos III Institute of Health (ISCIII).

References

- Pavlu-Pereira H, Asfaw B, Poupctová H et al. Acid sphingomyelinase deficiency. Phenotype variability with prevalence of intermediate phenotype in a series of twenty-five Czech and Slovak patients. A multi-approach study. *J Inher Metab Dis* 2005; 28 (2): 203–227.
- Schuchman EH, Suchi M, Takahashi T, Sandhoff K, Desnick RJ. Human acid sphingomyelinase. Isolation, nucleotide sequence and expression of the full-length and alternatively spliced cDNAs. *J Biol Chem* 1991; 266 (13): 8531–8539.
- Rodríguez-Pascual L, Gort L, Schuchman EH, Vilageliu L, Grinberg D, Chabás A. Identification and characterization of *SMPD1* mutations causing Niemann-Pick types A and B in Spanish patients. *Hum Mutat* 2009; 30 (7): 1117–1122.
- Fernández-Burriel M, Peña L, Ramos JC et al. The R608del mutation in the acid sphingomyelinase gene (*SMPD1*) is the most prevalent among patients from Gran Canaria Island with Niemann-Pick disease type B. *Clin Genet* 2003; 63 (3): 235–236.
- Vanier MT, Revol A, Fichet M. Sphingomyelinase activities of various human tissues in control subjects and in Niemann-Pick disease – development and evaluation of a microprocedure. *Clin Chim Acta* 1980; 106 (3): 257–267.
- van Diggelen OP, Voznyi YV, Keulemans JL et al. A new fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Niemann-Pick A/B, with specificity of natural sphingomyelinase substrate. *J Inher Metab Dis* 2005; 28 (5): 733–741.
- Hollak CE, van Weely S, van Oers MH, Aerts JM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest* 1994; 93 (3): 1288–1292.
- Boot RG, Verhoek M, de Fost M et al. Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention. *Blood* 2004; 103 (1): 33–39.
- Hise AG, Hazlett FE, Bockarie MJ, Zimmerman PA, Tisch DJ, Kazura JW. Polymorphisms of innate immunity genes and susceptibility to lymphatic filariasis. *Genes Immun* 2003; 4 (7): 524–527.

Identification of mutations causing NPA and NPB

10. Sikora J, Pavlu-Pereira H, Elleder M, Roelofs H, Wevers RA. Seven novel acid sphingomyelinase gene mutations in Niemann-Pick type A and B patients. *Ann Hum Genet* 2003; 67: 63–70.
11. Levrán O, Desnick RJ, Schuchman EH. Niemann-Pick type B disease. Identification of a single codon deletion in the acid sphingomyelinase gene and genotype/phenotype correlations in type A and B patients. *J Clin Invest* 1991; 88 (3): 806–810.
12. Fotoulaki M, Schuchman EH, Simonaro CM et al. Acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease: novel findings in a Greek child. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30 (6): 986.
13. Wasserstein MP, Aron A, Brodie SE, Simonaro C, Desnick RJ, McGovern MM. Acid sphingomyelinase deficiency: prevalence and characterization of an intermediate phenotype of Niemann-Pick disease. *J Pediatr* 2006; 149 (4): 554–559.
14. Ricci V, Stroppiano M, Corsolini F et al. Screening of 25 Italian patients with Niemann-Pick A reveals fourteen new mutations, one common and thirteen private, in SMPD1. *Hum Mutat* 2004; 24 (1): 105.
15. Pittis MG, Ricci V, Guerci VI et al. Acid sphingomyelinase: identification of nine novel mutations among Italian Niemann-Pick type B patients and characterization of in vivo functional in-frame start codon. *Hum Mutat* 2004; 24 (2): 186–187.
16. Levrán O, Desnick RJ, Schuchman EH. Type A Niemann-Pick disease: a frameshift mutation in the acid sphingomyelinase gene (fsP330) occurs in Ashkenazi Jewish patients. *Hum Mutat* 1993; 2 (4): 317–319.
17. Schuchman EH, Miranda SR. Niemann-Pick disease: mutation update, genotype/phenotype correlations, and prospects for genetic testing. *Genet Test* 1997; 1 (1): 13–19.
18. Simonaro CM, Desnick RJ, McGovern MM, Wasserstein MP, Schuchman EH. The demographics and distribution of type B Niemann-Pick disease: novel mutations lead to new genotype/phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 2002; 71 (6): 1413–1419.
19. Wasserstein MP, Desnick RJ, Schuchman EH et al. The natural history of type B Niemann-Pick disease: results from a 10-year longitudinal study. *Pediatrics* 2004; 114 (6): e672–e677.
20. Brinkman J, Wijburg FA, Hollak CE et al. Plasma chitotriosidase and CCL18: early biochemical surrogate markers in type B Niemann-Pick disease. *J Inherit Metab Dis* 2005; 28 (1): 13–20.

Supplementary Table 1: List of primers designed for amplification *SMPD1* gene

SMPD1 Amp1F	5' ATGCTCGCTTTTACTGTTCGTGGAT 3'
SMPD1 Amp1R	5' GCATTGTCGCGCTTCCTACAC 3'
SMPD1 Amp2F	5' GCCACCGAGAGATCAGCTGTCAGAG 3'
SMPD1 Amp2R	5' TCTTACTTCACAAAGGTCACAATGGG 3'
SMPD1 Amp3F	5' ATGGAGAGGGTGGCATCTACAATC 3'
SMPD1 Amp3R	5' CGTGCCCTCCAGGTAGTCAT 3'
SMPD1 Amp4F	5' CTGGGACATTTTCTCATCTTGGAAC 3'
SMPD1 Amp4R	5' GGGGAGCCAAATGAAGAGCACTAAG 3'
SMPD1 Amp5F	5' TGGGGAAGATGTCATGTATGCTTTTACCCT 3'
SMPD1 Amp5R	5' GATGCCCTCTTTCTCCAACCTGTTCTAGTG 3'
SMPD1 Amp6F	5' CACCATCCCTGTTGTCCCATGGAGT 3'
SMPD1 Amp6R	5' CACAGGGCTCCGAGGGTGGGT 3'
SMPD1 Amp7F	5' CTACCGCCTGGCACAACCTGGTATA 3'
SMPD1 Amp7R	5' AGATCTCCTTGCCCTGCTTGCCT 3'
c-DNA SMPD1 1D	5' ACTCCTCCCGCTGGCTCTATG 3'
c-DNA SMPD1 1R	5' GGTATGGCTCCCGGTATGTTT 3'

RESEARCH

Open Access



Assessment of plasma chitotriosidase activity, CCL18/PARC concentration and NP-C suspicion index in the diagnosis of Niemann-Pick disease type C: a prospective observational study

Isabel De Castro-Orós^{1,2*†}, Pilar Irún^{1,2,3†}, Jorge Javier Cebolla^{1,4}, Víctor Rodríguez-Sureda^{3,5}, Miguel Mallén¹, María Jesús Pueyo¹, Pilar Mozas¹, Carmen Dominguez^{3,5}, Miguel Pocovi^{1,2}
and on behalf of the Spanish NP-C Group

Abstract

Background: Niemann-Pick disease type C (NP-C) is a rare, autosomal recessive neurodegenerative disease caused by mutations in either the NPC1 or NPC2 genes. The diagnosis of NP-C remains challenging due to the non-specific, heterogeneous nature of signs/symptoms. This study assessed the utility of plasma chitotriosidase (ChT) and Chemokine (C-C motif) ligand 18 (CCL18)/pulmonary and activation-regulated chemokine (PARC) in conjunction with the NP-C suspicion index (NP-C SI) for guiding confirmatory laboratory testing in patients with suspected NP-C.

Methods: In a prospective observational cohort study, incorporating a retrospective determination of NP-C SI scores, two different diagnostic approaches were applied in two separate groups of unrelated patients from 51 Spanish medical centers ($n = 118$ in both groups). From Jan 2010 to Apr 2012 (Period 1), patients with ≥ 2 clinical signs/symptoms of NP-C were considered 'suspected NP-C' cases, and NPC1/NPC2 sequencing, plasma chitotriosidase (ChT), CCL18/PARC and sphingomyelinase levels were assessed. Based on findings in Period 1, plasma ChT and CCL18/PARC, and NP-C SI prediction scores were determined in a second group of patients between May 2012 and Apr 2014 (Period 2), and NPC1 and NPC2 were sequenced only in those with elevated ChT and/or elevated CCL18/PARC and/or NP-C SI ≥ 70 . Filipin staining and 7-ketocholesterol (7-KC) measurements were performed in all patients with NP-C gene mutations, where possible.

Results: In total across Periods 1 and 2, 10/236 (4%) patients had a confirmed diagnosis of NP-C based on gene sequencing (5/118 [4.2%] in each Period): all of these patients had two causal NPC1 mutations. Single mutant NPC1 alleles were detected in 8/236 (3%) patients, overall. Positive filipin staining results comprised three classical and five variant biochemical phenotypes. No NPC2 mutations were detected. All patients with NPC1 mutations had high ChT activity, high CCL18/PARC concentrations and/or NP-C SI scores ≥ 70 . Plasma 7-KC was higher than control cut-off values in all patients with two NPC1 mutations, and in the majority of patients with single mutations. Family studies identified three further NP-C patients.

*Correspondence: isadco@gmail.com

†Isabel De Castro-Orós and Pilar Irún should be regarded as joint first authors

¹ Department of Biochemistry and Molecular and Cellular Biology, Faculty of Science, University of Zaragoza, C. Pedro Cerbuna 12, 50009 Saragossa, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



Conclusion: This approach may be very useful for laboratories that do not have mass spectrometry facilities and therefore, they cannot use other NP-C biomarkers for diagnosis.

Keywords: Niemann-Pick disease type C, Chitotriosidase, CCL18/PARC, NP-C suspicion index, 7-ketocholesterol, Diagnosis, Screening

Background

Niemann-Pick disease type C (NP-C) is a rare inherited lysosomal storage disorder with an estimated incidence of 1:120,000 live births [1]. Mutations in either of the two genes, *NPC1* or *NPC2*, have been described as the cause of the disease [1]. Approximately 95% of patients with a genetic diagnosis have *NPC1* mutations: *NPC1* encodes a large membrane glycoprotein with mostly late-endosomal localization [2]. Other patients have mutations in the *NPC2* gene, which encodes a small soluble lysosomal protein that binds cholesterol with high affinity [1, 3].

The diagnosis of NP-C remains challenging as neurological signs of the disease are extremely varied in terms of severity and age at onset [1, 4]. In particular, the age at onset of neurological manifestations has a major influence on disease progression and prognosis, and patients can be categorized on the basis of early-infantile, late-infantile, juvenile and adolescent/adult neurological onset to aid clinical management and family counselling [4]. Generally, patients with very early-onset disease are detected and diagnosed based on pronounced visceral symptoms such as prolonged neonatal jaundice, fetal hydrops and/or ascites [1, 5]. Diagnoses in later-onset patients depend more on the recognition of typical neurological signs such as vertical supranuclear gaze palsy (VSGP), developmental delay, cerebellar ataxia, and gelastic cataplexy, which may or may not be detected alongside splenomegaly. However, visceral symptoms can appear long before neurological signs and often go unrecognized, particularly in those with adolescent/adult-onset disease [1, 4].

The NP-C suspicion index (NP-C SI) was developed by an international team of experts for the detection of NP-C among patients suspected of having the disease, and is based on easily assessed patient clinical symptoms and medical history [6]. Patients scoring ≥ 70 on the NP-C SI should be considered as possibly having NP-C and should undergo further, specific laboratory tests. Scores < 40 on the NP-C SI indicate a low likelihood of NP-C [4].

Niemann-Pick disease type C diagnoses can only be confirmed using specific laboratory tests [4]. Filipin staining in patient skin fibroblast cultures is a sensitive and specific test to identify impaired intracellular cholesterol transport and homeostasis. This test has been considered the gold standard method for diagnosing NP-C because it establishes the biochemical phenotype of the

disease and provides useful functional evidence of the pathogenicity of novel gene mutations [4, 7–10]. However, recent progress in gene mutation analysis, the lack of correlation between some causal mutations and ‘variant’ filipin staining patterns, and the fact that the filipin test is time consuming and expensive, have led to this gold standard being challenged [8, 11]. Most patients with NP-C (80–85%) show a ‘classical’ pattern of cholesterol storage featuring numerous, strongly fluorescent perinuclear vesicles. However, some patients display a ‘variant’ biochemical phenotype that features a less distinct, more variable pattern [9, 10].

The establishment of reliable biomarkers for the presence and progression of NP-C represents an important goal. Chitotriosidase (ChT) is a human plasma chitinase enzyme that shows markedly elevated activity in a variety of lysosomal storage disorders [12, 13]. High plasma levels reflect gradual intralysosomal accumulation of the enzyme in lipid-loaded macrophages, which secrete it [14]. Plasma ChT is widely used in Gaucher disease (GD) to monitor treatment response to enzyme replacement therapy (ERT) [12]. Ries et al. reported that patients with NP-C showed a mean plasma ChT activity of 856 ± 721 nmol/mL*h compared with 55 ± 35.6 nmol/mL*h in individuals with miscellaneous other diseases, and $13,761 \pm 10,348$ nmol/mL*h in patients with GD [15]. A ChT activity > 200 nmol/mL*h is considered pathological [15]. However, 3–6% of individuals with European ancestry have the c.1049_1072dup24 polymorphism of the ChT gene (*CHIT1*), which leads to a complete lack of ChT activity [16, 17].

Chemokine (C–C motif) ligand 18 (CCL18)/pulmonary and activation-regulated chemokine (PARC) is produced mainly by monocytes/macrophages that constitutively express it only at low levels in normal circumstances, but its production can be up-regulated in these cells by macrophage activators [18]. Plasma CCL18 levels have been reported to increase 29-fold in symptomatic GD patients [19] leading to its use as a further disease biomarker [20]. Pineda et al. observed that patients with early- or late-infantile onset NP-C had higher plasma CCL18/PARC activities compared with juvenile-onset or asymptomatic patients, and proposed CCL18/PARC as an alternative marker in NP-C patients with ChT deficiency [20, 21].

Levels of several cholesterol oxidation products (oxysterols) have recently been proposed as sensitive and

specific markers for NP-C screening and/or diagnosis. Increased plasma 7-ketocholesterol (7-KC) levels have been reported in NP-C patients and in an NP-C mouse model [7, 22]. Further, Porter et al. have described an oxysterol profile specific for NP-C that correlates with the age of disease onset as well as disease severity [23].

In the following study, we evaluated whether plasma ChT activity and CCL18/PARC concentration might complement clinical assessments for the identification of patients who should undergo further, specific testing for NP-C. We also compared these biomarker analyses with NP-C SI scores and with findings from plasma oxysterol measurements.

Methods

Patients and study design

Patients from 51 Spanish medical centres specializing in neurodegenerative disorders who had two or more symptoms typically seen in NP-C were considered as possibly having the disease, and were enrolled into this prospective observational study combined with a retrospective determination of NP-C SI scores following reference to a questionnaire with a list of symptoms and clinical data of interest (see Additional file 1). Patients presenting with at least two of the following symptoms were included in the study: bipolar disorder; schizophrenia; depression; one other clinical symptom. Medical chart data relating to demographics, diagnosis, and recorded disease characteristics were obtained from referring physicians.

The study comprised two observation periods, during which different diagnostic approaches were followed. In Period 1, which ran from January 2010 to April 2012, patients with two or more clinical NP-C signs and symptoms were considered as having 'suspected NP-C'. *NPC1/NPC2* sequencing, ChT and sphingomyelinase activities, and CCL18/PARC concentration were assessed in all patients. If either one or two *NPC1* or *NPC2* mutations were identified, filipin staining and oxysterol measurements were also performed, where possible. In Period 2, which ran from May 2012 to April 2014, ChT activity, CCL18/PARC concentration and NP-C SI scores were analyzed in all patients, and *NPC1/NPC2* sequencing was performed only in those who had elevated ChT and CCL18/PARC values (greater than mean + two standard deviations [SD] versus control values), and/or an NP-C SI score ≥ 70 . Filipin staining and/or plasma oxysterol measurements were performed, where possible, in all patients with either one or two *NPC1* or *NPC2* mutations.

Genetic analysis

DNA was isolated from EDTA blood samples using standard methods. The promoter and 25 exons of *NPC1*,

and respective exon–intron boundaries, were amplified simultaneously in 24 PCR reactions using oligonucleotide primers developed in-house at the University of Zaragoza. The promoter, coding regions of the five exons of *NPC2* and respective exon–intron boundaries were amplified in a single multiplex reaction with linker-tailed primers. Amplification products were joined into one DNA fragment using universal external primers, and the resulting amplicons were purified using the Illustra™ ExoStar™ 1-Step system (GE Healthcare, UK), followed by 5' to 3' sequencing in an ABI 3500XL DNA analyzer (Applied Biosystems, USA).

To analyze splicing variants, total RNA was isolated from cultured fibroblasts (1×10^6 cells/column) using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA), and genomic DNA was removed using the RNase-Free DNase Set (Qiagen). RNA (200 ng for each reaction) was used for cDNA synthesis with random hexamer primers using RevertAid H (Qiagen) minus first strand cDNA synthesis. Two fragments, one from c.227 to c.976 and another from c.1793 to c.2359, were amplified by PCR, purified using the Illustra™ ExoStar™ 1-Step system (GE Healthcare), followed by 5' to 3' sequencing in an ABI 3500XL DNA analyzer (Applied Biosystems). All primer sequences used for PCR are available upon request.

Patients with only one *NPC1* mutation were further analyzed by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (SALSA® MLPA® P193 *NPC1* version A2; MRC Holland, Netherlands) in order to find any rearrangements, with data normalized *versus* three healthy controls.

A number of software databases (PolyPhen-2 [24], SIFT [25] and MutationTaster [26]) were used to evaluate the pathogenicity of newly identified genetic variants that implied non-synonymous changes. The effect of variants in potential splicing sites was predicted using NetGene2 and NNSplice by analyzing the structure of donor and acceptor sites with a separate neural network recognizer for each site [27, 28]. Common polymorphisms were excluded, and gene variations were compared with databases of the National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Ensembl (<http://www.ensembl.org/>), the 1000 Genomes project (<http://www.1000genomes.org/>), and the Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>). All mutations were described according to the latest Human Genome Variation Society (HGVS) recommendations (<http://www.hgvs.org/mutnomen>).

Chitotriosidase activity and CCL18/PARC concentration

Plasma for biomarker measurements was separated from EDTA blood samples. Plasma ChT activity was measured

using the fluorogenic substrate 4MU-chitotrioside (Sigma Chemical Co., USA), as described previously [12]. Genotyping for the 24-bp insertion in exon 10 of the *CHIT1* gene (c.1049_1072dup24) was performed as described by Irun et al. [16]. Given that ChT activity is roughly half of normal or zero in patients who are heterozygous and homozygous for the c.1049_1072dup24 *CHIT1* mutation, respectively, ChT levels were multiplied by two in heterozygous patients. The concentration of the chemokine CCL18/PARC was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; R&D Systems Europe, Ltd, UK) as described elsewhere [19]. Mean \pm SD control values determined in 36 patients who did not have lysosomal disorders were: 46.1 ± 30.2 nmol/mL/h for ChT activity, and 52.5 ± 30.3 ng/mL for CCL18/PARC concentration.

NP-C suspicion index

Individuals >4 years old were assessed using the NP-C SI as described in detail elsewhere (<http://www.npc-si.com>) [6]. The NP-C SI was published in 2012, but it was considered useful in the context of the current study and was therefore applied retrospectively in Period 1 and prospectively in Period 2.

Filipin staining

Normal and NP-C fibroblasts were cultured using standard laboratory methods, but with some adaptations (see Additional file 2). Only homogeneous confluent cell monolayers grown over 3–6 passages, and covering an area of 25 cm², were studied. Fluorescent staining of lysosomal cholesterol in fibroblast cultures was performed based on a well-known cytochemical method in low-density lipoprotein (LDL)-challenged cells, and perinuclear cholesterol accumulation was assessed as described previously [9].

Oxysterol analysis

The concentration of 7-KC was measured in all patients with available plasma samples and at least one identified *NPC1* mutation. Extraction of 7-KC from plasma samples was conducted according to the method described by Lin et al. [22], and 7-KC was quantified using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) based on a slightly modified version of the method described by Baila-Rueda et al. [29]. Briefly, a calibration curve for 7-KC showed a correlation coefficient of 0.995, with an assay linear range of 2–800 ng/mL. The lower limits of detection (LOD) and quantitation were 1 and 2 ng/mL, respectively. Intra-day and inter-day variations were <5 and <11%, respectively. Mean \pm SD control values determined in 36 patients who did not have lysosomal disorders were 15.99 ± 14.67 ng/mL.

Family studies

Genetic analyses were applied in all available first-degree relatives of index cases possessing two NP-C gene mutations in order to establish whether mutations were located in the same allele or in different alleles, and to identify other NP-C patients.

Statistical methods

As this was an observational study, data analyses were descriptive in nature.

Results

Patients and diagnoses

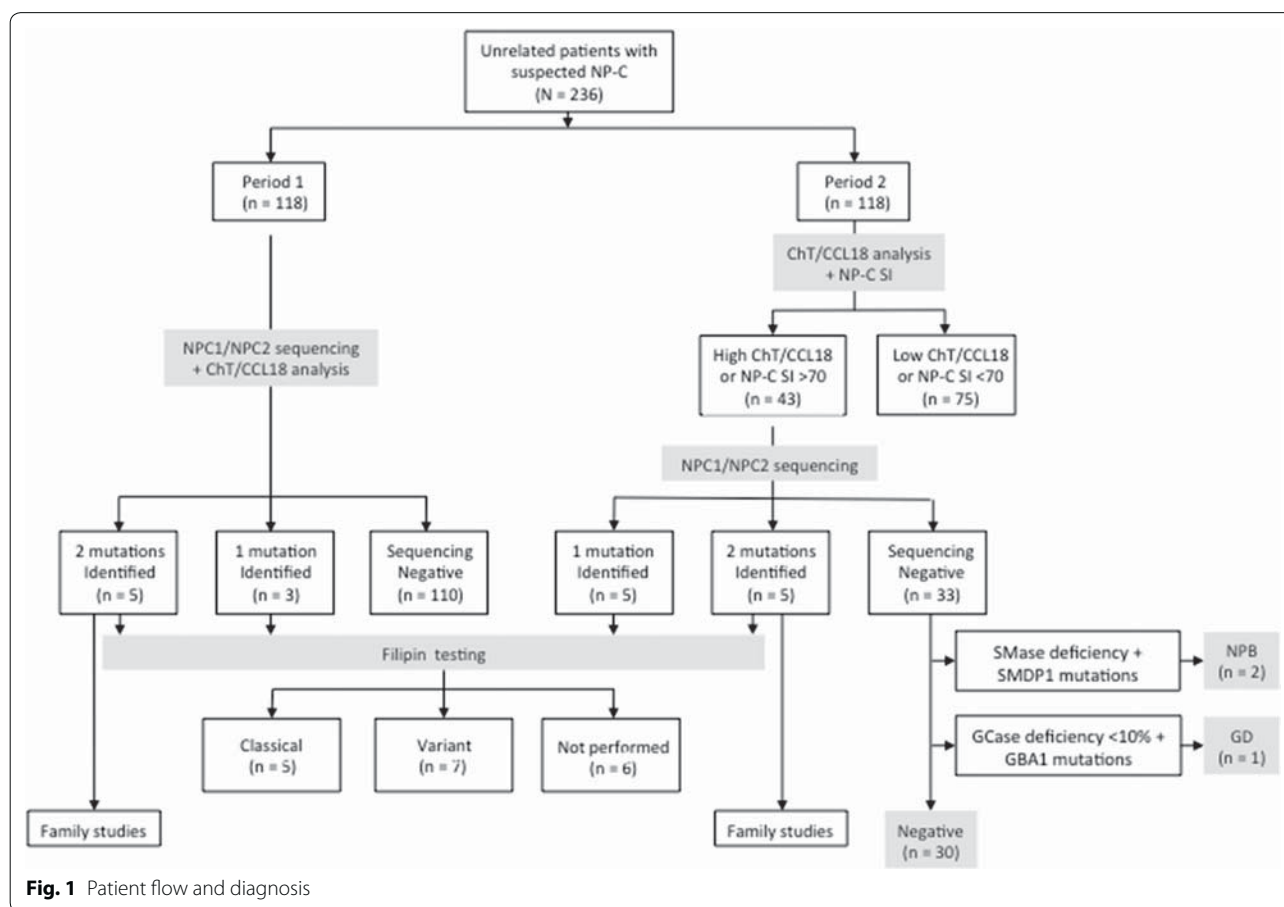
In total, 236 unrelated patients with suspected NP-C were included in Periods 1 and 2 (Fig. 1). All 118 patients included during Period 1 underwent *NPC1/NPC2* sequencing, among whom five patients were found to be homozygous or compound heterozygotes for *NPC1* mutations (Table 1), and three were found to be carriers of single heterozygous *NPC1* mutations (Table 2).

In Period 2, 118 patients were assessed for biomarkers (ChT and CCL18/PARC). But based on biomarkers results, only 43 out of 118 patients in Period 2 underwent genetic testing. Five of the 118 patients enrolled during Period 2 were homozygous or compound heterozygotes for *NPC1* mutations (Table 1), and a further five were carriers of one *NPC1* allele variant (Table 2). Sphingomyelinase deficiency was detected in two patients who were subsequently diagnosed with Niemann-Pick disease type B based on *SMPD1* gene mutation analysis. Another patient showed acid glucosidase deficiency (with <10% of normal activity), and was diagnosed with GD after identification of two *GBA* mutations.

ChT and CCL18/PARC analyses

The mean \pm SD plasma CCL18/PARC concentration and ChT activity in the five patients from Period 1 with an identified genetic cause for NP-C were 289 ± 286 ng/mL (range 88–788 ng/mL) and 380 ± 374 nmol/mL*h (range 156–1045 nmol/mL*h), respectively. Patients with one mutation had substantially lower values: 185 ± 56.3 ng/mL (range 123–233 ng/mL) and 110 ± 56.1 nmol/mL*h (range 53–167 nmol/mL*h), respectively. Excluding patient NPC4B who had no available data, all patients with *NPC1* mutations showed CCL18/PARC concentrations and/or corrected ChT activities that were at least two SDs greater than control values.

In Period 2, 43/118 (36%) patients had CCL18/PARC concentrations and/or corrected ChT activities at least two SDs greater than control values (i.e., CCL18/PARC >115 ng/mL and/or ChT >150 nmol/mL*h) [16], or normal biomarker levels but an NP-C SI score >70. In



this Period, 18 patients showed elevated levels of both ChT and CCL18/PARC, six only showed elevated ChT activity, and 14 had elevated CCL18/PARC concentrations. Five patients had only NP-C SI ≥ 70 , and 13/118 subjects from Period 2 had NP-C SI ≥ 70 . *NPC1* and *NPC2* mutation analyses were therefore conducted in 43 patients in this group.

Analysis for the c.(1049_1072) dup24 *CHIT1* genotype identified four and three homozygous patients in Periods 1 and 2, respectively, and five and 10 heterozygous patients in Periods 1 and 2, respectively. The homozygous patients were not excluded from the study because it was still possible to analyze CCL18/PARC concentration and NP-C SI scores.

NP-C suspicion index analysis

Overall, 79 (33%) of all enrolled patients had an NP-C SI risk prediction score ≥ 70 following clinical screening, 17 (7.1%) of whom were children <4 years old. Six out of 10 of the NP-C patients who had two *NPC1* mutations had a high suspicion of NP-C (risk prediction score ≥ 70) (Table 1). The remaining patients were either <4 years old or had an NP-C SI <70. Among patients in the

single-*NPC1* mutation group, of which four were children aged <4 years, only one patient had an NP-C SI ≥ 70 (Table 2).

Filipin staining

Skin biopsies were performed in all patients who consented to them, and diagnoses of NP-C were confirmed based on abnormal filipin staining in these cases (Table 1). Six patients with a single *NPC1* mutation showed a variant filipin staining pattern, while two showed a classical staining pattern (Table 2).

Oxysterol analysis

Plasma 7-KC concentrations were analyzed in 17 NP-C patients and 21 relatives. The mean \pm SD 7-KC level among all patients with two *NPC1* mutations was 350.8 ± 221.8 ng/mL (range 103–761 ng/mL), and all of these patients had plasma 7-KC concentrations higher than the optimal control cut-off value (102.8 ng/mL) in our laboratory (Table 3). Among patients with one mutation, the mean \pm SD 7-KC concentration was also raised (194 ± 265.9 ng/mL [range <2–761 ng/mL]), although only 4/7 of these patients, all of whom had positive

Table 1 Mutational and biochemical features of NP-C patients with two *NPC1* mutations

Patient ID	Variant allele 1 amino acid	Variant allele 1 reference	Variant allele 2 amino acid	Variant allele 2 reference	CCL18/ PARC ng/mL	ChT(dup24) nmol/mL.h	NP-C SI score	Filipin staining	7-KC ng/mL	Clinical form
<i>Period 1</i>										
NPC1A	p.(Gln775Pro)	[32]	p.(Asp1097Asn)	[31]	156	188 (Het)	145	ND	260	Adult
NPC2A	p.(Arg1059*)	[30]	p.(Arg1059*)	[30]	788	1045 (Neg)	NC (<4 y.o.)	Classical	650	Early infantile
NPC3A	p.(Pro1007Ala)	[36]	p.(Asn222Ser)	[34]	88	266 (Neg)	60	Variant	103	Adult
NPC4A	p.(Arg518Trp)	[35]	p.(Gly992Trp)	[36]	151	244 (Neg)	195	ND	213	Adult
NPC5A	p.(Trp942Cys)	[30]	p.(Arg1173Gly)	New	266	156 (Het)	95	ND	178	Adult
<i>Period 2</i>										
NPC6A	p.(Arg372Trp)	[30]	p.(Thr1036Met)	[2]	466	415 (Neg)	20	ND	238	Adult
NPC7A	p.(Glu1188 fs*54)	[30]	p.(Thr375Ala)	New	265	75 (Neg)	200	ND	398	Adult
NPC8A	p.(Ile1061Thr)	[17]	p.(Ile1061Thr)	[17]	1137	1477 (Neg)	NC (<4 y.o.)	ND	514	Early infantile
NPC9A	p.(Cys177Tyr)	[35]	p.(Val664Met)	[34]	516	614 (Neg)	190	Classical	193	Adult
NPC10A	p.(Leu107Cfs*5)	[32]	p.(Glu61 + ?_ Asp211 + ?)dup	New	1048	812 (Het)	NC (<4 y.o.)	Classical	761	Early infantile

Mutations were described according to the latest HGVS recommendations (<http://www.hgvs.org/mutnomen>); ChT chitotriosidase (ChT activity of heterozygous individuals [dup24] was multiplied by two). NC not conducted (patient < 4 years old), ND no data available, Neg negative, 7-KC 7-ketocholesterol, LOD limit of detection (= 2 ng/mL)

Table 2 Mutational and biochemical features of 'NP-C uncertain' patients with only one *NPC1* mutation

Patient ID	Variant allele 1 amino acid	Variant allele 1 reference	CCL18/PARC ng/mL	ChT (dup24) nmol/mL.h	NP-C SI score	Filipin staining	MLPA	7-KC ng/mL	Clinical form
<i>Period 1</i>									
NPC1B	p.(Leu846Pro)	New	233	109 (Neg)	55	Variant	Negative	134	Adult
NPC2B	p.(Phe1221Sfs*20)	[30]	123	53 (Neg)	60	Classical	Negative	34	Adult
NPC3B	p.(Gln775Pro)	[32]	198	167 (Neg)	55	Classical	Negative	<2	Adult
<i>Period 2</i>									
NPC4B	p.(Arg1274Trp)	New	ND	ND	NC (<4 y.o.)	Variant	Negative	ND	Early infantile
NPC5B	p.(Glu451Lys)	[36]	550	771 (Neg)	NC (<4 y.o.)	Variant	Negative	258	Early infantile
NPC6B	p.(Asn222Ser)	[34]	138	59 (Neg)	NC (<4 y.o.)	Variant	Negative	150	Late infantile
NPC7B	p.(Gln775Pro)	New	416	132 (Neg)	101	Variant	Negative	125	Adult
NPC8B	p.(Gln775Pro)	[32]	39	24 (Neg)	120	Variant	Negative	19	Juvenile

Mutations were described according to the latest HGVS recommendations (<http://www.hgvs.org/mutnomen>); ChT chitotriosidase (ChT activity of heterozygous individuals [dup24] multiplied by two), NC not conducted (patient < 4 years old), ND no data available, Neg negative, 7-KC 7-ketocholesterol, LOD limit of detection (=2 ng/mL)

classical or variant filipin staining results, had plasma 7-KC concentrations higher than the cut-off value.

Clinical manifestations

Clinical manifestations are summarized in Table 4. The most prevalent manifestations in patients with a confirmed diagnosis of NP-C were neurological signs, including: ataxia, VSGP, dementia, dystonia and/or dysarthria. Psychiatric signs were the second most frequent class of manifestation, and included pre-senile cognitive decline/dementia, psychotic symptoms, and depression/bipolar disorders. Unexplained splenomegaly with or without concurrent hepatomegaly were present in 5/10 patients (50%) with a confirmed diagnosis.

NPC1 mutations

Patients diagnosed with NP-C in this cohort showed wide heterogeneity of *NPC1* variants. In total, eight new *NPC1* variants were detected: four missense (p.(Thr375Ala), p.(Leu846Pro), p.(Arg1173Gly), p.(Arg1274Trp)), two different tentative splicing variants at intron 12 (c.(1947 + 10G > A)) and exon 5 (c.(612C > T), p.(Thr204Thr)), one deletion (c.318_318delC) that produces a frameshift change, p.(L107CfsX5), and one rearrangement (c.(280 + ?_c.630 + ?) dup (p.(Glu61 + _Asp211 + ?) dup)) that leads to a duplication of exons 4 and 5. *In silico* analysis with Polyphen2, SIFT and MutationTaster software indicated that these changes could affect protein function (Table 5). We also found 17 rare *NPC1* variants previously

Table 3 Patient demographics and diagnostic features among all study patients

	NP-C positive (two <i>NPC1</i> mutations) (n = 10)	NP-C uncertain (one <i>NPC1</i> mutation) (n = 8)	NP-C negative (n = 218)
<i>Age (years)</i>			
Mean ± SD	28 ± 21	28 ± 28	44 ± 22
Median (range)	35 (1.4–62)	21 (0.8–68)	46 (0.03–83)
<i>Gender (n)</i>			
Male	4	6	126
Female	6	2	92
<i>NP-C SI (points)</i>			
Mean ± SD	129 ± 72.1	78.2 ± 27.1	58.9 ± 39.2
Median (range)	145 (20–200)	69.1 (55–120)	55 (5–245)
<i>ChT activity (nmol/mL/h)</i>			
Mean ± SD	553 ± 479	187 ± 262	122 ± 423
Median (range)	255 (75–1477)	109 (24–771)	53 (11–5149)
<i>CCL18 conc. (ng/mL)</i>			
Mean ± SD	481 ± 370	242 ± 179	95 ± 178
Median (range)	266 (88–1137)	198 (39–550)	(11–1513)
<i>7-KC (ng/mL)</i>			
Mean ± SD	351 ± 222	103 ± 91.20	ND
Median (range)	249 (103–761)	198 (<2–761)	
<i>Filipin staining (n)</i>			
Classical	3	2	ND
Variant	1	6	
No data	6	0	

All patients, including those from both Periods 1 and 2. Data expressed as mean ± SD, median and range (minimum–maximum). Normal biomarker values calculated in 36 patients without lysosomal disorders were: 46.1 ± 30.2 nmol/mL/h for ChT activity; 52.5 ± 30.3 ng/mL for CCL18/PARC concentration; and 15.99 ± 14.67 ng/mL for 7-KC concentration. ND no data available

associated with NP-C. A further 17 common *NPC1* variants or polymorphisms were also observed, including: c.(–22A > C), p.(Tyr129Tyr), p.(His215Arg), p.(Pro237Ser), p.(Ser322Ser), p.(Asn490Thr), p.(Met642Ile), p.(Ile858Val), p.(Asn931Lys), c.(1947 + 10G > C), c.(1947 + 14G > T), c.(2086 + 8G > C), c.(2911 + 28T > C), c.(3246 + 46C > T), c.(3591 + 35C > T), c.(3754 + 34A > G), and p.(Arg1266Gln). Five *NPC2* polymorphisms were detected (p.(Gly52Gly), p.(Ser67Pro), p.(Pro86Leu), p.(Ser121Ala) and c.(441 + 437T > C)), but no allele mutations were identified.

Two variants of uncertain significance were detected (c.(1947 + 10G > A) and c.(612C > T)). Complementary DNA sequencing was conducted in fibroblast DNA obtained from patient NPC10 to better classify these two variants, and confirmed the presence of heterozygous mutations (p.(Leu107CysfsX5) and c.(612C > T) [p.Thr204Thr]). We also identified the

c.(280 + ?_c.630 + ?)dup variant. The c.(1947 + 10G > A) mutation was analyzed, and a splicing effect has not been observed.

Family studies

Forty-nine relatives were available for genetic analysis, and 22 were identified as carriers of at least one *NPC1* mutation. Three relatives were identified as compound heterozygotes for *NPC1* mutations: p.(Pro1007Ala)-p.(Asn222Ser); p.(Trp942Cys)-p.(Arg1173Gly); and p.(Glu1188 fs*54)-p.(Thr375Ala). Further examination of these three individuals revealed clinical symptoms of NP-C, and they were subsequently diagnosed with NP-C.

Discussion

Due to the variability of age at onset and presentation in NP-C it is crucial to determine which diagnostic strategy might best help identify affected patients among suspected cases. We evaluated two different diagnostic pathways incorporating two well characterized biomarkers that have previously been used to monitor lysosomal storage disease progression (ChT activity and CCL18/PARC concentration) alongside appraisals of clinical symptoms and NP-C SI assessments.

The diagnostic approach in Period 1 was to sequence all exon and exon–intron boundaries of *NPC1* and *NPC2* in patients with suspected NP-C based on the presence of two or more typical signs/symptoms. All patients with two *NPC1* mutations, or a single *NPC1* mutation plus a positive filipin test, had elevated ChT activity and/or CCL18/PARC concentration. Ninety-eight patients without *NPC1* mutations did not show elevated ChT activity or CCL18/PARC concentration, but retrospective NP-C SI assessments showed that 42 of these patients had NP-C SI scores ≥70. Based on findings from Period 1, during period 2 we conducted *NPC1* and *NPC2* sequencing only in patients with elevated CCL18/PARC concentration and/or ChT activity, or with an NP-C SI ≥70 for all individuals >4 years old. During this second period, five patients with homozygous or compound-heterozygous *NPC1* mutations were successfully identified. Five carrier heterozygote patients with single *NPC1* variants and positive filipin test findings (classical or variant biochemical phenotypes) were also detected.

We observed the same NP-C detection rate (5/118; 4.2%) using the criteria of study Period 1 (i.e., *NPC1* and *NPC2* sequencing in all cases of suspected NP-C) as we did using the criteria of study Period 2 [i.e., *NPC1* and *NPC2* sequencing only when the ChT activity and/or CCL18/PARC concentration were elevated and/or NP-C SI was ≥70; 5/118 cases (4.2%)]. These findings suggest that the measurement of one or both of plasma ChT activity and CCL18 concentration in conjunction with

Table 4 Clinical disease characteristics of all patients

	NP-C positive (two <i>NPC1</i> mutations) (n = 10)	NP-C uncertain (one <i>NPC1</i> mutation) (n = 8)	NP-C negative (n = 218)
<i>Neurological symptoms, n (%)</i>			
Vertical supranuclear gaze palsy (VSGP)	3 (30%)	3 (37.5%)	58 (26.6%)
Gelastic cataplexy	0 (0%)	0 (0%)	7 (3.2%)
Ataxia, clumsiness or frequent falls	5 (50%)	3 (37.5%)	89 (40.8%)
Dysarthria and/or dysphagia	2 (20%)	3 (37.5%)	31 (14.2%)
Dystonia	1 (10%)	1 (12.5%)	55 (25.2%)
<i>Psychiatric symptoms present, n (%)</i>			
Pre-senile cognitive decline or dementia	2 (20%)	1 (12.5%)	76 (34.9%)
Psychotic symptoms (schizophrenia)	1 (10%)	0 (0%)	19 (8.7%)
Depression	3 (30%)	2 (25%)	49 (22.5%)
Bipolar disorders	1 (10%)	1 (12.5%)	12 (5.5%)
<i>Visceral symptoms, n (%)</i>			
Unexplained neonatal jaundice or cholestasis	1 (10%)	2 (25%)	12 (5.5%)
Unexplained splenomegaly ± hepatomegaly	6 (60%)	3 (37.5%)	15 (6.9%)
Hydrops fetalis or fetal ascites	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.5%)

Including those from both Periods 1 and 2

Table 5 In silico mutation predictions

Mutation	PolyPhen-2	SIFT	Mutation taster
p.(Leu107CfsX5)	NA	NA	Disease-causing
p.(Thr375Ala)	PrD (0.997)	Damaging (0.010)	Disease-causing
p.(Leu846Pro)	PrD (0.995)	Damaging (0.001)	Disease-causing
p.(Arg1173Gly)	PrD (0.999)	Damaging (0.007)	Disease-causing
p.(Arg1274Trp)	PrD (0.986)	Damaging (0.004)	Disease-causing
p.(Thr204Thr)	NA	Tolerated (0.703)	Disease-causing
c.(1947 + 10G > A)	NA	NA	Polymorphism

PolyPhen-2 score ranges from 0 to 1, with mutations qualitatively appraised as PrD (probably damaging), PoD (possibly damaging), or B (benign). MutationTaster analyses the probability that a variant will be disease-causing or is a polymorphism. SIFT scores range from 0 to 1: the amino acid substitution is predicted as damaging if the score is ≤ 0.05 , and tolerated if the score is > 0.05 . NA not possible to analyze

assessment of NP-C SI score in patients with suspected NP-C allows better targeting of in-depth confirmatory laboratory tests. A reduced number of patients were referred for confirmatory molecular-genetic testing, enabling decreases in both the time and costs associated with diagnosing NP-C.

Considering findings from both study periods together, although the majority of NP-C patients with two *NPC1* mutations had elevated levels of both ChT and CCL18/PARC, two subjects had a clear genetic diagnosis of NP-C but showed raised levels of only one of these biomarkers.

Across the two periods in the current study, we identified a total of six novel *NPC1* variants and 17 *NPC1*

mutations that have been described previously [2, 17, 30–36]. No causal *NPC2* mutations were detected. Eight of the patients examined in this study only had a single *NPC1* mutation, and it is considered highly likely that all of these patients are true cases of NP-C based on their clinical presentation, filipin staining findings, and plasma ChT, CCL18 and 7-KC values. It is possible that these patients also had a second point mutation that was not detectable with our sequencing and MLPA methodology. Alternatively, these mutations could have resulted from whole-gene deletions, intron sequence variants or mutations in other genes that could modify intra-lysosomal cholesterol transport. Full-gene sequencing is possible using next-generation methods, but this is likely to identify variants that are difficult to interpret.

We observed that patients with homozygous or compound-heterozygous *NPC1* mutations, as well as carriers of single *NPC1* mutations, had elevated ChT activity and CCL18/PARC concentration, although levels of these biomarkers were higher in NP-C positive patients than in 'NP-C uncertain' individuals. The existence of *CHIT1* polymorphisms associated with reduced ChT activity limits the usefulness of ChT as a biomarker in some patients [16]. Nonetheless, the combined analysis of both ChT and CCL18/PARC levels allowed the identification of four additional patients with lysosomal storage diseases: three patients with Niemann-Pick disease type B and one with GD.

The NP-C SI, which was developed in 2012, was applied retrospectively to individuals assessed during Period 1 and prospectively in those assessed during Period 2 in order to

gain a complete set of diagnostic data. This clinical tool has shown promise in aiding the diagnosis of NP-C in previous studies [6]. However, we observed high prediction scores (≥ 70) in 79 of all included patients >4 years old in the current cohort, in which only six patients had a confirmed diagnosis of NP-C. While several patients in this cohort had high NP-C SI scores as well as clinical signs associated with NP-C (VSGP and splenomegaly), genetic analyses did not reveal any *NPC1* or *NPC2* mutations. Conversely, the NP-C SI cut-off value of 70, recommended as an indicator for additional diagnostic tests, could have led to non-detection of NP-C in two patients who had scores of 60 and 20. The measurement of plasma ChT activity and CCL18/PARC concentration as well as NP-C SI assessments allowed us to confirm a total of eight NP-C diagnoses. In addition, two patients in whom the NP-C SI was not applicable due to their age (<4 years) were detected based on biomarker measurements alone.

It should be borne in mind that elevations in CCL18/PARC concentration are not exclusively caused by lysosomal disorders. CCL18/PARC is a circulating chemokine that plays a role in injury healing, physiological homing of mononuclear blood cells, and inflammatory responses [37]. Indeed, some studies have indicated that CCL18/PARC is expressed in atherosclerotic plaques, and represents an independent risk predictor of short-term mortality in patients with acute coronary syndromes [38]. The lack of correlation between CCL18/PARC levels and NP-C SI scores in this study might therefore be due to the presence of other concomitant pathologies such as cardiovascular disease, which are not considered in the NP-C SI.

The filipin test was performed in as many patients as possible in this cohort, and all tested patients with one or two *NPC1* mutations showed a classical or variant filipin staining pattern, respectively. However, it is interesting to note that not all carriers of single *NPC1* mutations who had a positive filipin result exhibited elevated plasma 7-KC concentrations, whereas all patients with two *NPC1* mutations had 7-KC levels above the control cut-off value in our laboratory. It is also notable that family studies addressing ChT/CCL18/7-KC biomarkers in conjunction with the NP-C SI, filipin testing and subsequent gene sequencing led to the identification of a further three NP-C patients, and enabled the validation of two new causal *NPC1* variants (p.(Arg1173Gly) and p.(Thr375Ala)).

This investigation has several limitations and strengths that should be taken into account in interpreting the reported findings. Although the inclusion of patients with two typical NP-C symptoms might be considered a bias for having a high NP-C SI score, it should be noted that this study was started in 2010, and the symptoms required for inclusion in this work

were specified before the NP-C SI was developed and published in 2012 [6]. Such a bias was therefore not possible. Secondly, we did not sequence all individuals with suspected NP-C who had plasma ChT activity or CCL18/PARC concentration less than the mean control value (plus two SDs). However, we did conduct NP-C gene sequencing and MLPA in all individuals with an NP-C SI ≥ 70 or who were <4 years old. Thirdly, the sequencing techniques that we employed only covered the coding regions of the *NPC1* and *NPC2* genes and their intron–exon boundaries, and therefore might not have detected regulatory and deep intronic splicing mutations. It is also possible that some novel mutant NP-C gene alleles might not yet have been characterized, and therefore may be present (but go undetected) among ‘NP-C uncertain’ or even ‘NP-C negative’ individuals. Finally, the genetic diagnosis of NP-C requires the identification of clearly pathogenic mutations, while many families have ‘private’ sequence variants that have not yet been reported/published. While in silico protein and splicing prediction tools can be employed to assist in assigning pathogenicity to sequence variants resulting from missense or intronic changes, decisions regarding the pathogenicity of novel, private mutations are generally very difficult to make.

Conclusion

We conclude that plasma ChT activity and CCL18/PARC concentration measurements in patients with suspected NP-C based on their clinical symptomatology can help pave the way to conducting specific, confirmatory laboratory tests. This approach can be very useful for laboratories that do not have mass spectrometry facilities and therefore they cannot use other NP-C biomarkers such lyso-sphingomyelin-509 or bile acids. Patients with a plasma ChT activity and/or plasma CCL18/PARC concentration greater than two SDs beyond control values and an NP-C SI score ≥ 70 should undergo *NPC1* and *NPC2* gene sequencing as standard. In addition, identification of two pathogenic NP-C gene mutations that segregate in the family should be considered sufficient for at least an initial diagnosis.

Additional files

Additional file 1. Patient questionnaire.

Additional file 2. Filipin staining methodology.

Abbreviations

7-KC: 7-ketocholesterol; CHIT1: c.1049_1072dup24 polymorphism of the ChT gene; CCL18/PARC: chemokine (C–C motif) ligand 18/pulmonary and activation-regulated chemokine; ChT: chitotriosidase; ELISA: enzyme-linked

immunosorbent assay; ERT: enzyme replacement therapy; EVS: exome variant server; GBA: glucocerebrosidase; GD: Gaucher disease; HGVS: Human Genome Variation Society; MLPA: multiplex ligation-dependent probe amplification; NCBI: National Center for Biotechnology Information; LOD: limits of detection; LC-MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LDL: low-density lipoprotein; MLPA: multiplex ligation-dependent probe amplification; NP-C: Niemann Pick disease type C; NPC1/NPC2: NP-C disease-causing genes 1 and 2; NP-C SI: NP-C suspicion index; SD: standard deviation; SMDP1: acid sphingomyelinase gene; VSGP: vertical supranuclear gaze palsy.

Authors' contributions

Study conception and design: MP. Drafting the article or revising it critically for important intellectual content: ICO, PI, CD, MP. Acquisition, analysis or interpretation of data: ICO, PI, JJC, MM, MJP, PM, VRS. Obtained funding: MP, CD. The members of the Spanish NPC Group (see Acknowledgements) provided patient samples and/or clinical data. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Department of Biochemistry and Molecular and Cellular Biology, Faculty of Science, University of Zaragoza, C. Pedro Cerbuna 12, 50009 Saragossa, Spain. ² Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón), Saragossa, Spain. ³ Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Saragossa, Spain. ⁴ Spanish Foundation for the Study and Therapy of Gaucher Disease, Saragossa, Spain. ⁵ Biochemistry and Molecular Biology Research Centre for Nanomedicine, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain.

Acknowledgements

Matthew Reilly Ph.D. at InTouch Medical Ltd provided editorial support in the preparation of this manuscript for publication.

The Spanish NPC Group includes all physicians who provided patient samples and clinical data for the study (see Additional file 1 for full listing).

The Spanish NP-C Group: Alejandro Bustamante, Irene Perez Ortega, Pablo Mir Rivera, Alfredo Palomino, Maité Caceres, Silvia Jesus Maestre and Enrique Calderon (Hospital Virgen del Rocío, Sevilla); Juan Jesus Rodriguez Uranga, Juan Bautista Lorite and M^a Dolores Gomez Bustos (Clinica Sagrado Corazón, Sevilla); Jose M. Garcia Moreno (Hospital Virgen de la Macarena, Sevilla); Teresa Bermejo Gonzalez (Instituto Insalense Pediatría, Sevilla); Alfredo Muñoz (SAS Jerez, Jerez); Manuel Romero Acebal (Hospital Clinico Universitario de Málaga, Málaga); Rocio Calvo Medina, Juliana Serrano Nieto, Esmeralda Nuñez (Hospital Carlos Haya, Málaga); Carlos Sierra (Hospital Materno Infantil, Málaga); Mercedes Gil Campos, Rafael Fernandez de la Puebla, Juan José Ochoa Sepulveda, Eduardo Lopez Laso (Hospital Reina Sofía, Cordoba); Asuncion Maestre (Complejo Hospitalario de Jaen, Jaen); Myriam Ley Martos, Pamela Zafra, Servando Pantoja Rosso, Raul Espinosa Rosso, M^a Jesus Salado Reyes (Hospital Puerta del Mar, Cadiz); Luisa Arrabal Fernandez, Angel Ortega Moreno, Cristobal Carnero Pardo (Virgen de las Nieves Hospital, Granada); Alejandro Martin (Hospital Clinico de Salamanca, Salamanca); Jordi Alom Poveda (Hospital General Universitario de Elche, Alicante); Belén Nacimiento Cantero (Hospital Puerta del Hierro, Madrid); Pedro Garcia Ruiz, María Rodrigo (Fundacion Jimenez Diaz, Madrid); Ignacio Posada, Alvaro Sanchez Ferro, Jesús Hernandez Gallego, Alberto Villarejo, Alejandro O. Herrero San Martin (Hospital 12 Octubre, Madrid); Asuncion Garcia Perez (Fundacion Alcorcon, Madrid); Francisco Javier Rodriguez de Rivera, Irene Sanz, Fernando Santos (Universitario la Paz, Madrid); Luis Gutierrez-Solana (Hospital Niño Jesus, Madrid); Carmen Fontan, Susana Cantarero Duque (Hospital de Mostoles, Madrid); Dr. Rafael Martinez Leal (Hospital Villablanca, Reus); Josep Gamez, Esteve Santamaría, Mireia del Toro (Hospital Vall d'Hebron, Barcelona); Tania Delgado, Isabel Lorente (Parc Tauli; Sabadell, Barcelona); Alberto Lleó, Javier Pagonabarraga, Marc Suarez Calvet, Eulalia Turón, Elisenda Moliner, Berta Pascual (Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona); Consuelo Almenar (Hospital Benito Menni. Sant Boi de Llobregat, Barcelona); Anna Olivé Torralba, Robert Misericordia Floriach (Hospital, Mare de Déu de la Merce, Barcelona); Nilda Venegas Bernal (Parc Sanitari SJD, Barcelona); M^a Dolores Lopez Villegas; Luis Planellas Giné (Hospital del Mar, Parc de Salut Mar, Barcelona); Benet Nomdedeu, M^a Jose Martí, M^a Teresa Boujnorno Domenech (Hospital Clinic, Barcelona); Jordi Gascón (Hospital, Mare de Déu de la Merce, Barcelona); Joan Costa, Carmen Fons, Mercedes Pineda (Hospital San Juan de Dios, Esplugues, Barcelona); M^a Teresa Abellan Vidal, Emili Mira (Parc Salut Mar Sta, Coloma); Juan Pablo Tartari (Mutua Terrasa, Terrasa); Roser Castilla Aparici (Psiquiàtric Sagrado

Corazon, Martorell); Antonio Arevalo Sanchez (Hospital Sagrat Cor, Martorell); Marc Boix Codony, M^a Antonia Alberti (Hospital Arnau de Vilanova, Lleida); Gerard Piñol Ripoll (Hospital Provincial Santa Maria, Lleida); Ramon Modol (Hospital San Juan de Dios, Almacelles, Lleida); David Genis (Hospital Dr Josep Trueta, Girona); Rafael Sivera, Juan Fco Vazquez Costa, Irene Martinez, Patricia Smeyers, Tomas Vila, Bonaventura Casanova, Francisco Carlos Perez Miralles, Jaime Dalmau Serra, Juan Fco Vazquez Costa, Isidro Vitoria Miñana (Hospital La Fe, Valencia); Caridad Valero Merino (Hospital Arnau de Vilanova, Valencia); Ribas Garcia, Raquel, Margarita Simo Jorda (Hospital Dr Peset, Valencia); Juana Clavel (Hospital de Castellón, Castellón); Carlos Leiva Santana (Hospital General Universitario de Alicante, Alicante); Jose Luis Capablo, Jose Gazulla (Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza); Pablo Padilla (Centro Neuropsiquiátrico Nuestra Señora del Carmen, Zaragoza); Carmen Loureiro, Carmen Navarro Fdez-Balbuen (C.H.U. Vigo, Meixoeiro, Vigo); Manuel Arias; M^a José Rabuñal (CHU de Santiago, Coruña); M^a Jesus Sobrido (Hospital San Rafael, Coruña); M^a Teresa Cia, M^a Eugenia Yoldi (Hospital Virgen del Camino, Pamplona); M^a Elena Erro, Ariadna Fontes (Complejo Hospitalario Navarra, Pamplona); Idoia Rouco Axpe, Francisco Javier Ezkurida Sasieta, Juan Carlos Gomez Esteban (Hospital de Cruces, Vizcaya); Jose A Suarez Muñoz (Hospital Dr. Negrin, LPGC); Norberto Rodriguez Espinosa (Hospital Universitario Virgen Candelaria, Tenerife); Miguel Angel Hernandez, Ingrid Tejera Martin (Hospital Nuestra Señora Candelaria, Tenerife); Alberto Fuentes Garrido (CSM Otero, Ceuta); Dr. Rafael Aporta (Hospital Univ. Ceuta, Ceuta); Rosario Domingo (Hospital Virgen Arrixaca, Murcia); Ignacio Casado Naranjo (Hospital San Pedro Alcantara, Caceres); M^a Angeles Ruiz Gomez, Guillermo Amer Ferrer (Hospital Son Espases, Palma, Mallorca).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests. No funding organization played any role in the study design, the collection, analysis and interpretation of data, or in the decision to submit the article for publication.

Availability of data and materials

The datasets during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

Written informed consent was obtained from all patients or their guardians before they underwent any study-related procedures. The study protocol was approved by the Aragon Experimental Ethical Committee (CEICA) in Spain, and was developed in accordance with the 1975 Helsinki declaration, as revised in 2000.

Funding

This work was supported by Grants from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias. FIS PI12/01219, Fundación para el Estudio y Terapéutica de la Enfermedad de Gaucher (FEETEG), and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), which is an initiative of the Carlos III Institute of Health (ISCIII).

Received: 2 November 2016 Accepted: 9 February 2017

Published online: 21 February 2017

References

- Vanier MT. Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:16.
- Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, Loftus SK, Zhang D, Cummings C, et al. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science*. 1997;277:228–31.
- Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H, Fensom A, Vanier MT, Wattiaux R, et al. Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science*. 2000;290:2298–301.
- Patterson MC, Hendriksz CJ, Walterfang M, Sedel F, Vanier MT, Wijburg F, et al. Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: an update. *Mol Genet Metab*. 2012;106:330–44.
- Kelly DA, Portmann B, Mowat AP, Sherlock S, Lake BD. Niemann-Pick disease type C: diagnosis and outcome in children, with particular reference to liver disease. *J Pediatr*. 1993;123:242–7.

6. Wijburg FA, Sedel F, Pineda M, Hendriks CJ, Fahey M, Walterfang M, et al. Development of a suspicion index to aid diagnosis of Niemann-Pick disease type C. *Neurology*. 2012;78:1560–7.
7. Jiang X, Sidhu R, Porter FD, Yanjanin NM, Speak AO, te Vrugte D, et al. A sensitive and specific LC-MS/MS method for rapid diagnosis of Niemann-Pick C1 disease from human plasma. *J Lipid Res*. 2011;52:1435–45.
8. McKay K, Gissen P. Genetic and laboratory diagnostic approach in Niemann-Pick disease type C. *J Neurol*. 2014;261(Suppl 2):569–75.
9. Vanier MT, Rodriguez-Lafraese C, Rousson R, Gazzah N, Juge MC, Pentchev PG, et al. Type C Niemann-Pick disease: spectrum of phenotypic variation in disruption of intracellular LDL-derived cholesterol processing. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1096:328–37.
10. Argoff CE, Comly ME, Blanchette-Mackie J, Kruth HS, Pye HT, Goldin E, et al. Type C Niemann-Pick disease: cellular uncoupling of cholesterol homeostasis is linked to the severity of disruption in the intracellular transport of exogenously derived cholesterol. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1096:319–27.
11. Tangemo C, Weber D, Theiss S, Mengel E, Runz H. Niemann-Pick Type C disease: characterizing lipid levels in patients with variant lysosomal cholesterol storage. *J Lipid Res*. 2011;52:813–25.
12. Hollak CE, van Weely S, van Oers MH, Aerts JM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest*. 1994;93:1288–92.
13. Guo Y, He W, Boer AM, Wevers RA, de Bruijn AM, Groener JE, et al. Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders. *J Inher Metab Dis*. 1995;18:717–22.
14. Renkema GH, Boot RG, Au FL, Donker-Koopman WE, Strijland A, Muijsers AO, et al. Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur J Biochem/FEBS*. 1998;251:504–9.
15. Ries M, Schaefer E, Luhrs T, Mani L, Kuhn J, Vanier MT, et al. Critical assessment of chitotriosidase analysis in the rational laboratory diagnosis of children with Gaucher disease and Niemann-Pick disease type A/B and C. *J Inher Metab Dis*. 2006;29:647–52.
16. Irun P, Alfonso P, Aznarez S, Giraldo P, Pocovi M. Chitotriosidase variants in patients with Gaucher disease. Implications for diagnosis and therapeutic monitoring. *Clin Biochem*. 2013;46:1804–7.
17. Yamamoto T, Nanba E, Ninomiya H, Higaki K, Taniguchi M, Zhang H, et al. NPC1 gene mutations in Japanese patients with Niemann-Pick disease type C. *Hum Genet*. 1999;105:10–6.
18. Schutyser E, Richmond A, Van Damme J. Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes. *J Leukoc Biol*. 2005;78:14–26.
19. Boot RG, Verhoek M, de Fost M, Hollak CE, Maas M, Bleijlevens B, et al. Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention. *Blood*. 2004;103:33–9.
20. Chang KL, Hwu WL, Yeh HY, Lee NC, Chien YH. CCL18 as an alternative marker in Gaucher and Niemann-Pick disease with chitotriosidase deficiency. *Blood Cells Mol Dis*. 2010;44:38–40.
21. Pineda M, Perez-Poyato MS, O'Callaghan M, Vilaseca MA, Pocovi M, Domingo R, et al. Clinical experience with miglustat therapy in pediatric patients with Niemann-Pick disease type C: a case series. *Mol Genet Metab*. 2010;99:358–66.
22. Lin N, Zhang H, Qiu W, Ye J, Han L, Wang Y, et al. Determination of 7-ketocholesterol in plasma by LC-MS for rapid diagnosis of acid S-mase-deficient Niemann-Pick disease. *J Lipid Res*. 2014;55:338–43.
23. Porter FD, Scherrer DE, Lanier MH, Langmade SJ, Molugu V, Gale SE, et al. Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease. *Sci Transl Med*. 2010;2:56.
24. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7:248–9.
25. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4:1073–81.
26. Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. 2010;7:575–6.
27. Brunak S, Engelbrecht J, Knudsen S. Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *J Mol Biol*. 1991;220:49–65.
28. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol*. 1997;4:311–23.
29. Baila-Rueda L, Cenario A, Cofán M, Orera I, Barcelo-Batlloiri S, Pocovi M. Simultaneous determination of oxysterols, phytosterols and cholesterol precursors by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry in human serum. *Anal Methods*. 2013;5:2249–57.
30. Fernandez-Valero EM, Ballart A, Iturriaga C, Lluch M, Macias J, Vanier MT, et al. Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: genotype-phenotype correlations. *Clin Genet*. 2005;68:245–54.
31. Millat G, Bailo N, Molinero S, Rodriguez C, Chikh K, Vanier MT. Niemann-Pick C disease: use of denaturing high performance liquid chromatography for the detection of NPC1 and NPC2 genetic variations and impact on management of patients and families. *Mol Genet Metab*. 2005;86:220–32.
32. Millat G, Marçais C, Tomasetto C, Chikh K, Fensom AH, Harzer K, et al. Niemann-Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop. *Am J Hum Genet*. 2001;68:1373–85.
33. Greer WL, Riddell DC, Murty S, Gillan TL, Girouard GS, Sparrow SM, et al. Linkage disequilibrium mapping of the Nova Scotia variant of Niemann-Pick disease. *Clin Genet*. 1999;55:248–55.
34. Park WD, O'Brien JF, Lundquist PA, Kraft DL, Vockley CW, Karnes PS, et al. Identification of 58 novel mutations in Niemann-Pick disease type C: correlation with biochemical phenotype and importance of PTC1-like domains in NPC1. *Hum Mutat*. 2003;22:313–25.
35. Ribeiro I, Marcao A, Amaral O, Sa Miranda MC, Vanier MT, Millat G. Niemann-Pick type C disease: NPC1 mutations associated with severe and mild cellular cholesterol trafficking alterations. *Hum Genet*. 2001;109:24–32.
36. Tarugi P, Ballarini G, Bembì B, Battisti C, Palmeri S, Panzani F, et al. Niemann-Pick type C disease: mutations of NPC1 gene and evidence of abnormal expression of some mutant alleles in fibroblasts. *J Lipid Res*. 2002;43:1908–19.
37. De Sutter J, Struyf S, Van de Veire NR, Philippe J, De Buyzere M, Van Damme J. Cardiovascular determinants and prognostic significance of CC Chemokine Ligand-18 (CCL18/PARC) in patients with stable coronary artery disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;49:894–6.
38. De Jager SCA, Bongaerts BWC, Weber M, Kraaijeveld AO, Rousch M, Dimmeler S, et al. Chemokines CCL3/MIP1 α , CCL5/RANTES and CCL18/PARC are independent risk predictors of short-term mortality in patients with acute coronary syndromes. *PLoS ONE*. 2012;7:e45804.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Supplement 1. Patient questionnaire

PATIENT DATA (or relative, please specify the relationship).

Name:

Data of birth:

Place of birth:

Age of onset:

Gender: M/F

Weight: ___ Kg

Height: ___ cm

CLINICAL PROFILE

Visceral affectation

Hepatomegaly of ___ cm by ecography or physical exploration

Splenomegaly of ___ cm by ecography or physical exploration

Ascites at birth: Yes No

Jaundice at birth: Yes No

Neurological affectation

Age of onset:

Dementia: Yes No

Depression: Yes No

Cataplexy: Yes No

Gelastic seizures: Yes No

Bipolar disorder: Yes No

Schizophrenia: Yes No

Ataxia: Yes No

Dystonia: Yes No

Ophthalmic affectation

Cherry stain (Exclusion criterion): Yes No

Vertical supranuclear gaze palsy: Yes No

Ophthalmoplegia supranuclear: Yes No

Explorations

EEG: Yes No

CT scan: Yes No

Evoked potentials: Yes No

Biochemical analytical

Glucose: ___ mg/dL

Creatinine: ___ mg/dL

Cholesterol: ___ mg/dL

Triglycerides: ___ mg/dL

ALT: ___ U/L

AST: ___ U/L

GGT: ___ U/L

D Bilirubin: ___ mg/dL

Alkaline phosphatase: ___ U/L

Hb: ___ g/dL

Hematocrit: ___ %

Platelets: ___ x10⁹/L

Leukocytes: ___ x10⁹/L

Vacuolated Lymphocytes: ___ %

Supplement 2. Filipin staining methodology

Fibroblasts were seeded at a density of 90,000 cells/well on coverslips at the bottom of 12-well dishes and incubated for 24 h in Minimum Essential Media (MEM) with 10% FCS, after which they were switched to MEM/10% lipoprotein-deficient serum (LPDS) medium (Millipore Ibérica, Madrid, Spain), with incubation for 48 h to deplete cell membranes of sterols. The fibroblast preparations were then incubated for 24 h in fresh medium containing LDL (50 mg/mL) (Millipore Ibérica, Madrid, Spain) to load lysosomes with cholesterol. After 24 h, the cells were washed twice with PBS and fixed in 3% paraformaldehyde for 15 min, followed by three more PBS washes, and paraformaldehyde was quenched by 10-min incubation in 20 mM glycine–PBS. Cells were then stained with 25 µg/mL Filipin III (sigma Aldrich Quimica, Madrid, Spain) in PBS (Sigma Aldrich Quimica, Madrid, Spain) for 2 h, with the coverslips protected from light, and washed a further three times. Coverslips were mounted on microscope slides with fluorescence microscope mounting medium (Dako Diagnósticos, Sant Just Desvern, Spain). Cells were observed with the UV filter set in a Nikon Eclipse Ti epifluorescence microscope (Niko Instruments Europe, Amstelveen, the Netherlands).

9.4 Patentes derivadas

1. (WO2004067740) (EP1589104B1) Procedimiento y dispositivo de detección de mutaciones en secuencias génicas aisladas del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL-r) asociado con la Hipercolesterolemia Familiar. 2004.

Inventores: Mata, P.; Alonso, R.; Mozas, P.; Reyes, G.; Pocoví, M.; Castillo, S.; Tejedor, D.; Martínez, A.; **MALLÉN PÉREZ, Miguel**

2. (WO2006067254) Método y dispositivo in vitro de diagnóstico de Hipercolesterolemia Familiar basado en la detección de mutaciones en la secuencia del gen del receptor de lipoproteínas de baja densidad (r-LDL).2006.

Inventores: Pocoví M, Castillo S, **MALLÉN PÉREZ, Miguel**, Tejedor D, Martínez A.

3. (WO2006075039) Método de diagnóstico in vitro de hipercolesterolemia familiar mediante detección de reordenamientos génicos. 2006.

Inventores: Lopez M, Martín B, Tejedor D, Jiménez E, **MALLÉN PÉREZ, Miguel**, Martínez A, Pocoví M; Castillo S

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
12 de Agosto de 2004 (12.08.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/067740 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C12N 15/09,
C12Q 1/68

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2004/070001

(22) Fecha de presentación internacional:
21 de Enero de 2004 (21.01.2004)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200300206 28 de Enero de 2003 (28.01.2003) ES
P200302671
17 de Noviembre de 2003 (17.11.2003) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): EFARMES, S.A. [ES/ES]; Sardenya, 350, 08025
Barcelona (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): MATA
LOPEZ, Pedro [ES/ES]; Sardenya, 350, 08025
Barcelona (ES). ALONSO KARLEZI, Rodrigo, Al-
berto [ES/ES]; Sardenya, 350, 08025 Barcelona (ES).
MOZAS ALONSO, Pilar [ES/ES]; Sardenya, 350, 08025
Barcelona (ES). REYES LEAL, Gilberto [ES/ES]; Sar-
denya, 350, 08025 Barcelona (ES). POCovi MIERAS,
Miguel [ES/ES]; Sardenya, 350, 08025 Barcelona (ES).
CASTILLO FERNANDEZ, Sergio [ES/ES]; Sardenya,
350, 08025 Barcelona (ES). TEJEDOR HERNANDEZ,

Diego [ES/ES]; Sardenya, 350, 08025 Barcelona (ES).
MARTINEZ MARTINEZ, Antonio [ES/ES]; Sardenya,
350, 08025 Barcelona (ES). MALLEn PEREZ, Miguel
[ES/ES]; Sardenya, 350, 08025 Barcelona (ES).

(74) Mandatario: ELZABURU, Alberto, de; Miguel Angel,
21, 28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR THE DETECTION OF MUTATIONS IN ISOLATED GENE SEQUENCES OF THE LOW-DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR (LDL-R) WHICH IS ASSOCIATED WITH FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA

(54) Título: PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN SECUENCIAS GÉNICAS AISLADAS DEL RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL-R) ASOCIADO CON LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

(57) Abstract: The invention relates to extracorporeal methods of analysing the presence or absence of mutations which cause familial hypercholesterolemia. The inventive methods describe the way in which said mutations can be detected using a DNA sample from an individual and comprising the following: chain reaction of the polymerase with primers which are complementary to the low-density lipoprotein receptor gene; analysis of the amplified product by sequencing; restriction analysis; single strand conformation polymorphism techniques; heteroduplex analysis and analysis of a device on top of a biochip glass support on which oligonucleotide probes are disposed, which can be used to detect the aforementioned mutations in the DNA.

(57) Resumen: La invención describe métodos extracorpóreos para analizar la presencia o ausencia de mutaciones causantes de hipercolesterolemia familiar. Los métodos indican la forma de detectar estas mutaciones a partir de una muestra de ADN de un individuo y utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores complementarios al gen del receptor de las lipoproteínas de baja densidad, el análisis del producto amplificado por secuenciación, análisis de restricción, técnicas de los polimorfismos de conformación de cadena sencilla, análisis de heterodúplex y de un dispositivo sobre un soporte de vidrio "biochip" en el que se depositan sondas de oligonucleótidos que permite detectar estas mutaciones en el ADN.

WO 2004/067740 A1



Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad

Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
29 de Junio de 2006 (29.06.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/067254 A3

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2005/070160
- (22) Fecha de presentación internacional:
23 de Noviembre de 2005 (23.11.2005)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P200403041
21 de Diciembre de 2004 (21.12.2004) ES
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): LACER, S.A. [ES/ES]; C/ Cerdeña 350, E-08025 Barcelona (ES).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): POCOVÍ MIERAS, Miguel [ES/ES]; C/ Cerdeña 350, E-08025 Barcelona (ES). TEJEDOR HERNÁNDEZ, Diego [ES/ES]; C/ Cerdeña 350, E-08025 Barcelona (ES). CASTILLO FERNÁNDEZ, Sergio [ES/ES]; C/ Cerdeña 350, E-08025 Barcelona (ES). MALLEN PÉREZ, Miguel [ES/ES]; C/ Cerdeña 350, E-08025 Barcelona (ES). MARTÍNEZ MARTÍNEZ, Antonio [ES/ES]; Cerdeña 350, E-08025 Barcelona (ES).
- (74) Mandatario: ELZABURU, Alberto De; ELZABURU, S.A., Miguel Angel, 21, E-28010 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:
— con informe de búsqueda internacional
— antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones
— con la parte de lista de secuencias de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible por medio de la Oficina Internacional previa petición
- (88) Fecha de publicación del informe de búsqueda internacional: 2 de Noviembre de 2006

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR THE IN VITRO DIAGNOSIS OF FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA, BASED ON THE DETECTION OF MUTATIONS IN THE GENE SEQUENCE OF THE LOW-DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR (LDLR)

(54) Título: MÉTODO Y DISPOSITIVO IN VITRO DE DIAGNÓSTICO DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR BASADO EN LA DETECCIÓN DE MUTACIONES EN LA SECUENCIA DEL GEN DEL RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (r-LDL)

(57) Abstract: Certificate of addition to patent number 200300206 for a method and device for the detection of mutations in isolated gene sequences of the low-density lipoprotein receptor (LDLR) which is associated with familial hypercholesterolemia. The invention relates to extracorporeal methods of analysing the presence or absence of 12 mutations which cause familial hypercholesterolemia. The inventive methods describe the way in which said mutations can be detected using a DNA sample from an individual and comprising the following: chain reaction of the polymerase with primers which are complementary to the low-density lipoprotein receptor gene; analysis of the amplified product by sequencing; restriction analysis; single strand conformation polymorphism techniques; heteroduplex analysis and analysis of a device on top of a biochip glass support on which oligonucleotide probes are disposed, which can be used to detect the aforementioned 12 mutations in the DNA.

(57) Resumen: Certificado de adición a la patente 200300206 para un: Procedimiento y Dispositivo de Detección de Mutaciones en Secuencias Génicas Aisladas del Receptor de Lipoproteínas de Baja Densidad (r-LDL) asociado con la Hipercolesterolemia Familiar. La invención describe métodos extracorpóreos para analizar la presencia o ausencia de doce mutaciones causantes de hipercolesterolemia familiar. Los métodos indican la forma de detectar estas mutaciones a partir de una muestra de ADN de un individuo y utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores complementarios al gen del receptor de las lipoproteínas de baja densidad, el análisis del producto amplificado por secuenciación, análisis de restricción, técnicas de los polimorfismos de conformación de cadena sencilla, análisis de heterodúplex y de un dispositivo sobre un soporte de vidrio "biochip" en el que se depositan sondas oligonucleotídicas que permiten detectar estas doce mutaciones en el ADN.



*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
20 de Julio de 2006 (20.07.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/075039 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 15/12 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)

(74) Mandatario: ELZABURU, Alberto De; ELZABURU, S.A., Miguel Angel, 21, E-28010 Madrid (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2005/070161

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Fecha de presentación internacional:
23 de Noviembre de 2005 (23.11.2005)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200500053 13 de Enero de 2005 (13.01.2005) ES

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): LACER, S.A. [ES/ES]; C/ Cerdeña 350, E-08025 Barcelona (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): LÓPEZ MARTÍNEZ, Mónica [ES/ES]; C/ Cerdeña 350, E-08025 Barcelona (ES). MARTÍN AZNAR, Beatriz [ES/ES]; C/ Cerdeña 350, E-08025 Barcelona (ES). TEJEDOR HERNÁNDEZ, Diego [ES/ES]; C/ Cerdeña 350, E-08025 Barcelona (ES). JIMENEZ URIBE, Elisa [ES/ES]; C/ Cerdeña 350, E-08025 Barcelona (ES). MALLEN PÉREZ, Miguel [ES/ES]; C/ Cerdeña 350, E-08025 Barcelona (ES). CASTILLO FERNÁNDEZ, Sergio [ES/ES]; C/ Cerdeña 350, E-08025 Barcelona (ES). MARTÍNEZ MARTÍNEZ, Antonio [ES/ES]; C/ Cerdeña 350, E-08025 Barcelona (ES). POCOVÍ MIERAS, Miguel [ES/ES]; C/ Cerdeña 350, E-08025 Barcelona (ES).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional
— con la parte de lista de secuencias de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible por medio de la Oficina Internacional previa petición

(88) Fecha de publicación del informe de búsqueda internacional: 19 de Abril de 2007

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: METHOD FOR THE *IN VITRO* DIAGNOSIS OF FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA, COMPRISING THE DETECTION OF GENE REARRANGEMENTS

(54) Título: MÉTODO DE DIAGNÓSTICO *IN VITRO* DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR MEDIANTE DETECCIÓN DE REORDENAMIENTOS GÉNICOS

(57) Abstract: The invention relates to a method for the *in vitro* diagnosis of familial hypercholesterolemia, comprising the detection of gene rearrangements. The inventive method comprises (i) the quantitative analysis of DNA fragments obtained by means of multiplex PCR which can be used to amplify a whole gene in the fluorescent labelling of said fragments and (ii) a comparison of the signals obtained with those corresponding to the gene without rearrangements. The method can be used both to detect hitherto-known deletions in the r-LDL gene and to identify hitherto-unknown deletions in said gene, which are also detailed in the invention.

(57) Resumen: Método de diagnóstico *in vitro* de hipercolesterolemia familiar mediante detección de reordenamientos génicos. El método se basa en el análisis cuantitativo de fragmentos de ADN obtenidos mediante PCR multiplex que permite amplificar la totalidad de un gen, en el marcaje fluorescente de dichos fragmentos y en la comparación de las señales obtenidas con las correspondientes al gen sin reordenamientos. El método permite tanto la detección de deleciones ya conocidas en el gen del r-LDL como la identificación de deleciones en este gen desconocidas hasta ahora, que son objeto también de la invención.



WO 2006/075039 A3

