

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

IMPLICACIÓN DEL CROMOSOMA X EN EL RETRASO
MENTAL HEREDITARIO: IDENTIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE GENES CANDIDATOS

ISABEL MARTÍNEZ GARAY

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 27 de Juliol de 2005 davant un tribunal format per:

- D^a. Rosa de Frutos Illán
- D. José María Millán Salvador
- D^a. Roser González Duarte
- D. Francesc Palau Martínez
- D^a. Carmen Nájera Mortes

Va ser dirigida per:

D. Kerstin Kutsche

D^a. M^a Dolores Moltó Ruiz

D. Francisco Martínez Castellano

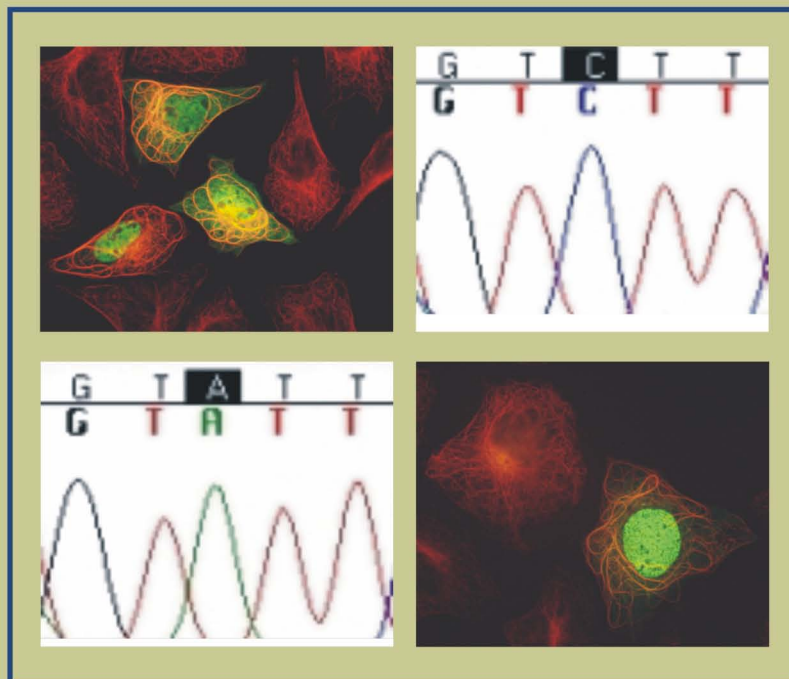
©Copyright: Servei de Publicacions
Isabel Martínez Garay

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6363-9

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

Implicación del Cromosoma X en el Retraso Mental Hereditario: Identificación y Caracterización de Genes Candidatos



TESIS DOCTORAL
Isabel Martínez Garay
Valencia, 2005

D^a Kerstin Kutsche, Prof. Dr. rer. nat. del Instituto de Genética Humana del Hospital Clínico Universitario de Hamburgo, D^o Francisco Martínez Castellano, Adjunto de la Unidad de Genética del Hospital La Fe de Valencia y D^a María Dolores Moltó Ruiz, Profesora Titular del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València,

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada "*Implicación del Cromosoma X en el Retraso Mental Hereditario: Identificación y Caracterización de Genes Candidatos*", ha sido realizada bajo su codirección en el Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas, por Isabel Martínez Garay, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universitat de València.

Y para que conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente certificado,

Hamburgo, a 5 de Abril de 2005.

Prof. Dr. Kerstin Kutsche

Valencia, a 7 de Abril de 2005.

Dr. Francisco Martínez

Dra. M^a Dolores Moltó

AGRADECIMIENTOS

Hay muchas personas que han contribuido a que esta tesis sea una realidad, y desde aquí quiero expresarles mi más sincero agradecimiento. Espero no olvidarme de ninguna.

En primer lugar quisiera dar las gracias a mis directores de tesis, los doctores Kerstin Kutsche, Francisco Martínez y M^a Dolores Moltó, por permitirme llevar a cabo este proyecto e iniciarme en el mundo de la investigación. Muchas gracias por la confianza que habéis depositado en mí y por apoyarme en todo momento.

Un agradecimiento especial merecen las familias que han participado en el proyecto, poniendo las muestras a nuestra disposición. Me hubiera gustado poder encontrar la causa del problema en todas ellas, siento que no haya podido ser así. Es muy difícil imaginar a lo que deben enfrentarse día a día; tuve la suerte de conocer a una de ellas, y quisiera expresar desde aquí también mi admiración por su valentía y su dedicación.

Muchas gracias también a todos los que han compartido laboratorio conmigo: a Jose, mi primer "jefe", a M^a Eugenia y Ester, por su alegría y su optimismo, a Juan Antonio, por sus consejos, su apoyo y por estar siempre ahí cuando lo necesitas, a Josep, por hacer más llevadero el día a día, con sus canciones, la discusión de las 12, etc. (no cambies!), a Ivette, por los buenos ratos que hemos pasado de "marujeo", a Amparo, mi primera colaboradora, y a Olga, por su ayuda, su apoyo y su simpatía, a Jose Luis, el "vampiro" del laboratorio, y a Nuria, sin cuya ayuda no creo que hubiera terminado a tiempo. Gracias también al resto de personas del departamento, las GMDeses, los Bioquímicos, etc, y a Rafa, Alicia, Pili, Zaida,...

También quiero expresar mi agradecimiento al personal de la Unidad de Genética de La Fe, en especial a Félix Prieto, por su continuo interés en este proyecto, y a Silves, por su inestimable ayuda con las muestras y la PCR cuantitativa.

Quiero dar las gracias a la gente del Institut für Humangenetik de Hamburgo: a Cordula, que me enseñó tantas cosas durante mi primer año allí, a Inka, que es mucho más que una compañera de laboratorio, a Georg, Marketa, Köms, Adrian, Verena, Ulrike, ... Y, por supuesto, a Andreas Gal, por permitirme trabajar allí durante tantos meses. Falls Ihr das hier irgendwann lesen solltet: vielen, vielen Dank!

A Ana Flores, por ahorrarme tantas esperas en Cultivo Celular; es una suerte encontrarse con personas así en el SCSIE. Al Servicio de Secuenciación.

Y, por supuesto, a la gente de Joves Investigadors: los "jornaleros": Martina, Pere, Jordi, Dani, Almudena y Raquel (además de Juan Antonio, Olga y Amparo), y el resto de implicados: Pepo, Virgilio, Arturo, Santi, Marta, Sergi, Gloria,... Vale la pena trabajar para la asociación sólo por conocer a gente de tanta valía, tanto en lo profesional como en lo personal. He aprendido mucho de y con vosotros, muchas gracias a todos. Espero que algún día deje de ser un lema para convertirse en una realidad: ¡Ningún Investigador Sin Contrato!

A mis padres y a mis hermanos, por su continuo apoyo, por su fe en mí y por aguantarme en los malos momentos. A mis abuelas, que son un ejemplo de decisión y valentía (Oma: te debo mucho de lo que he conseguido hasta ahora, espero que puedas sentirte satisfecha cuando alguien diga: "la crió su abuela"). Al resto de mi familia.

A Jordi. Gracias por estar siempre a mi lado (muchas veces a pesar de la distancia), por tu apoyo, por tu paciencia... no habría podido conseguirlo sin tí.

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

I. Retraso mental	1
I.1 Definición, clasificación, prevalencia y etiología	1
I.2 Retraso mental ligado al cromosoma X (RMLX)	3
II. Desarrollo neuronal	5
II.1 Conceptos básicos	5
II.2 Bases neurológicas del aprendizaje y la memoria	9
III. Genes implicados en RMLX	11
III.1 Estrategias para su identificación	11
III.2 Función de los genes de RMLX	14

OBJETIVOS	21
------------------	-----------

MATERIAL Y MÉTODOS

I. Muestras de los pacientes	23
I.1 Familia fELX72 con Síndrome de Coffin-Lowry (MIM 303600)	23
I.2 Familia fELX7 con Síndrome de Prieto (MIM 309610)	24
I.3 Familia fELX91 con Síndrome de Lenz (MIM 309800)	24
I.4 Familias con retraso mental inespecífico	25
I.5 Familia fELX20 con retraso mental inespecífico y retinosis pigmentaria	27
II. Material biológico	29
II.1 Cepas bacterianas	29
II.2 Líneas celulares eucariotas	29
III. Construcciones	29
IV. Oligonucleótidos	30
V. Enzimas, ácidos nucleicos, anticuerpos y kits	58
V.1 Enzimas de restricción	58
V.2 Polimerasas	58
V.3 Otros enzimas	58
V.4 Nucleótidos	58
V.5 Marcadores	58
V.6 Sondas	59
V.7 Membrana	59
V.8 RNA	59
V.9 Anticuerpos	59
V.10 Kits	59

VI. Medios, aditivos, tampones y disoluciones	60
VI.1 Medios y aditivos para el cultivo de bacterias	60
VI.2 Medios, tampones y aditivos para el cultivo de células eucariotas	60
VI.3 Tampones y disoluciones para la electroforesis en geles de agarosa	60
VI.4 Tampones y disoluciones para la electroforesis en geles de acrilamida	61
VI.5 Tampones para inmunofluorescencia	61
VI.6 Otros tampones	61
VII. Programas informáticos y bases de datos	62
VII.1 Programas informáticos	62
VII.2 Bases de datos	63
VIII. Métodos moleculares	64
VIII.1 Identificación de nuevos marcadores genéticos y análisis en la familia fELX7	64
VIII.1.1 Búsqueda de repeticiones de di- o trinucleótidos y diseño de cebadores	64
VIII.1.2 Análisis de los posibles marcadores en la familia fELX7	64
VIII.2 Análisis de mutaciones de los genes candidatos	64
VIII.2.1 Identificación de genes candidatos y diseño de cebadores	64
VIII.2.2 Amplificación de exones y fragmentos de cDNA por PCR	65
VIII.2.3 Análisis de SSCP	67
VIII.2.4 Purificación de productos de PCR	67
VIII.2.5 Clonación de productos de PCR y análisis de colonias	67
VIII.2.6 Extracción de DNA a partir de bandas de geles de agarosa	68
VIII.2.7 Secuenciación de fragmentos de DNA	68
VIII.2.8 Análisis de secuencias	69
VIII.2.9 Comprobación en los controles de los cambios hallados en los pacientes	69
VIII.3 Análisis cuantitativo de la expresión de los genes candidatos	70
VIII.3.1 Obtención de cDNA	70
VIII.3.2 PCR cuantitativa	70
VIII.3.3 Análisis de los resultados	71
VIII.4 Análisis de la expresión tisular del gen Lava por <i>Northern Blot</i>	73
VIII.4.1 Obtención de la sonda	73
VIII.4.2 Marcaje de la sonda con [α - ³² P]dCTP	73
VIII.4.3 Hibridación, lavados y revelado de la membrana	73
VIII.5 Análisis de localización subcelular del gen <i>FLJ14503</i>	73
VIII.5.1 Obtención de la pauta de lectura del gen <i>FLJ14503</i>	74
VIII.5.2 Modificación de la pauta de lectura mediante <i>Megaprime Mutagenesis</i>	75

VIII.5.3 Subclonación de las pautas de lectura clonadas en pCR2.1	
a pEGFP-C1 y pEGFP-N3	76
VIII.5.3.1 Digestión	76
VIII.5.3.2 Ligación	76
VIII.5.3.3 Transformación	76
VIII.5.3.4 Cultivo de bacterias y extracción del DNA plasmídico	77
VIII.5.4 Transfección de los clones pEGFP-C1 y pEGFP-N3 en células eucariotas	77
VIII.5.5 Inmunofluorescencia	77
VIII.6 Análisis por <i>Southern blot</i> de la mutación identificada en el paciente con Síndrome de Coffin-Lowry	78
VIII.6.1 Obtención de la membrana	78
VIII.6.2 Marcaje de la sonda	78
VIII.6.3 Hibridación, lavados y detección	78

RESULTADOS

I. Retraso mental inespecífico	79
I.1 Región Xp22	79
I.1.1 Definición de la región de ligamiento en la familia fELX2	79
I.1.2 Identificación de los genes comprendidos en el intervalo <i>RBBP7</i> - DXS1229	80
I.1.3 Búsqueda de mutaciones	89
I.1.4 Caracterización del gen <i>FLJ14503</i>	93
I.2 Región Xq24-q25	103
I.2.1 Definición de la región de ligamiento en la familia fELX101	102
I.2.2 Búsqueda de mutaciones	103
I.2.2.1 <i>AGTR2</i>	103
I.2.2.2 <i>GRIA3</i>	104
II. Síndrome de Coffin-Lowry: Identificación de una mutación patológica en el gen <i>RPS6KA3</i> en el paciente EX441	105
III. Síndromes de Prieto y Lenz: Región Xp11.4	109
III.1 Redefinición de la región de ligamiento en las familias fELX7 y fELX91	109
III.1.1 Familia fELX7	109
III.1.2 Familia fELX91	110
III.2 Identificación de los genes comprendidos en el intervalo DXS1056 - DXS1201	111
III.3 Análisis de mutaciones de los genes candidatos	118
III.4 Análisis del gen PQBP1 en la familia fELX91	123
III.5 Análisis cuantitativo de la expresión de los genes	125

III.5.1 Gen <i>BCOR</i>	126
III.5.2 Gen <i>ATP6AP2</i>	128
III.5.3 Gen <i>MGC39350</i>	129
III.5.4 Gen <i>CRSP2</i>	130
III.5.5 Gen <i>USP9X</i>	131
III.5.6 Gen <i>DDX3X</i>	132
III.6 Análisis del gen <i>LAVA</i>	133
DISCUSIÓN	
I. Retraso mental inespecífico	135
I.1 Región Xp22	135
I.1.1 Análisis de mutaciones	135
I.1.2 Análisis del gen <i>FLJ14503</i>	137
I.2 Región Xq24-q25	142
II. Síndrome de Coffin-Lowry	143
III. Síndrome de Prieto	146
III.1 Análisis de mutaciones	146
III.2 Análisis del gen <i>LAVA</i> : implicaciones	147
IV. Síndrome de Lenz	149
V. Discusión general	152
CONCLUSIONES	155
BIBLIOGRAFÍA	157

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I. Retraso Mental

I.1 Definición, clasificación, prevalencia y etiología

La sociedad actual valora la inteligencia como algo necesario, cuando no imprescindible, para alcanzar el éxito personal, pues permite desarrollar habilidades y destrezas que se emplean en todos los ámbitos de la vida diaria. Sin embargo, existe un porcentaje de la población que muestra una serie de dificultades en la adquisición de procesos cognitivos y adaptativos, y estas dificultades se agrupan bajo el término retraso mental. La **definición** de retraso mental más extendida en la actualidad es la propuesta por la Asociación Americana de Psiquiatría en su "Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-IV)" de 1994. Esta definición incluye tres criterios:

1. Cociente intelectual por debajo de 70, es decir, un rendimiento intelectual significativamente por debajo de la media.
2. Limitaciones en dos o más de las siguientes áreas de habilidades adaptativas:
 - comunicación: capacidad de comprender y de expresar información a través de conductas simbólicas (palabras habladas o escritas,...) o no simbólicas (expresión facial, movimiento corporal,...).
 - cuidado personal: habilidades relacionadas con el aseo, comida, vestido, higiene y apariencia personal.
 - vida en el hogar: habilidades relacionadas con el funcionamiento dentro del hogar (cuidado de la ropa, tareas del hogar, preparación de comidas, planificación, etc.).
 - habilidades sociales: iniciar, mantener y finalizar una interacción con otros, reconocer sentimientos, proporcionar retroalimentación positiva y negativa, etc.
 - uso de los servicios de la comunidad: transporte, comercios, uso de servicios públicos como escuelas, parques, etc.
 - autogobierno: elegir, aprender y seguir un horario, buscar ayuda cuando se necesita, resolver problemas en situaciones familiares y novedosas, etc.
 - salud y seguridad: habilidades relacionadas con el mantenimiento de la salud de uno, consideraciones básicas de seguridad (seguir reglas o leyes, uso de cinturón de seguridad, cruce de calles, etc.).
 - habilidades académicas funcionales: habilidades cognitivas y relacionadas con aprendizajes escolares que tengan aplicación directa en la vida personal (escritura, lectura, matemáticas básicas,...).
 - ocio: desarrollo de intereses variados de ocio y recreativos, individuales o colectivos.
 - trabajo: habilidades relacionadas con tener un trabajo o trabajos a tiempo completo o parcial en la comunidad (finalizar tareas, cumplir un horario, ida y vuelta al trabajo, etc.).

3. Manifestación antes de los 18 años de edad.

Se debe tener en cuenta que, para poder aplicar esta definición, es esencial considerar las cuatro premisas siguientes:

- Una evaluación válida ha de tener en cuenta la diversidad cultural y lingüística, así como las diferencias en los modos de comunicación y en factores comportamentales.
- Las limitaciones en habilidades adaptativas se manifiestan en entornos comunitarios típicos para todos los iguales en edad del sujeto y reflejan la necesidad de apoyos individualizados.

- Junto a limitaciones adaptativas específicas existen a menudo capacidades en otras habilidades adaptativas o capacidades personales.
- Si se ofrecen los apoyos apropiados durante un periodo prolongado, el funcionamiento en la vida de la persona con retraso mental mejorará generalmente.

No todas las personas afectadas de retraso mental lo están con la misma gravedad, por lo que debe existir una **clasificación** que permita diferenciar unos casos de otros. Según los criterios del ICD-10 (*International Classification of Diseases, 10th revision*) de la Organización Mundial de la Salud (<http://www3.who.int/icd/vol1htm2003/fr-irc.htm>), el retraso mental (RM) puede clasificarse de la siguiente forma según su gravedad:

Grado de RM	IQ	Equivalente en edad (en años)	Características
Leve	50 - 69	9 - < 12	Algunas dificultades de aprendizaje en la escuela. Muchos adultos son capaces de trabajar, mantener buenas relaciones sociales y contribuir a la sociedad
Moderado	35 - 49	6 - < 9	Retraso marcado del desarrollo en la infancia, pero la mayoría pueden aprender a desarrollar un cierto grado de independencia en el cuidado personal, así como habilidades académicas y de comunicación. Los adultos necesitarán distintos niveles de ayuda para vivir y trabajar en la comunidad.
Grave	20 - 34	3 - < 6	Necesidad continua de ayuda.
Profundo	< 20	< 3	Limitaciones severas en el cuidado personal, continencia, comunicación y movilidad. Necesidad continua de ayuda.

Tabla I1: Clasificación del retraso mental según el ICD-10.

Esta clasificación se basa, principalmente, en un criterio: el cociente de inteligencia (IQ), aunque considera la necesidad de ayuda como indicador diferencial entre el retraso mental leve y el grave a moderado. El IQ refleja el rendimiento de un individuo en tests de inteligencia estandarizados, en los que se asume como media para la población general un valor de 100 puntos y una desviación estándar de 15. El uso del IQ como criterio discriminador facilita la clasificación, pero es importante tener en cuenta que de esta forma pueden estar pasándose por alto otros factores, como la inteligencia emocional, que también juegan un papel en la capacidad intelectual del individuo. Este tipo de factores sí se intenta reflejar en la definición de retraso mental, como muestra la inclusión del criterio sobre habilidades sociales.

Aparte de esta clasificación según la gravedad, dentro del RM pueden diferenciarse, además, formas sindrómicas o inespecíficas, en función de otras características clínicas. Las formas sindrómicas son aquellas en las que el RM aparece siempre asociado a manifestaciones somáticas, neurológicas, comportamentales o metabólicas. En estos casos, el RM podría ser una característica secundaria que aparece como consecuencia de un problema anatómico o bioquímico primario. En el caso de las formas inespecíficas, el RM es el único síntoma que muestran los pacientes, no estando asociado, por tanto, a manifestaciones de cualquier otro tipo.

Las estimaciones de la **prevalencia** del RM en la población se han enfrentado tradicionalmente a un problema: qué criterios se consideran claves en la definición de los casos. Como ya se ha comentado, el valor IQ por sí solo no contempla las capacidades sociales o adaptativas del individuo, ni el grado de ayuda que requiere en su vida diaria. Sin embargo, de cara a la realización de estudios epidemiológicos, el IQ representa la medida más sencilla de obtener y de comparar, a falta de medidas objetivas y estandarizadas del comportamiento social adaptativo. Otros factores, como la procedencia de la muestra poblacional o el fin para el que ésta se toma, pueden influir también en los resultados del estudio, lo que hace que aparezcan diferencias notables en cuanto a la prevalencia del RM

entre distintos estudios. Sin embargo, como media, tomando un valor IQ de 50 como frontera entre el retraso mental leve y el grave (que en este caso incluiría también tanto al moderado como al profundo), se ha estimado una prevalencia del retraso mental grave en torno al 0,3 - 0,5% de la población y del leve alrededor del 2 - 3% (revisado en Leonard y Wen, 2002). Estos datos demuestran que el retraso mental constituye un problema social y sanitario muy relevante en todas las sociedades.

La **etiología** del RM es muy variada, pudiendo ser debida a factores tanto ambientales como genéticos, aunque en muchos casos probablemente se da una combinación de ambos. Dentro de los primeros se engloban los daños causados al sistema nervioso central del individuo durante los periodos prenatal, perinatal y postnatal, que pueden responder a diversas causas: mecánicas, inmunológicas (incompatibilidad del factor rh), radiológicas (exposición a rayos X), térmicas, químicas (síndrome alcohólico fetal), nutricionales (deficiencia de yodo) e infecciosas (rubéola, citomegalovirus, meningitis). Los partos muy prematuros y la anoxia perinatal pueden también causar daños irreversibles en el cerebro del recién nacido (revisado en Curry *et al.*, 1997).

Las causas genéticas incluyen enfermedades monogénicas -algunas de las cuales se comentarán con detalle en el punto III.2 de la introducción- y anomalías cromosómicas, que pueden afectar al número total de cromosomas (trisomías 21, 13 ó 18) o a fragmentos más pequeños (trisomías parciales, microdeleciones, etc.). En concreto, las microdeleciones parecen ser una causa importante de RM: pequeños reordenamientos en zonas subteloméricas, no detectables mediante técnicas citogenéticas convencionales, podrían ser responsables de hasta el 7% de los casos de RM moderado a grave (Knight *et al.*, 1999).

En conjunto, los factores genéticos dan cuenta de entre el 30% y el 40% de los casos de RM moderado a grave, mientras que los ambientales explicarían entre un 10% y un 30% adicional (Stevenson *et al.*, 2000), por lo que un 25-40% de los casos de RM moderado a grave serían de etiología desconocida. Con el RM leve ocurre algo similar, siendo mayor la proporción de etiología desconocida, aunque se piensa que muchos de los casos leves no resueltos podrían implicar una combinación de factores multigénicos y ambientales (Chelly y Mandel, 2001).

I.2 Retraso mental ligado al cromosoma X (RMLX)

Otro dato importante que revelan los estudios epidemiológicos es la mayor prevalencia de RM entre la población masculina, con una razón aproximada de 1,3:1 entre varones y mujeres. Este exceso de varones, de entre un 20% y un 40%, ha resultado evidente desde los primeros estudios realizados y se manifiesta en todos los grados, habiendo sido el factor decisivo en la consideración del concepto de retraso mental ligado al cromosoma X (revisado en Stevenson *et al.*, 2000).

Dada la determinación cromosómica del sexo en la especie humana, la presencia de genes responsables de RM en el cromosoma X podría explicar este exceso de pacientes masculinos, ya que al ser hemizigóticos para dichos genes, la presencia de una mutación en uno de ellos no puede ser compensada por una copia correcta en un cromosoma homólogo, manifestándose por tanto la enfermedad. En las mujeres, debido a la inactivación al azar de uno de los dos cromosomas X, como mecanismo de compensación de dosis, se espera que al menos el 50% de las células puedan expresar la copia correcta del gen. Además, según un estudio realizado por Plenge y colaboradores (2002), aproximadamente la mitad de las mujeres portadoras de RMLX presentan patrones de inactivación preferenciales, en los que el cromosoma portador del gen mutado se inactiva en un porcentaje de células igual o superior al 80%, indicando una posible selección en contra de aquellas células que presentan la copia mutada en el cromosoma X activo.

El RMLX podría definirse, por tanto, como aquella proporción de RM que muestra las características distintivas de una herencia ligada al cromosoma X. Estas características serían, para mutaciones recesivas y dominantes respectivamente (Stevenson *et al.*, 2000), las que se especifican en la tabla I2:

Fenotipo recesivo	Fenotipo dominante
Sólo los varones se ven afectados	Varones y mujeres están afectados.
Los hijos de mujeres portadoras tienen un riesgo del 50% de estar afectados	Los hijos de mujeres afectadas tienen un riesgo del 50% de estar afectados
Las hijas de mujeres portadoras tienen un riesgo del 50% de ser portadoras	Las hijas de mujeres afectadas tienen un riesgo del 50% de estar afectadas
Todas las hijas de varones afectados serán portadoras	Todas las hijas de varones afectados estarán afectadas
Las mujeres portadoras pueden presentar una expresión leve de la enfermedad	El fenotipo de las mujeres heterocigotas suelen ser menos grave que el de los varones hemizogotos
	Sólo uno de los progenitores suele estar afectado
	No tienen lugar transmisiones de varón a varón
	Los varones no afectados no pueden transmitir el fenotipo

Tabla I2: Características de la herencia asociada al cromosoma X. Adaptada de Stevenson *et al.*, 2000.

El retraso mental ligado al cromosoma X también se clasifica en sindrómico o inespecífico, según si aparece asociado a síntomas de otro tipo o si es la única característica distintiva del individuo. Actualmente hay descritas 142 formas sindrómicas, para las que se ha podido aislar el gen responsable en 66 de ellas (Ropers y Hamel, 2005), así como 84 familias MRX (con retraso inespecífico), con 26 de ellas asignadas a un gen concreto. En el punto III.2 de la introducción se tratarán más en detalle los genes implicados en RMLX.

¿Cuál es la prevalencia del RMLX en la población y qué porcentaje del total de casos de RM puede atribuirse al él? Asumiendo un exceso del 30% en varones afectados de RM y considerando nulo el porcentaje de mujeres con RMLX, se deduce que el RMLX representa un 13% de los casos de RM (Yntema, 2001). Esto supone una prevalencia en la población de 2,6 casos por cada 1000 individuos. Teniendo en cuenta que sí existen casos de mujeres con RMLX, el porcentaje de RM atribuible a RMLX podría ser incluso superior al 13%, lo que sitúa a las mutaciones en genes del cromosoma X como una de las causas más frecuentes de RM, comparable a la proporción de casos provocados por aberraciones cromosómicas (12% - 15%) y significativamente superior a la proporción debida a mutaciones en genes autosómicos (5% - 8%) (Stevenson *et al.* 2000).

El cromosoma X representa el 5,02% del genoma haploide, pero contiene únicamente alrededor del 3,75% de los genes, lo que supone una densidad 1/3 inferior a la de un autosoma normal (Venter *et al.*, 2001). Se ha especulado con la posibilidad de que la alta frecuencia de mutaciones en genes del cromosoma X, entre los casos de retraso mental, pudiera reflejar un sesgo en los estudios, dado que las características especiales de los cromosomas sexuales facilitan la identificación de genes en dichos cromosomas. Sin embargo, existen evidencias de que en el cromosoma X se localiza una proporción mayor de genes relacionados con la inteligencia que en el resto del genoma. En un artículo publicado en 2001, Zechner y colaboradores realizaron un estudio comparando el número total de entradas para el término "retraso mental" de la base de datos OMIM (958¹) con el número de entidades asociadas a RM en el cromosoma X (202), tomando este último dato del *RMLX update* (<http://xlmr.interfree.it/home.htm>). A pesar de que sólo el 3,75% del total de genes se localizan

¹ Los datos numéricos son los indicados en el artículo y corresponden, por tanto, al año 2001.

en el cromosoma X, más del 20% de los desórdenes asociados a RM quedaban asignados a este cromosoma. Aplicando correcciones para evitar sesgos, el RM seguía mostrando una frecuencia de asociación al cromosoma X 3,1 veces mayor que a cualquier autosoma (Zechner *et al.*, 2001).

Estos datos han llevado a varios autores a plantear la teoría de que el cromosoma X ha contribuido y sigue contribuyendo de una manera decisiva a una diversificación estructural y funcional dentro de la evolución de los vertebrados (Zechner *et al.*, 2001; Graves *et al.*, 2002; Skuse, 2005). En el caso concreto de la especie humana, este cromosoma habría ido acumulando un número desproporcionado de genes implicados en tres procesos básicos: reproducción, inteligencia y control del desarrollo. Dado que cualquier alelo recesivo de un gen del cromosoma X será expresado necesariamente en los varones, la selección a favor o en contra de los nuevos alelos será especialmente efectiva para los genes localizados en dicho cromosoma, ya que en cuanto éstos sean transmitidos a un varón, serán automáticamente expresados en hemizigosis. La presión de selección será, por tanto, muy alta, de manera que este cromosoma irá siendo “purificado” de las mutaciones que conlleven desventajas y, al mismo tiempo, se irá enriqueciendo en mutaciones que supongan una ventaja adaptativa. En el caso de la inteligencia, un varón con una mayor función cognitiva habría sido favorecido tanto por la selección natural como por la selección sexual. De esta forma, genes ya existentes en el cromosoma X podrían haber ido adquiriendo nuevas funciones relacionadas con el desarrollo cognitivo y/o con la reproducción. A este respecto, los autores destacan que en muchos de los síndromes asociados al cromosoma X que cursan con RM, la sintomatología incluye también problemas de fertilidad.

En cualquier caso, este exceso de genes implicados en funciones cognitivas en el cromosoma X, unido a las características particulares de este cromosoma, podría explicar la mayor varianza que se observa entre la población masculina en los resultados de los tests de inteligencia (Hedges y Nowell, 1995). Los varones tendrían una mayor probabilidad de manifestar determinados haplotipos asociados a mayores capacidades cognitivas, pero al mismo tiempo serían más vulnerables al efecto de mutaciones deletéreas en genes directamente implicados en la función mental. En un artículo reciente, Ropers y Hamel (2005) afirman que las formas recesivas de RMLX no pueden explicar, por sí solas, el exceso de varones entre la población afectada de RM, y proponen que en el cromosoma X puedan existir determinados “factores de riesgo” que predispongan a sufrir RMLX, sin causarlo directamente. Esta teoría concuerda con el exceso de genes implicados en funciones cognitivas que albergaría el cromosoma X, según se ha comentado anteriormente.

Antes de abordar los genes que, hasta el momento, se han identificado en el cromosoma X como responsables de RM en alguna de sus manifestaciones, puede resultar útil recordar algunos conceptos básicos del desarrollo neuronal y de las bases de la memoria, ya que sólo así podrá comprenderse después el papel que los productos codificados por dichos genes pueden estar jugando en el desarrollo de la enfermedad. Esta información también resulta de interés de cara a la valoración de nuevos genes como posibles candidatos en el análisis de familias con miembros afectados por esta enfermedad.

II. Desarrollo neuronal

II.1 Conceptos básicos

El desarrollo cerebral y el establecimiento del patrón definitivo de conexiones neuronales es un proceso gradual, en el que pueden distinguirse 6 fases principales (Kandel *et al.*, 1995):

1. En las primeras etapas embrionarias, el mesodermo envía señales que inducen la formación de una población uniforme de células precursoras neuronales a partir de células ectodérmicas.

2. Estas células precursoras, o neuroblastos, comienzan a diversificarse, dando lugar a los dos tipos celulares más abundantes del sistema nervioso: las células gliales y las neuronas, que en estos estadios todavía son inmaduras. El destino de algunas células puede depender exclusivamente de su linaje, pero la diferenciación de la mayoría de las células nerviosas depende en mayor medida de las señales que recibe de las células de su entorno. Las moléculas que median estas señales pueden ser secretadas o bien ser moléculas de superficie, pero en cualquier caso, al unirse a sus receptores de membrana, desencadenan vías intracelulares mediadas por segundos mensajeros que, directa o indirectamente, regulan la actividad de factores de transcripción. De esta forma se va regulando la diferenciación neuronal.

3. Las neuronas inmaduras migran desde las zonas germinales, donde son generadas, a sus posiciones definitivas en el organismo. Las neuronas del sistema nervioso periférico derivan de células de la cresta neural y migran por todo el cuerpo antes de completar su diferenciación en neuronas del sistema nervioso autónomo, del sistema nervioso entérico o en neuronas sensoriales. También en el sistema nervioso central, muchas células alcanzan su posición definitiva migrando desde su lugar de proliferación, situado en las zonas ventriculares del neuroepitelio. La migración de los precursores neuronales tiene una doble función: por una parte, juega un papel en el establecimiento de la identidad de algunas neuronas y por otra, puede definir las propiedades funcionales y las conexiones futuras de las mismas.

4. Las neuronas emiten axones, que proyectan hacia los lugares donde se encuentran sus posibles dianas. El crecimiento de los axones es un proceso complejo, en el que se ven implicados fenómenos de diversa índole: la neurona ha de sintetizar material citoplásmico y de membrana, que deberá ser transportado a la zona de crecimiento, donde se necesitarán también receptores y vías de respuesta a estímulos externos que induzcan el crecimiento y guíen al axón en desarrollo hasta su destino. Goldberg (2003) ha publicado una revisión bastante completa sobre el tema. Cuando una neurona ha migrado a su posición final, y en ocasiones incluso antes, comienza a emitir un axón, en cuyo extremo se localiza una estructura motora y sensorial muy especializada: el cono de crecimiento (Fig. 11), que se caracteriza por su mayor grosor y por la presencia de filopodios, unas estructuras con forma de dedo que se proyectan y retraen rápidamente, y lamelipodios, más aplanados y con aspecto de velo, situados entre los filopodios.

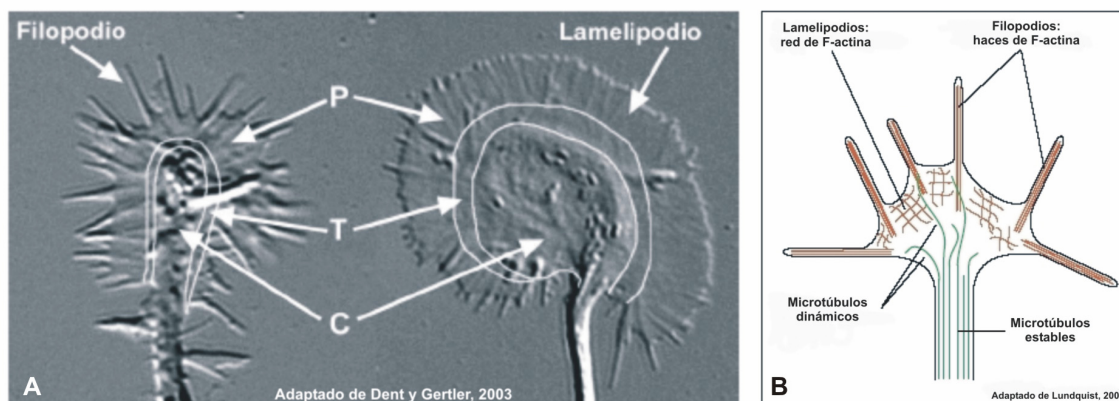


Fig. 11: Aspecto externo y estructura de un cono de crecimiento axonal.

A. Imágenes de contraste de interferencia de dos conos de crecimiento de neuronas hipocámpicas en cultivo. En el de la izquierda predominan los filopodios y en el de la derecha los lamelipodios, pero en ambos se diferencian tres regiones: el dominio periférico (P), formado por filopodios y lamelipodios, el central (C), formado por regiones más gruesas y que contiene vesículas y orgánulos, y el de transición (T), que forma una banda de separación entre los dos anteriores. B. Distribución del citoesqueleto en los conos de crecimiento. Los filamentos de actina se representan en rojo y los microtúbulos en verde. La región más dinámica del cono (distal) contiene fundamentalmente actina, mientras que los microtúbulos se localizan en el axón y en la parte más proximal del cono.

Como puede observarse en la figura 11, el citoesqueleto juega un papel fundamental en la movilidad del cono de crecimiento, e influye de forma decisiva en procesos como la elongación, la orientación y la ramificación del mismo (revisado en Dent y Gertler, 2003). Es en concreto el

citoesqueleto de actina el que desempeña un papel preponderante en este sentido, por lo que las vías que controlan su dinámica son especialmente decisivas para el establecimiento del patrón neuronal de conexiones. Una familia de proteínas, las Rho GTPasas, aparece como reguladora principal de la dinámica del citoesqueleto de actina y tres de sus miembros han sido muy estudiados a este respecto: Rho, Rac y Cdc42. La activación de Rho en fibroblastos da lugar a la generación de haces de actina llamados fibras de estrés y al agrupamiento de integrinas y otras proteínas asociadas en los llamados complejos focales (Ridley y Hall, 1992). La activación de Rac, a su vez, provoca la polimerización *de novo* de actina en la periferia celular y la formación de lamelipodios, mientras que la activación de Cdc42 induce la formación de filopodios o microespinas (Ridley *et al.*, 1992, revisado en Hall, 1998). La siguiente figura recoge estos datos de forma esquemática.

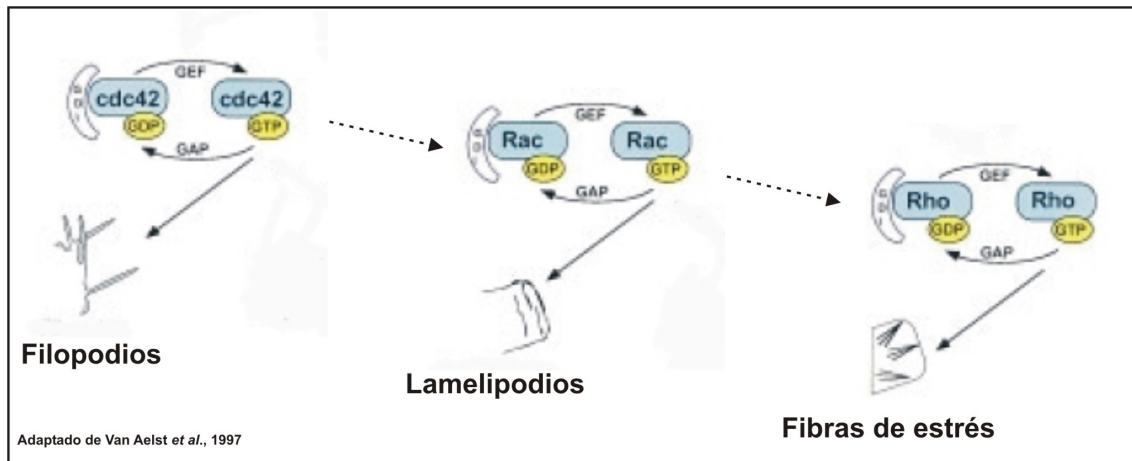


Fig. 12: Influencia de las RhoGTPasas sobre el esqueleto de actina.

La activación de Cdc42, Rac y Rho por estímulos externos provoca la formación de filopodios, lamelipodios y fibras de estrés en fibroblastos, respectivamente. Además, Cdc42 puede activar a Rac, que a su vez activa a Rho. Esta figura se ha adaptado de Van Aelst y D'Souza-Schorey, 1997.

Al igual que en fibroblastos, estas tres GTPasas juegan un papel importante en el control del citoesqueleto de actina en los conos de crecimiento neuronales (revisado en Luo, 2002 y Lundquist, 2003). Es importante resaltar que estos procesos de elongación, orientación y ramificación también se dan en las dendritas, que contribuyen con igual relevancia que los axones al establecimiento de las conexiones sinápticas. Dada la similitud en cuanto a componentes celulares entre axones y dendritas, cabe suponer que algunos de los aspectos comentados aquí para los axones serán de aplicación en el desarrollo del árbol dendrítico, aunque las diferencias morfológicas y funcionales que existen entre ambos tipos de proyecciones quedarán sin duda reflejadas también a nivel molecular.

5. Los axones contactan con las células diana seleccionadas y establecen conexiones sinápticas con ellas. Una vez que el axón ha alcanzado su zona de destino, el cono de crecimiento debe reconocer a las células adecuadas con las que establecer contactos sinápticos. Las sinapsis son uniones especializadas morfológica y funcionalmente entre dos neuronas, que permiten la transmisión de señales a través de neurotransmisores. Son uniones muy asimétricas, en las que el terminal presináptico contiene la maquinaria para una secreción regulada del transmisor, y el postsináptico aglutina toda una serie de receptores y moléculas para recibir e integrar las señales que recibe. Los dominios de membrana especializados en ambos terminales poseen un complejo andamiaje citoplásmico que aparece como una zona electrodensa al microscopio electrónico (Fig.13).

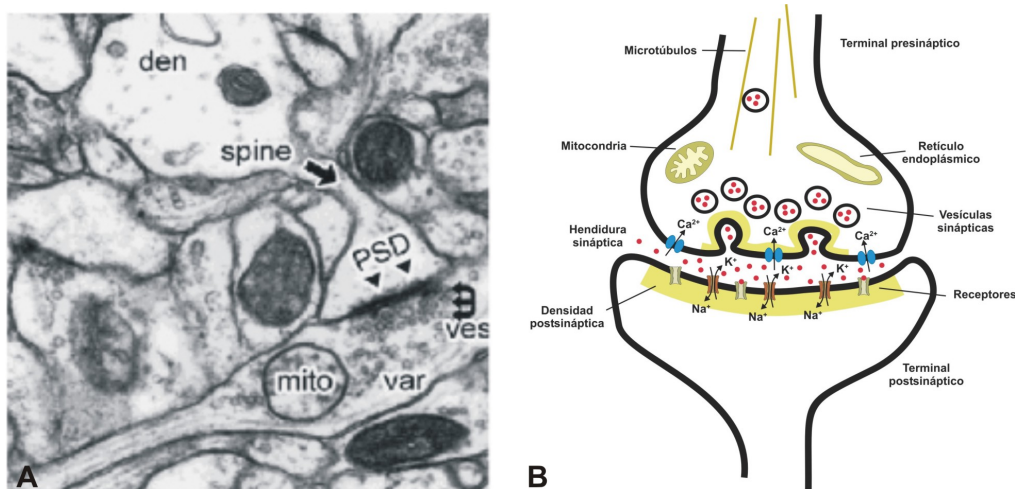


Fig. 13: Estructura de la sinapsis.

A. Micrografía electrónica de una sinapsis. La unión se produce entre un axón y la espina (spine) de una dendrita (den). Se observa la densidad postsináptica (PSD) y las vesículas de neurotransmisor en el terminal presináptico (ves). La imagen se ha obtenido de <http://www.ipmc.cnrs.fr/~duprat/neurophysiology/images/synapse.jpg>. B. Esquema de una sinapsis. En el terminal presináptico se localizan canales de calcio que se abren en respuesta a la llegada de un potencial de acción. La entrada de calcio provoca la exocitosis de las vesículas sinápticas, que liberan el neurotransmisor en la hendidura sináptica. En el terminal postsináptico, la unión del neurotransmisor a sus receptores lo activa, haciendo que se abran, de forma que entran iones sodio y salen iones potasio, despolarizando la membrana.

El establecimiento de las uniones sinápticas parece regirse por una jerarquía de señales que actúa a tres niveles (revisado en Scheiffele, 2003):

- En primer lugar, se establecen interacciones entre el axón y sus posibles dianas, dependiendo de un balance entre señales de atracción y repulsión. Toda una serie de moléculas parecen jugar un papel en estas etapas iniciales de reconocimiento entre axón y diana: semaforinas y ácido polisialílico como señales repulsivas, y WNTs (*wingless-type MMTV integration site family*) y neurotransmisores (glutamato) como atrayentes. Se trata en su mayoría de señales secretadas que regulan la dinámica de los filopodios, de forma que la estabilización de estas proyecciones facilitaría el establecimiento de uniones sinápticas. Tanto las semaforinas como las WNTs parecen ejercer su función, al menos en parte, a través de la enzima GSK-3 (glucógeno sintasa quinasa), que influye sobre la estabilidad del citoesqueleto de microtúbulos.
- Una vez establecidas estas interacciones iniciales, las moléculas de señalización pueden intervenir de forma bidireccional para coordinar la diferenciación de los terminales pre- y postsinápticos. Esta señalización trans-sináptica debe asegurar que la diferenciación en ambos terminales ocurra (i) de manera coordinada, tanto espacial como bioquímicamente, (ii) de forma direccional, dada la asimetría de las uniones sinápticas, y (iii) formando o estabilizando las uniones apropiadas y eliminando las incorrectas. Se han caracterizado diversas familias de proteínas implicadas en estos procesos:
 - Las neurexinas y neuroliginas se localizan en los terminales pre- y postsinápticos, respectivamente, e interactúan entre sí y con proteínas de andamiaje citoplásmico, que podrían relacionarlas con el citoesqueleto de actina. Otros estudios han comprobado que las neurexinas acoplan los canales de calcio a la exocitosis de vesículas sinápticas (Missler *et al.*, 2003).
 - Toda una serie de proteínas con dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina también están implicadas en la diferenciación sináptica: la proteína SynCAM (*synaptic Cell Adhesion Molecule*) parece funcionar de manera bastante análoga al sistema neuroliginas-neurexinas, pero a través de uniones homofílicas. Es posible que la formación de un tipo de complejos preceda a la formación del otro. Las nectinas, localizadas inicialmente en la zona activa de las sinapsis, son desplazadas cuando ésta madura a unas estructuras de unión especializadas denominadas *puncta adherentia*, que se establecen entre el terminal presináptico y

los troncos de las espinas dendríticas. Las *Sidekicks* parecen estar implicadas en el control de la formación de sinapsis específicas de láminas de la retina.

- Las cadherinas y protocadherinas forman una familia extraordinariamente diversa de proteínas de adhesión celular, por lo que podrían jugar un papel en la especificación de los circuitos neuronales.

El papel de las nectinas y las cadherinas en la formación de sinapsis ha sido revisado por Takai y colaboradores (2003). Muchos otros complejos moleculares pueden contribuir también a la formación de sinapsis: integrinas, moléculas MHC de clase I, syndecanos, receptores Trk, receptores de insulina y las proteínas agrin, NARP (*neural-activity-regulated pentraxin*) y neuroregulina.

- La tercera fase en el establecimiento de los circuitos sinápticos es aquella en la que las conexiones más competitivas son estabilizadas, mientras que otras son eliminadas (ver punto 6).

Hay que destacar que durante la formación de las sinapsis, se forman en las dendritas unas estructuras, denominadas espinas, sobre todo en aquellas regiones en las que axones excitatorios forman sinapsis *en passant*. Las espinas son, por tanto, los principales lugares de recepción de señales excitadoras en las neuronas que las poseen y la morfología de estas espinas está alterada en muchas enfermedades neurológicas, incluidas algunas formas de retraso mental, como el síndrome del cromosoma X frágil (revisado en Fiala *et al.*, 2002).

6. Algunos de los contactos sinápticos iniciales son modificados para generar el patrón maduro de conexiones neuronales. En algunas regiones del sistema nervioso, los contactos sinápticos iniciales entre células son precisos y estables, revelando un alto grado de especificidad inicial en el reconocimiento celular. Sin embargo, en otras regiones, los contactos iniciales son reorganizados de forma drástica y muchas sinapsis son eliminadas durante el desarrollo. Estas reorganizaciones, que siguen produciéndose después en el cerebro adulto, se conocen como “plasticidad sináptica” y juegan un papel importante en los procesos de aprendizaje y memoria (ver punto II.2). Algunas moléculas se han podido relacionar con la plasticidad sináptica (Scheiffele, 2003), los receptores tirosin-quinasa EphB y sus ligandos EphrinB, que podrían también estar implicados en la diferenciación sináptica, tienen un papel más establecido en plasticidad, a través de su influencia sobre los receptores NMDA (*N-methyl-D-aspartate*); no sólo pueden regular su abundancia en las sinapsis, sino que parecen ejercer una influencia directa sobre su función. Además, se especula con la posibilidad de que un agrupamiento postsináptico de receptores EphB pueda desencadenar una señal trans-sináptica mediante la estimulación de las Ephrinas presinápticas, aunque es algo que aún no se ha demostrado. También la proteína NCAM (*neural Cell Adhesion Molecule*) y las cadherinas han sido implicadas en plasticidad neuronal.

II.2 Bases neurológicas del aprendizaje y la memoria

Los procesos de aprendizaje y memoria son esenciales para la supervivencia de los seres vivos. El aprendizaje implica la obtención de conocimientos acerca del mundo que nos rodea, y la memoria permite retener o almacenar dicha información y acceder a ella cuando es necesario. Diferentes zonas del cerebro están implicadas en estos procesos, pero una de las más estudiadas ha sido el hipocampo, que podría ser un centro de procesamiento de la información adquirida, que “permanecería” en él durante un determinado periodo de tiempo antes de ser transferida a zonas del córtex cerebral para su almacenamiento a largo plazo (Kandel *et al.*, 1995).

Muchos estudios han demostrado el papel de la plasticidad neuronal en los procesos de memoria y aprendizaje. La idea subyacente consiste en que la activación repetida de determinadas neuronas reforzará de alguna forma sus conexiones, de manera que esos cambios en la conectividad neuronal podrían reflejar la información adquirida durante el aprendizaje. De hecho, en sinapsis glutamatérgicas del hipocampo está demostrado que los potenciales postsinápticos se ven elevados tras determinados tipos de estimulación de alta frecuencia, lo que se conoce como potenciación a largo plazo (LTP). Asimismo, estimulaciones

de baja frecuencia provocan una disminución estable de los potenciales postsinápticos en esas mismas sinapsis, dando lugar a un fenómeno conocido como depresión a largo plazo (LTD). La LTD actuaría para equilibrar a la LTP, evitando así que los circuitos neuronales se saturen y pierdan la capacidad de almacenar información.

¿Cuál es la base de la LTP? Hay muchas moléculas implicadas que actúan a diferentes niveles (revisado en Matynia *et al.*, 2002). La siguiente figura proporciona una visión global de los cambios que se inducen a nivel molecular.

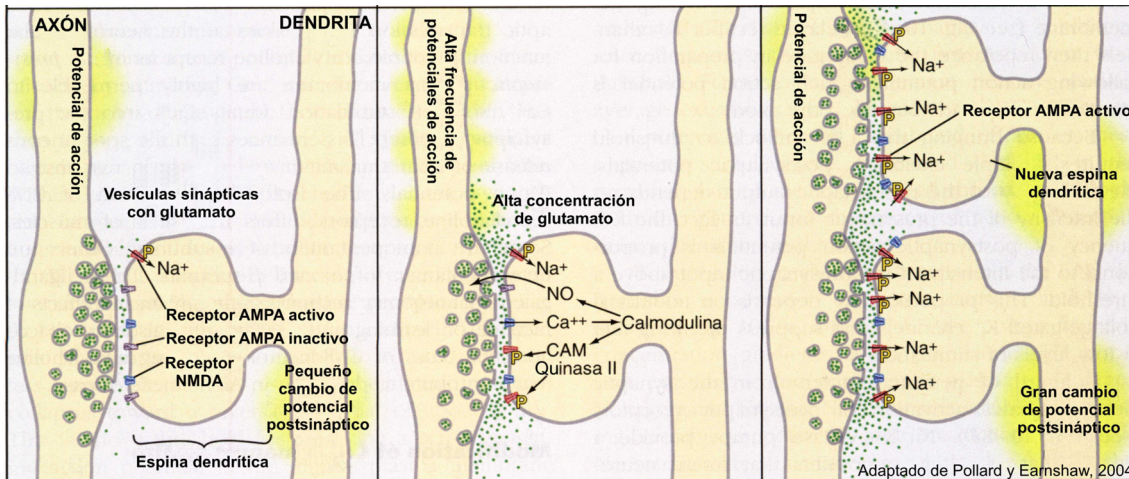


Fig. 14: Mecanismo de LTP en sinapsis excitatorias del hipocampo.

Antes de la LTP, cuando un potencial de acción llega al terminal presináptico, se liberan pocas vesículas y las respuestas postsinápticas son pequeñas y no siempre tienen lugar. Como consecuencia de una alta frecuencia de potenciales de acción, la cantidad de glutamato liberado aumenta, lo que provoca despolarizaciones mayores en el terminal postsináptico, produciéndose la apertura de los receptores NMDA y la entrada de calcio. Este calcio se une a calmodulina y desencadena una serie de vías, que llevan a la modulación de los receptores AMPA, a la transcripción de determinados genes (no señalado en la figura) y a la síntesis de un mensajero retrógrado, probablemente el óxido nítrico (NO), que actúa sobre el terminal presináptico. Como consecuencia, tras la LTP, la transmisión sináptica se ha hecho mucho más efectiva, y un potencial de acción en el terminal presináptico provoca una respuesta postsináptica mucho mayor. La mayor efectividad se debe a una mayor probabilidad en la liberación de vesículas de neurotransmisor por parte del terminal presináptico, a una modulación de los receptores postsinápticos y, en algunos casos, a la formación de nuevas sinapsis.

Los receptores de glutamato tipo NMDA presentan normalmente un bloqueo dependiente de voltaje, mediado por un ion magnesio. Para su activación es necesario, por tanto, que además de unirse a su ligando, se elimine este bloqueo. Los receptores de glutamato tipo AMPA (*α-amino-3-hidroxy-5-methyl-4-isoxazole*) se abren y cierran rápidamente en respuesta al ligando, permitiendo la entrada de Na⁺ cuando están abiertos, lo que despolariza la membrana postsináptica. En respuesta a una estimulación de alta frecuencia, la despolarización en el terminal postsináptico será mayor, lo que hará que se abran también los receptores NMDA, permitiendo la entrada de Ca²⁺ en el terminal. Este Ca²⁺ se une a calmodulina, lo que provoca la activación de las vías de α CaMKII (Protein-quinasa II dependiente de calcio-calmodulina) y PKA (proteínquinasa A), que llevan a la fosforilación de los receptores AMPA y del factor de transcripción CREB (*cAMP response element binding protein*), activándose así la transcripción de genes y la síntesis de determinadas proteínas. De hecho, se ha demostrado que la síntesis proteica es necesaria para la memoria a largo plazo. Los receptores NMDA activan también la vía Ras/Raf/MAPK, que también conlleva la activación de CREB.

Sin embargo, los cambios no afectan únicamente al terminal postsináptico, ya que éste genera algún tipo de mensajero (posiblemente óxido nítrico) que actúa de forma retrógrada sobre el terminal presináptico. En él, la LTP incrementa la probabilidad (de menos del 0,5 a más del 0,8) de que un potencial de acción provoque la exocitosis de una vesícula de glutamato. También puede darse un incremento en el número de espinas y, por tanto, de sinapsis como consecuencia de la LTP.

III. Genes implicados en RMLX

III.1 Estrategias para su identificación

Para identificar los genes responsables de retraso mental, como ocurre con cualquier otra enfermedad hereditaria, es necesario poder delimitar una región cromosómica en la que centrar la búsqueda. En el caso del retraso mental ligado al cromosoma X, la propia definición indica el cromosoma en el que se encuentran los genes que deben ser identificados, algo que, sin duda, facilita el proceso. Esto contribuye a que se hayan descrito hasta el momento más genes asociados a RM en el cromosoma X que en todo el resto del genoma. Sin embargo, un cromosoma entero comprende una zona demasiado extensa para abordar un análisis con unas mínimas garantías de éxito, por lo que los investigadores han ido tratando de acotar regiones de menor tamaño basándose en los datos de ligamiento obtenidos de las familias afectadas de RMLX.

Como ya se ha comentado anteriormente, el retraso mental ligado al cromosoma X puede aparecer en forma sindrómica o inespecífica. En el caso de las formas sindrómicas (MRXS), la información que proporcionan las diferentes familias con un mismo síndrome puede combinarse para delimitar al máximo la región en la que llevar a cabo la búsqueda, gracias a lo cual, de las 142 entidades descritas, se ha podido identificar el gen responsable en 66 de ellas, incluyendo varias formas que han demostrado ser alélicas (tabla suplementaria S1 de Ropers y Hamel, 2005). La figura I5 muestra los límites de ligamiento para las formas sindrómicas en las que aún se desconoce el gen responsable. En general, las formas sindrómicas, sin embargo, no suelen proporcionar mucha información referente a los procesos de aprendizaje y memoria en el hombre, puesto que el RM puede ser secundario a un trastorno de tipo metabólico o del desarrollo. Por este motivo el resto de la introducción se centrará básicamente en los genes responsables de RMLX inespecífico.

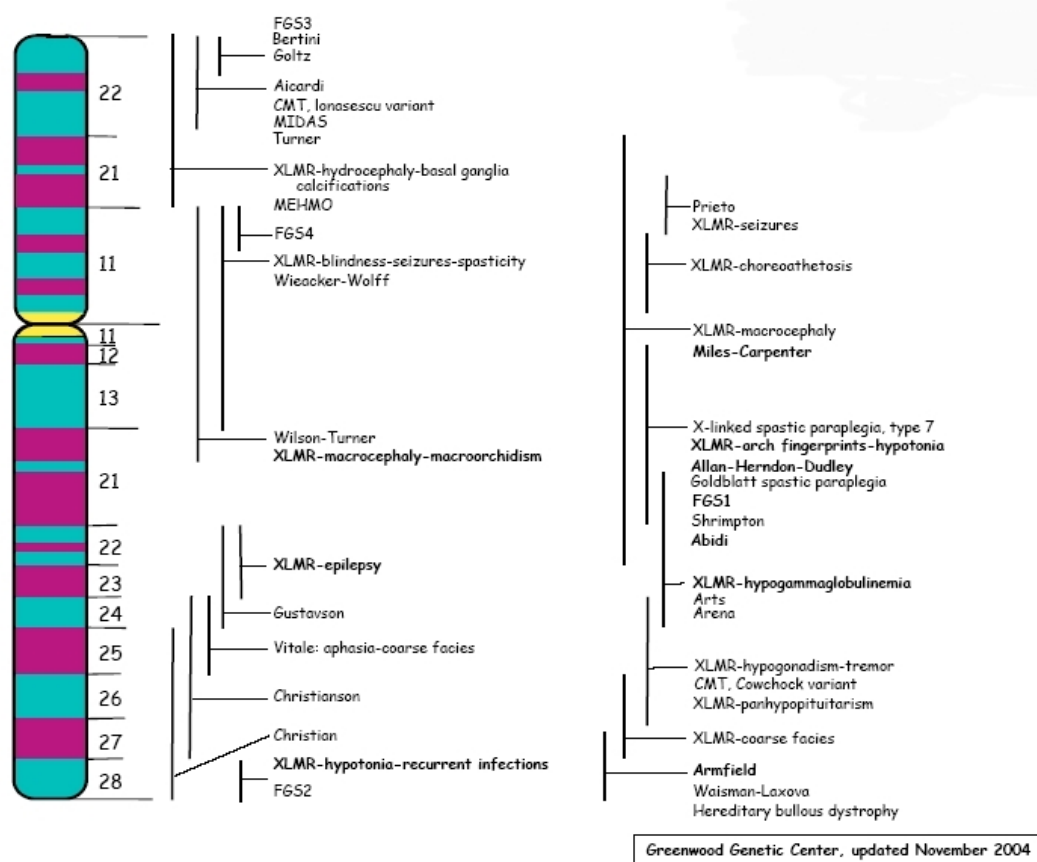


Fig. I5: Límites de ligamiento para formas de RMLX sindrómico.

Las barras verticales muestran las regiones candidatas a albergar los genes responsables de los síndromes indicados a su derecha. La imagen está tomada de la página web del Greenwood Genetic Center, <http://www.ggc.org/xlmr.htm>.

El RMLX no sindrómico o inespecífico (MRX) presenta un panorama bastante distinto: la alta heterogeneidad de estas formas dificulta la puesta en común de datos obtenidos de diferentes familias, por lo que los intervalos en los que se debe realizar la búsqueda suelen ser, por lo general, mucho mayores. Para facilitar el estudio sistemático de las familias con MRX se estableció en 1990 un convenio por el que a aquellas familias, en las que el análisis de ligamiento produce valores *lod* iguales o superiores a 2, se les asigna un número MRX (Mulley *et al.*, 1992). Hasta ahora se han descrito 84 familias MRX, pero hay que tener en cuenta que muchas otras quedan fuera de este sistema de numeración por no alcanzar un valor *lod* significativo. A continuación se muestran los límites de ligamiento para estas familias MRX.

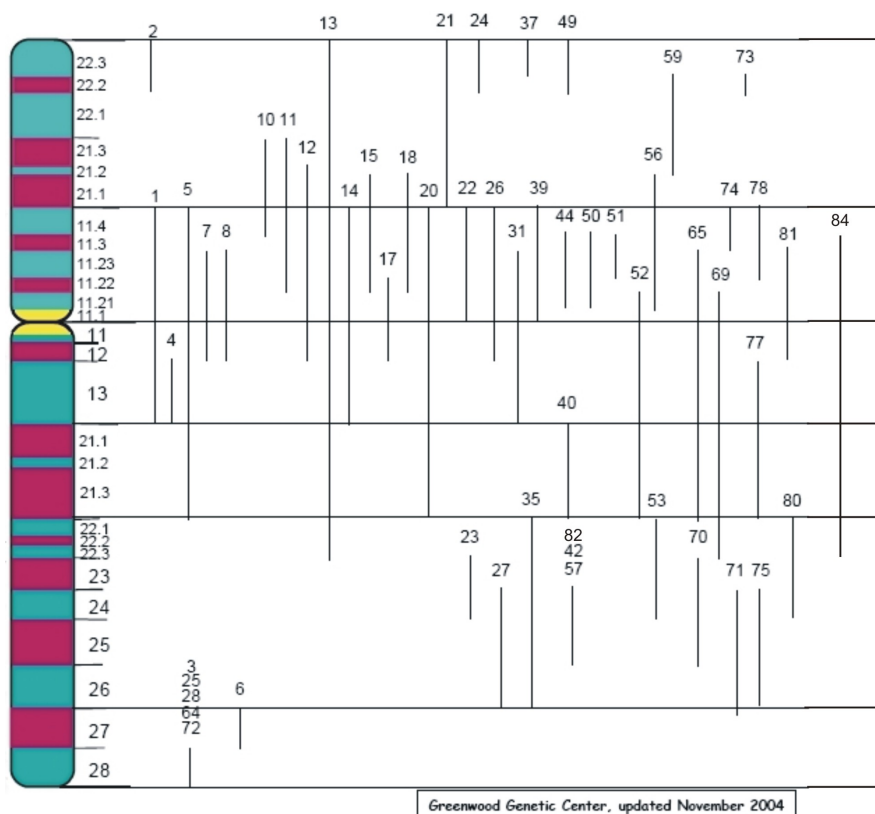


Fig. I6: Límites de ligamiento para las familias MRX.

Las barras verticales muestran las regiones candidatas a albergar los genes responsables en las familias cuyo número MRX aparece en la parte superior de la línea. Los números que no aparecen corresponden a familias en las que ya se ha identificado el gen responsable o cuyos datos de ligamiento no han sido hechos públicos todavía. La imagen está adaptada de <http://www.ggc.org/xlmr.htm>.

Tradicionalmente se han seguido tres estrategias en la identificación de genes responsables de RMLX: clonación posicional, análisis de genes candidatos (con un componente posicional mayor o menor) y, en el caso de genes de MRX, análisis de genes ya descritos para formas sindrómicas.

La **clonación posicional** se basa exclusivamente en datos sobre la localización cromosómica del gen, que generalmente se obtienen mediante análisis de ligamiento. Sin embargo, en la mayoría de casos los intervalos así definidos son excesivamente grandes y no permiten abordar el análisis de mutaciones de los genes comprendidos en dichas regiones. La identificación de genes de RMLX mediante clonación posicional se ha visto enormemente facilitada por la presencia de alteraciones cromosómicas, como sitios frágiles, translocaciones, inversiones o deleciones. De esta forma, se han podido identificar 7 de los 21 genes de MRX caracterizados hasta el momento. El gen *FRM2* fue identificado por la presencia de un sitio frágil en Xq28 y de microdeleciones en esa misma región (Gecz *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 1996). Las translocaciones X-autosoma también han sido la clave en la identificación de genes de

MRX, como ocurrió con *OPHN1* (Billuart *et al.*, 1998), *TM4SF2/TSPAN7* (Zemni *et al.*, 2000), *ARHGEF6* (Kutsche *et al.*, 2000), *AGTR2* (Vervoort *et al.*, 2002) y *ZNF41* (Shoichet *et al.*, 2003). Es importante resaltar que para poder confirmar estos genes como responsables de MRX deben hallarse además mutaciones en pacientes no afectados por translocaciones, para descartar posibles efectos posicionales de las mismas. Por último, el gen *IL1RAPL* fue identificado gracias a una microdelección que eliminaba 3 de sus 11 exones (Carrié *et al.*, 1999).

El **análisis de genes candidatos** consiste en seleccionar para su estudio aquellos genes que, por sus características funcionales, mejor se adaptan a ser responsables de un fenotipo de MRX. Con la información disponible sobre su función, expresión tisular, mutaciones en genes ortólogos, etc., puede decidirse qué genes se van a analizar, aunque una aproximación meramente funcional no suele darse nunca, ya que siempre se tendrán en cuenta los datos de los intervalos de ligamiento en las familias MRX. Por lo tanto, o bien se seleccionan genes candidatos para realizar su análisis en aquellas familias que lo contienen en su región de ligamiento, o bien partiendo de una serie de familias que definen una región concreta, se analizan los genes contenidos en la misma que se consideran los mejores candidatos. Una aproximación de este tipo ha permitido identificar otros 6 genes de MRX: *GDI1* (D'Adamo *et al.*, 1998), *PAK3* (Allen *et al.*, 1998), *SLC6A8* (Salomons *et al.*, 2001), *ARX* (Stromme *et al.*, 2002; Bienvenu *et al.*, 2002), *FACL4/ACSL4* (Meloni *et al.*, 2002) y *NLGN4X* (Laumonier *et al.*, 2004).

Aunque en un principio pueda pensarse que las diferencias entre formas sindrómicas e inespecíficas de retraso mental deberían ser obvias, no se debe olvidar que, en ocasiones, mutaciones en un mismo gen pueden provocar fenotipos muy distintos. Esto ha quedado demostrado, en el caso del RMLX, donde varios genes han sido asociados a formas tanto sindrómicas como inespecíficas. De hecho, 11 de los genes de MRX están también mutados en algún síndrome y formas de retraso inicialmente calificadas de MRX, como es el caso del X frágil, han sido posteriormente reclasificadas como sindrómicas, cuando una evaluación más minuciosa, sobre todo en adultos, ha permitido identificar síntomas asociados al RM. Esto ha llevado a algunos autores a plantear la necesidad de evaluaciones clínicas más precisas, sobre todo conforme van caracterizándose nuevos genes (Frints *et al.*, 2002). En la siguiente tabla se resumen estos genes.

Gen	Síndrome	MRX
<i>RPS6KA3</i>	Síndrome de Coffin-Lowry	MRX 19
<i>ARX</i>	Síndromes de Partington, West, Proud y XLAG	MRX 29, 32, 33, 36, 38, 43, 54, 76
<i>PQBP-1</i>	Síndromes de Renpenning, Sutherland-Haan, Hamel, Golabi-Ito-Hall y Porteous	MRX 55
<i>FGD1</i>	Síndrome de Aarskog	K8951
<i>OPHN1</i>	Síndrome de RMLX-disgénesis cerebelar	MRX 60
<i>ATRX/XNP</i>	Síndromes de RMLX-facies hipotónica y Smith-Fineman-Myers	F96-26, entre otras
<i>AGTR2</i>	Síndrome de RMLX-atrofia óptica	K8725, pacientes esporádicos
<i>MECP2</i>	Síndromes de Rett y PPM-X	MRX 16, 79, entre otras
<i>SLC6A8</i>	Síndrome de RMLX-convulsiones	Salomons <i>et al.</i> , 2001
<i>SCMX/JARID1C</i>	Jensen <i>et al.</i> , 2005	D034, A034, P018, D029
<i>NLGN4</i>	RMLX con autismo y/o desorden del desarrollo	T118

Tabla I3: Genes implicados en formas sindrómicas e inespecíficas de RMLX. Adaptada de Ropers y Hamel (2005).

Recientemente, se ha añadido una nueva estrategia, que ha sido posible gracias a dos factores: (i) el gran número de familias descritas acumuladas a lo largo del tiempo y puestas en

común por el Consorcio Europeo de RMLX, fundado en 1995, y (ii) el diseño de protocolos semi-automáticos para el análisis de mutaciones. Con ello se puede abordar el análisis de mutaciones a gran escala, como ya se está haciendo en la región Xp11, en la que un estudio de ligamiento de 125 familias con MRX, situaba el 30% de todas las mutaciones causantes de MRX (Ropers *et al.*, 2003). El análisis sistemático de 50 genes que se expresan en cerebro presentes en dicha región ha permitido identificar en los dos últimos años 3 nuevos genes responsables de MRX: *PQBP1* (Kalscheuer *et al.*, 2003), *FTSJ1* (Freude *et al.*, 2004) y *JARID1C/SCMX* (Jensen *et al.*, 2005). La identificación de *DLG3* también ha sido posible mediante una aproximación similar de secuenciación a gran escala de genes candidatos (Tarpey *et al.*, 2004).

III.2 Función de los genes de RMLX

Como se ha comentado anteriormente, los genes que proporcionan una información más relevante sobre los procesos cognitivos son, en general, aquellos cuyas mutaciones provocan retraso mental inespecífico, puesto que la ausencia de otras manifestaciones metabólicas, esqueléticas, etc. indica que el proceso que se ve alterado por la mutación del gen en cuestión es específico de la función mental. En este apartado se van a comentar los datos funcionales de que se dispone acerca de los genes asociados a RMLX, pero únicamente se abordarán en profundidad los genes implicados en MRX, aunque sí se incluirán los mutados tanto en formas sindrómicas como inespecíficas.

Respecto a las formas sindrómicas, la siguiente figura recoge los genes responsables de RMLX sindrómico identificados hasta el momento.

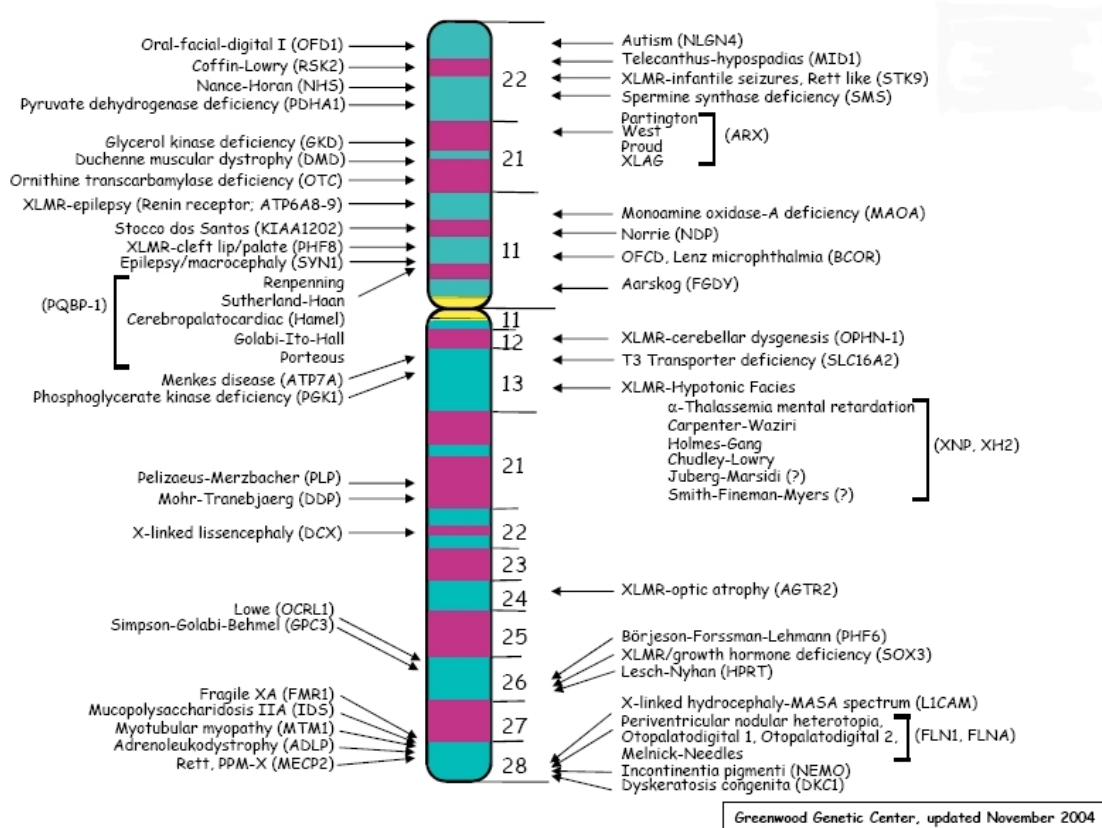


Fig. 17: Genes responsables de RMLX sindrómico.

La figura muestra la localización de los diferentes genes identificados como responsables de formas sindrómicas de retraso mental ligado al cromosoma X. Se indican los síndromes y, entre paréntesis, el gen que los provoca cuando está mutado. La imagen está tomada de la página web del Greenwood Genetic Center, <http://www.ggc.org/xlmr.htm>.

El síndrome del cromosoma X frágil, provocado por la ausencia del producto del gen *FMR1* (*Fragile Mental Retardation 1*), es, sin duda, la causa más frecuente de RMLX, representando aproximadamente el 20% de los casos. Sin embargo, dado que ninguna de las familias estudiadas lo presenta, no se va a comentar en esta introducción la función de la proteína codificada por él, aunque en la discusión sí se tratarán con más detalle algunas de sus características.

En el caso del MRX, los genes identificados hasta la fecha codifican para proteínas muy diversas. Sin embargo, algunos de ellos pueden agruparse en diferentes categorías, como recoge la tabla I4. Dichas categorías conforman la estructura de esta sección.

Función	Genes	Familias
Regulación del citoesqueleto de actina	<i>FGD1</i>	K8951
	<i>OPHN1</i>	MRX60
	<i>PAK3</i>	MRX30, 47; Gedeon <i>et al.</i> , 2003
	<i>ARHGEF6</i>	MRX46
Sinapsis	<i>NLGN4X</i>	T118
	<i>IL1RAPL</i>	MRX34, Fam F
	<i>DLG3</i>	260, 356, 367, 187
	<i>GDI1</i>	MRX41, 48, Fam R
Remodelación de la cromatina y control transcripcional	<i>RPS6KA3</i>	MRX19
	<i>ARX</i>	MRX 29, 32, 33, 36, 38, 43, 54, 76, Fam M, P25, P49, P73, T4 y T80
	<i>ZNF141</i>	P13, P42
	<i>SMCX / JARID1C</i>	D034, A034, P018, D029
	<i>ATRX / XNP</i>	F96-26, entre otras
	<i>MECP2</i>	MRX16, 79, Fam T44
	<i>FMR2</i>	Géczy <i>et al.</i> , 1997a
Otros genes	<i>TSPAN7 / TM4SF2</i>	MRX58, Fam L28, T15
	<i>FTSJ1</i>	MRX9
	<i>PQBP1</i>	MRX55
	<i>ACSL4 / FAFL4</i>	MRX63, 68, Fam P55
	<i>AGTR2</i>	K8725, pacientes esporádicos
	<i>SLC6A8</i>	Salomons <i>et al.</i> , 2001 y 2003

Tabla I4: Función de los genes de MRX. Adaptada de Ropers y Hamel, 2005 y Frints *et al.*, 2002

Cada gen identificado da cuenta de porcentajes relativamente pequeños de MRX, aunque algunos, como *ARX* y *JARID1C*, parecen estar mutados en casi un 10% de los pacientes. El estudio de estos genes puede ayudarnos tanto a comprender mejor los procesos que se han podido relacionar con la función cognitiva, como a poder sugerir el tipo de candidatos en las familias con RM. Los genes cuyos nombres aparecen en azul son responsables únicamente de MRX, mientras que aquellos que aparecen en rojo están también

implicados en formas sindrómicas de RMLX. Se indican, dentro de cada categoría, en orden Xpterinal a Xqterminal (Xpter→Xqter).

A. Genes relacionados con la regulación del citoesqueleto de actina

Cuatro de los genes responsables de MRX están implicados en la dinámica del citoesqueleto de actina que, como se ha comentado en el punto II.1 de esta introducción, juega un papel fundamental en los procesos de crecimiento, orientación y ramificación, tanto de axones como de dendritas. También las espinas dendríticas, implicadas en procesos de plasticidad sináptica y aprendizaje, son muy ricas en actina (Fischer *et al.*, 1998). La familia de las Rho GTPasas, y en concreto las proteínas Rho, Rac y Cdc42, juegan un papel importante en la remodelación del citoesqueleto de actina (ver punto II.1). Estas proteínas funcionan como “interruptores” en la célula, alternando entre su forma activa, unida a GTP, y la inactiva, unida a GDP (Figura I8). En este ciclo intervienen, además, 3 tipos de proteínas reguladoras:

- GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*): estimulan el intercambio de GDP por GTP, activando así a las GTPasas.
- GAPs (*GTPase activating proteins*): estimulan la hidrólisis de GTP a GDP por parte de las GTPasas, inactivándolas.
- GDIs (*Rho guanine nucleotide dissociation inhibitors*): estabilizan la forma inactiva de las GTPasas unida a GDP.

Esta variedad de factores permite una regulación muy estrecha de las GTPasas, puesto que éstos, a su vez, pueden ser regulados por componentes anteriores de las vías de señalización.

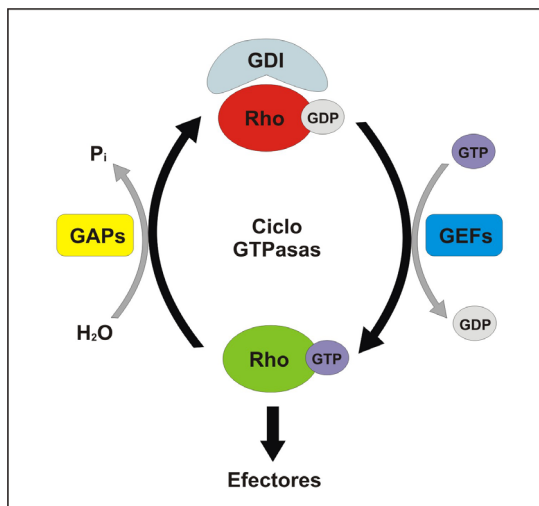


Fig. I8: Ciclo de las Rho GTPasas.

Las GTPasas alternan entre su forma activa, unida a GTP y la inactiva, unida a GDP. Existen proteínas que estabilizan la forma unida a GDP, manteniendo a la GTPasa en estado inactivo, las GDIs. Las GEFs promueven el intercambio de GDP por GTP, activando así a las GTPasas. A pesar de su nombre, la actividad GTPasa intrínseca de estas proteínas es muy escasa. Las GAPs incrementan esta tasa intrínseca de hidrólisis de GTP, devolviendo así a la GTPasa a su estado inactivo. Diferentes señales extracelulares, actuando a través de diversas vías de señalización, pueden actuar sobre las GEFs y las GAPs, regulando así de forma indirecta la actividad de las GTPasas.

Las proteínas codificadas por estos 4 genes intervienen en los ciclos de Rho, Rac y/o Cdc42, por lo que, a través de ellos, influyen en la dinámica del citoesqueleto de actina en respuesta a estímulos externos. Ramakers (2002) ha publicado una revisión sobre este tema.

FGD1 (EYVE, RhoGEF and PH domain containing 1): también llamado *FGDY*. La proteína codificada actúa como GEF sobre Cdc42, promoviendo el intercambio de GDP por GTP, lo que activa a esta GTPasa. FGD1 también activa la cascada de la MAP quinasa que conduce a la activación de la kinasa c-Jun SAPK/JNK1, pero no estimula la cascada de la MAP quinasa regulada por Ras que lleva a la activación de ERK2 (Olson *et al.*, 1996). Con respecto a la dinámica del citoesqueleto de actina, FGD1 puede interactuar a través de su dominio SH3 con la proteína cortactina, que promueve la polimerización de actina a través del complejo Arp2/3 (Kim *et al.*, 2004).

OPHN1 (oligophrenin 1): codifica la proteína oligofrenina 1, que actúa como GAP frente a Rho, Rac y Cdc42, estimulando la actividad GTPasa de estas proteínas y, por tanto, inactivándolas. Se expresa predominantemente en cerebro fetal y adulto, tanto en neuronas como en células gliales. Las mutaciones halladas en este gen provocan la pérdida de función

de la proteína, lo que conlleva una activación excesiva de las GTPasas. Esto ha podido ser correlacionado recientemente con una disminución significativa en la longitud media de las espinas dendríticas en células piramidales CA1 de hipocampo de rata (Govek *et al.*, 2004).

PAK3 (*p21 (CDKN1A)-activated kinase 3*): la proteína codificada por este gen es uno de los miembros de la familia de las *p21-activated kinases*, que son serín-treonín quinasas activadas por las Rho GTPasas. La actividad de esta quinasa está reprimida por una interacción intramolecular que es eliminada cuando interacciona con Rac o Cdc42 (revisado en Bagrodia y Cerione, 1999). Su función como efector relaciona a las Rho GTPasas por una parte con la remodelación del citoesqueleto de actina, a través de su acción sobre la LIM-quinasa y la MRLC (*myosin regulatory light chain*), y por otra con vías de señalización nuclear JNK/p38 y Erk.

ARHGEF6 (*Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6*): este gen codifica una proteína con función GEF frente a Rac y Cdc42, conocida también como α -PIX o Cool2. Las mutaciones que se han identificado generan transcritos incompletos, bien en su extremo 3', o bien por ausencia del exón 2, lo que provoca una pérdida de parte del dominio CH (*calponin homology domain*). En ambos casos se ve alterada la localización subcelular de la proteína. α -PIX interacciona con β -parvin (Rosenberger *et al.*, 2003) y con calpain 4 (Rosenberger *et al.*, 2005), proporcionando así un probable nexo de unión entre la señalización vía integrinas y la remodelación del citoesqueleto de actina en respuesta a estas señales. Además, esta proteína también interacciona directamente con PAK3 que es uno de los efectores de Rac y Cdc42.

B. Genes implicados en la sinapsis

Al menos 4 de los genes en los que se han identificado mutaciones en pacientes de MRX parecen jugar un papel en las sinapsis neuronales. Como ya se ha comentado, la formación de estas conexiones, su correcto funcionamiento y su capacidad de adaptación en función de su uso (plasticidad), son esenciales para los procesos cognitivos. Estos genes son los siguientes:

NLGN4X (*neuroligin 4, X-linked*): la proteína codificada por este gen pertenece a la familia de las neuroliginas, que, como se ha descrito en el punto II.1 de esta introducción, juega un papel en el establecimiento de las uniones sinápticas a través de su interacción con las neuexinas y con proteínas citoplasmáticas de ensamblaje postsinápticas, como PSD95 y S-SCAM (Rao *et al.*, 2000). Estas uniones podrían conectar a las neuroliginas con los receptores NMDA y con proteínas de vías de señalización, que mediarían así también en procesos de diferenciación postsináptica.

IL1RAPL (*interleukin 1 receptor accessory protein-like 1*): codifica un miembro de la familia de las proteínas accesorias del receptor de interleukina1 (IL1). Esta proteína no es un receptor de IL-1, ni activa las vías NF κ B, pero se ha demostrado que interacciona con la proteína NCS-1 (Bahi *et al.*, 2003), que está implicada en la regulación de la exocitosis en neuronas y células neuroendocrinas (McFerran *et al.*, 1998), por lo que IL1RAPL podría formar parte de una vía implicada en modular la liberación de neurotransmisores.

DLG3 (*discs, large homolog 3*): este gen codifica la proteína asociada a sinapsis 102 (SAP102), que forma parte de la familia de guanilato ciclasas asociadas a membrana. Esta proteína, que se concentra en las densidades postsinápticas, interacciona con el receptor NMDA (Lau *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1996) y parece jugar un papel también en las primeras etapas de su procesado (Sans *et al.*, 2003). También une calmodulina de forma dependiente de calcio e interacciona con PSD95/SAP90 (Masulo *et al.*, 1999). Estas interacciones podrían regular la acumulación de receptores postsinápticos, provocando cambios estructurales en las sinapsis.

GDI1 (GDP dissociation inhibitor 1): α GDI, la proteína codificada por este gen, es una GDI (ver figura 18) que interacciona con Rab3A. Las proteínas Rab son GTPasas implicadas en el transporte de vesículas, así como en procesos de exo-y endocitosis (Novick y Zerial, 1997). Rab3A está implicada en la liberación de neurotransmisores por exocitosis de vesículas sinápticas (Geppert *et al.*, 1994), y α GDI funciona rescatando a Rab3A-GDP de la membrana de las vesículas sinápticas que ya han sufrido exocitosis y devolviéndola a la reserva citoplásmica para su reutilización (Ullrich *et al.*, 1993). Además, la expresión de α GDI parece ser esencial para el crecimiento axonal durante el desarrollo (D'Adamo *et al.*, 1998).

C. Genes implicados en la remodelación de la cromatina y el control transcripcional

Ocho de los genes responsables de MRX están implicados en el control de la expresión génica, bien a través de la modificación de la cromatina, o bien directamente en la regulación de la transcripción. Como se ha visto en el punto II.2, la regulación génica y la síntesis proteica son necesarias para el establecimiento de la memoria a largo plazo.

RPS6KA3 (ribosomal protein S6 kinase, 90 kDa, polypeptide 3): también llamado RSK2. Codifica una serín-treonín quinasa que es activada a través de la vía Ras-ERK (una vía de MAP quinasas), es decir, en respuesta a factores de crecimiento, citoquinas y muchas hormonas peptídicas y neurotransmisores. Como sustratos de RSK2 se incluyen factores de transcripción como CREB, el receptor de estrógenos α , NF κ B y c-Fos, así como las proteínas coactivadoras CBP (CREB-binding protein) y p300 (revisado en Frödin y Gammeltoft, 1999) y otra serie de proteínas celulares, incluida la histona H3 (Sassone-Corsi *et al.*, 1999), lo que sugiere que la remodelación de la cromatina podría contribuir a la regulación de la expresión génica dependiente de las MAP quinasas.

ARX (aristaless related homeobox): este gen codifica una nueva proteína homeodominio relacionada con la proteína del gen *Aristaless* de *Drosophila*. Este tipo de proteínas influyen en momentos decisivos a lo largo del desarrollo, y se ha propuesto que los productos de los genes homeobox relacionados con *Aristaless* regulan eventos esenciales durante la embriogénesis de vertebrados (Meijlink *et al.*, 1999) y, en particular, en el desarrollo de la cabeza (Galliot y Miller, 2000), lo que concuerda con el patrón de expresión de ARX, que se muestra específico de prosencéfalo durante el desarrollo embrionario (Bienvenu *et al.*, 2002). Estas proteínas actúan como represores transcripcionales.

ZNF41 (zinc finger protein 41): la proteína codificada por este gen es un miembro de la familia KRAB/FPB de proteínas con dedos de zinc tipo Krueppel, que son reguladores transcripcionales muy conservados evolutivamente. Sobre la función concreta de ZNF41 no existen todavía muchos datos, pero hay estudios bioquímicos que relacionan a los miembros de la subfamilia KRAB/ZFP con la remodelación de la cromatina a través del correpressor KAP-1, que recluta proteínas asociadas a heterocromatina e interacciona con la metiltransferasa SETDB1, específica de la lisina 9 de la histona H3 (Ryan *et al.*, 1999; Schultz *et al.*, 2002). Curiosamente, MeCP2 se asocia con una metiltransferasa aún desconocida que también metila la lisina 9 de H3 (Fuks *et al.*, 2003). KAP-1 presenta también un dominio PHD, necesario para el silenciamiento génico, al igual que la proteína ATRX.

SMCX (Smcy homolog, X-linked): también llamado JARID1C (*Jumonji AT-rich interactive domain 1C*). Codifica una proteína de unión a DNA de la familia ARID (revisada en Kortschak *et al.*, 2000 y Wilsker *et al.*, 2002), con dominios JmJN, Arid/Bright, PHD Zinc finger, JmJC y C5HC2 Zinc finger, y se expresa principalmente en cerebro y músculo (Jensen *et al.*, 2005). Las proteínas de la familia ARID están conservadas evolutivamente y están implicadas en regulación transcripcional. Algunas de ellas participan en procesos de remodelación de la cromatina, como Swi1p, de *Saccharomyces cerevisiae*, que forma parte del complejo SWI-SNF (O'Hara *et al.*, 1988).

ATRX (*alpha thalassemia / mental retardation syndrome X-linked*): también llamado *XNP*. La proteína codificada por este gen contiene un dominio PHD muy conservado, propio de proteínas asociadas a la cromatina, y un extremo C-terminal que la identifica como miembro de la familia de helicasas/ATPasas SNF2. Se localiza en la heterocromatina pericentromérica y une a HP1. Forma parte de un complejo multiproteico y probablemente esté implicada en remodelación de la cromatina, metilación del DNA y regulación génica (Villard y Fontes, 2002). También es un mediador crítico de la supervivencia de las neuronas durante las primeras etapas de la diferenciación neuronal, donde actúa inhibiendo la apoptosis (Bérubé *et al.*, 2005).

MECP2 (*methyl CpG binding protein 2*): codifica una proteína que se une al DNA metilado a través de un dominio MBD (Lewis *et al.*, 1992). Posee además un dominio represor de la transcripción (TRD), que interacciona con el correpresor SIN3A para reclutar a deacetilasas de histonas, lo que finalmente provoca la represión transcripcional (Nan *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998), puesto que la deacetilación de las histonas H3 y H4 altera la estructura de la cromatina, haciéndola inaccesible a la maquinaria de transcripción. Entre las dianas específicas de MeCP2 se incluyen el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el gen *Hairy2a*, que son relevantes para la plasticidad sináptica a largo plazo, el aprendizaje y la memoria (Chen *et al.*, 2003; Pang *et al.*, 2004), y para neurogénesis (Stancheva *et al.*, 2003), respectivamente.

FMR2 (*fragile X mental retardation 2*): codifica una proteína nuclear perteneciente a la familia AF4/FMR2 de reguladores transcripcionales (Gecz *et al.*, 1997b). La identificación de Lilli, el producto del gen *lilliputian* de *Drosophila*, como nuevo miembro de esta familia, ha proporcionado nuevos datos funcionales: Lilli desempeña una función específica en la regulación de la eficiencia de la transducción de señales por debajo de Raf, en la vía Ras-ERK, en la que podría estar regulando los niveles de uno o varios de los componentes (Wittwer *et al.*, 2001). Además, Lilli también regula la expresión de *Sryα*, un regulador zigótico del citoesqueleto de actina (Tang *et al.*, 2001).

D. Otros genes:

Aquí se engloban el resto de genes responsables de MRX, que no se pueden adscribir a ninguna de las categorías anteriores:

TSPAN7 (*tetraspanin 7*): también llamado TM4SF2. Este gen codifica una proteína de la superfamilia de las tetraspaninas: proteínas de superficie celular con 4 dominios transmembrana y dos dominios extracelulares, que interaccionan con dímeros de integrinas, formando complejos proteicos. Las integrinas hacen de transmisoras de señales extracelulares, que controlan la proliferación, supervivencia, diferenciación y movilidad celular, así como la inducción génica, y pueden regular la formación del citoesqueleto de actina y el crecimiento de neuritas (Schoenwalder y Burridge, 1999; Stipp y Hemler, 2000). Homólogos en *Drosophila* de estos dos tipos de proteínas están implicados en formación y plasticidad sinápticas (Rohrbough *et al.*, 2000), aunque esta función aún no se ha demostrado para las proteínas humanas.

FTSJ1 (*FtsJ homolog 1*): este gen codifica una proteína de unión a S-adenosilmetionina. Su función exacta se desconoce, pero por pertenecer a la subfamilia Trm7 (Feder *et al.*, 2003), se piensa que podría jugar un papel en la modificación posttranscripcional del tRNA, estando así implicada en la traducción.

PQBP1 (*polyglutamine binding protein 1*): la proteína codificada por este gen presenta varios dominios funcionales: WW, dominio de aminoácidos polares y dominio C2, que le permiten interaccionar con motivos ricos en prolina de otras proteínas, trectos de poliglutamina y la proteína U5-15kD, respectivamente (Waragai *et al.*, 1999; 2000). Se ha propuesto que PQBP1 podría actuar como nexo de unión entre múltiples proteínas, proporcionando una vía de conexión entre dos procesos nucleares muy relacionados entre sí: la transcripción y el procesado de RNAs (Okazawa *et al.*, 2001). De este gen y la proteína que codifica se hablará más en detalle en las secciones Resultados y Discusión.

ACSL4 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4): también llamado *FACL4*. La proteína codificada por este gen es una acil-CoA sintetasa, implicada en el metabolismo celular de los ácidos grasos. A través de su actividad enzimática, estas proteínas afectan a diversos procesos celulares, como la distribución de iones, el transporte vesicular, la fusión a membrana y la expresión génica (revisado en Faergeman y Knudsen, 1997). La reducción de la actividad de este enzima puede alterar la disponibilidad de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga libres en el cerebro, y se ha demostrado que este equilibrio es importante para las neuronas cuando los conos de crecimiento se convierten en terminales presinápticos (Martin y Bazan, 1992) y cuando tiene lugar la formación de membranas sinaptosómicas (Rapoport *et al.*, 2001).

AGTR2 (angiotensin II receptor, type 2): codifica uno de los dos receptores de la angiotensina II, que, junto al resto de componentes del sistema renina-angiotensina, juega un papel en la regulación de la presión sanguínea y del balance electrolítico (Chung *et al.*, 1996). Sin embargo, la acción del péptido Ang II está mediada principalmente por el receptor AGTR1 (Gallinat *et al.*, 2001), y se desconoce cuál es la función exacta de AGTR2. Éste es un receptor transmembrana acoplado a una proteína G inhibidora, y algunos autores han propuesto una función de esta proteína en el desarrollo cerebral basándose en su expresión en cerebro fetal y adulto (Saavedra, 1999; Nuyt *et al.*, 1999, y Ge y Barnes, 1996).

SLC6A8 (solute carrier family 6 member 8): codifica un transportador de creatina, que es una molécula que juega un papel esencial en el almacenamiento y la transmisión de energía unida a fosfatos. La existencia de otras dos deficiencias: arginina-glicina amidinotransferasa (Item *et al.*, 2001) y guanidinoacetato metiltransferasa (Stöckler *et al.*, 1996), indican la importancia del metabolismo de la creatina para una correcta función cerebral. Hay evidencias de que existe una relación directa entre la creatina quinasa y la liberación de neurotransmisores, el restablecimiento de los gradientes iónicos antes y después de la despolarización (Wallimann y Hemmer, 1994) y la migración de los conos de crecimiento neuronales (Wang *et al.*, 1998).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El presente trabajo pretende contribuir al conocimiento de las causas genéticas y moleculares del retraso mental ligado al cromosoma X, tanto de las formas sindrómicas como inespecíficas. Para abordarlo se plantearon, en su día, una serie de objetivos concretos:

1. Búsqueda de un nuevo gen, cuyas mutaciones provocan retraso mental inespecífico, en una región de 3Mb en Xp22.
2. Identificación y caracterización de la mutación patológica en el gen *RPS6KA3*, responsable de un caso de síndrome de Coffin-Lowry.
3. Búsqueda del gen responsable del síndrome de Prieto.
4. Identificación de la mutación génica en un caso familiar de síndrome de Lenz.
5. Caracterización de los posibles genes implicados en retraso mental identificados en los análisis anteriores

MATERIAL Y MÉTODOS

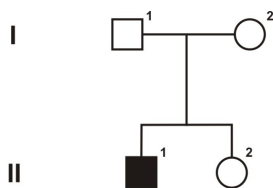
MATERIAL Y MÉTODOS

I. Muestras de los pacientes

Tanto el DNA genómico, como el RNA para la síntesis posterior de cDNA, se han obtenido a partir de muestras de sangre periférica. Estas extracciones, así como las retrotranscripciones para obtener el cDNA se realizaron en la Unidad de Genética del Hospital La Fe de Valencia.

I.1 Familia fELX72 con Síndrome de Coffin-Lowry (MIM 303600)

En esta familia hay un único paciente afectado por el síndrome de Coffin-Lowry. En la tabla M1 se recogen los síntomas asociados a este síndrome, así como aquellos presentados por el paciente.



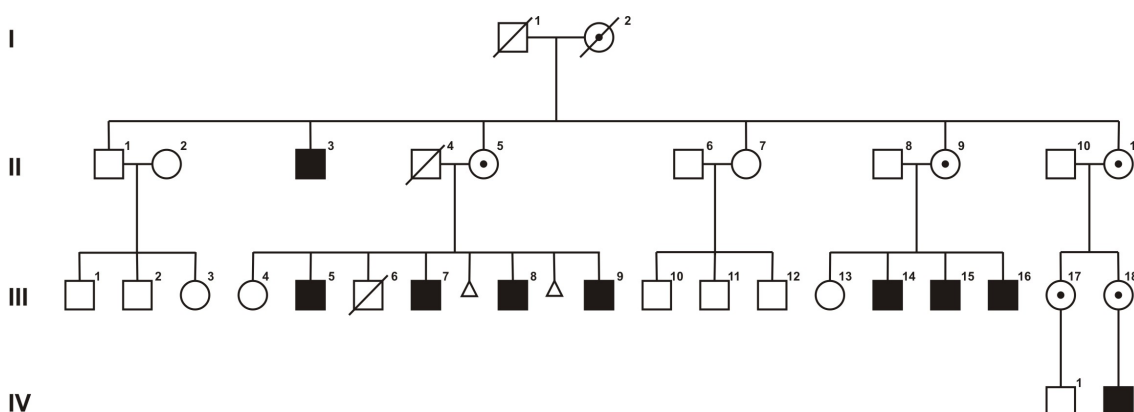
Se dispuso de DNA genómico de los cuatro miembros de la familia, así como de RNA del individuo II-1 (EX441).

Signos clínicos	Paciente II.1
Retraso mental moderado - grave	+
Retraso del desarrollo	-
Hipotonía	+
Déficit auditivo sensorineural	+
Convulsiones	-
Frente prominente	+
Fisuras palpebrales inclinadas	+
Hipertelorismo	+
Nariz ancha	+
Narinas evertidas	+
Boca amplia	+
Labios gruesos evertidos	+
Hipoplasia maxilar	+
Orejas grandes evertidas	+
Cejas ralas en zona proximal	-
Escoliosis	-
Pectus carinatum	+
Dedos ahusados con falanges en palillos de tambor	+
Laxitud articular	-
Antebrazos anchos	+
Pies planos	+
Hernia	-

Tabla M1: Signos clínicos del síndrome de Coffin-Lowry presentes en el paciente.

I.2 Familia fELX7 con Síndrome de Prieto (MIM 309610)

En esta familia de 4 generaciones hay 9 individuos afectados por el síndrome de Prieto en 3 de ellas. Los principales signos clínicos que definen este síndrome, descrito en 1987 por Prieto y colaboradores, son: retraso mental, rasgos faciales dismórficos, malformaciones del pabellón auditivo externo, clinodactilia, atrofia cerebral subcortical y anomalías en el fondo de ojo, aunque los pacientes también pueden presentar anomalías dentales, luxación patelar y malformaciones de las extremidades inferiores. La enfermedad presenta ligamiento en la región Xp11.4.



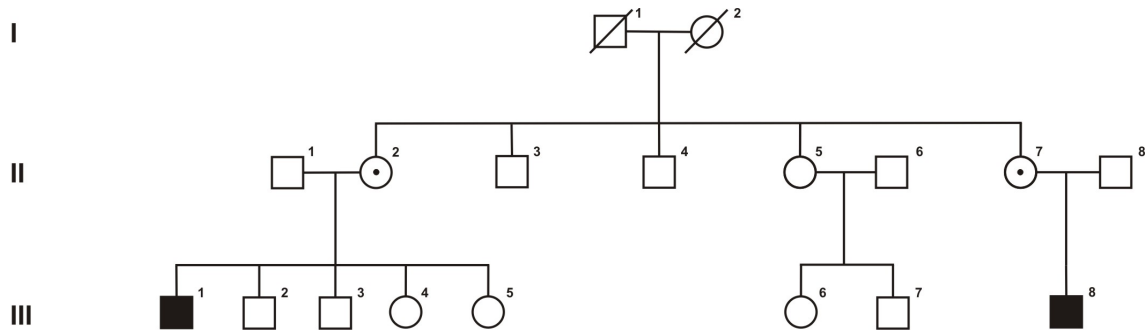
En este caso se pudo acceder a material de numerosos miembros de la familia, como recoge la siguiente tabla:

Individuo	Código	Material	Individuo	Código	Material
II-5	EX515	DNA	III-12	EX583	DNA, cDNA
II-7	EX581	DNA	III-13	EX309	DNA
III-6	III-6	DNA	III-15	III-15	DNA
III-7	EX446	DNA, cDNA	III-16	III-16	DNA
III-8	III-8	DNA	III-17	III-17	DNA
III-9	EX656	DNA	III-18	EX31	DNA
III-11	EX582	DNA, cDNA	IV-2	EX38	DNA

Tabla M2: Pacientes de la familia fELX7 para los que se dispuso de material genético.

I.3 Familia fELX91 con Síndrome de Lenz (MIM 309800)

En esta familia hay dos primos en la tercera generación que presentan el fenotipo de Síndrome de Lenz. El diagnóstico clínico se fundamenta en la presencia de los siguientes signos clínicos: retraso mental grave, microftalmia, microcefalia, talla corta, coloboma de coroides, hipoplasia renal y diplegia espástica. Los pacientes presentan además algunos rasgos dismórficos craneoencefálicos y digitales que suelen presentarse asociados a este síndrome. El análisis con marcadores genéticos a lo largo del cromosoma X indicó la existencia de un posible ligamiento del gen responsable en la región cromosómica Xp11.4 - Xq21.



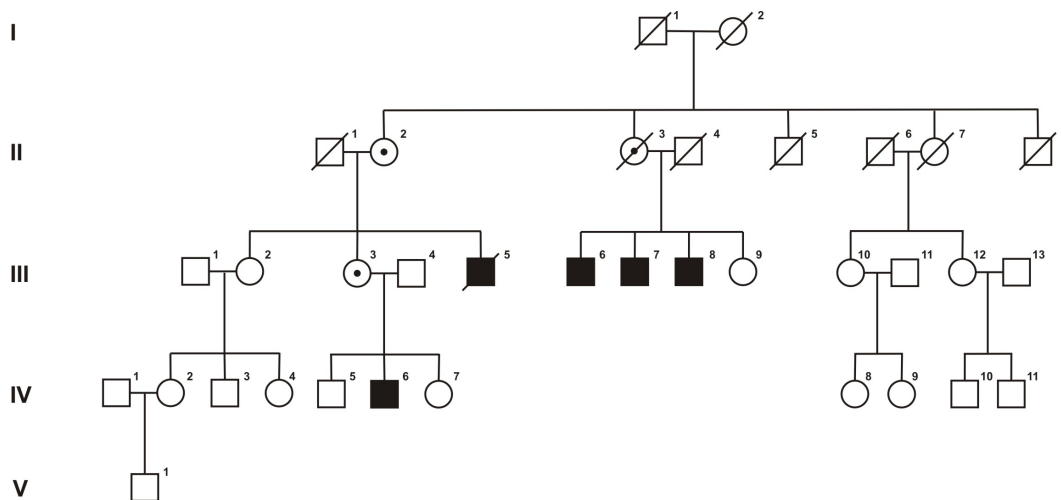
El análisis de mutaciones se llevó a cabo con DNA genómico de III-1 (EX522) y cDNA de III-8 (EX525), pero posteriormente se dispuso de DNA genómico de los siguientes miembros:

Individuo	Código	Individuo	Código	Individuo	Código
II-2	EX518	II-7	EX521	III-5	EX588
II-3	EX519	III-2	EX523	III-6	EX615
II-4	EX520	III-3	EX524	III-7	EX616
II-5	EX586	III-4	EX587		

Tabla M3: Pacientes de la familia fELX91 para los que se dispuso de material genético.

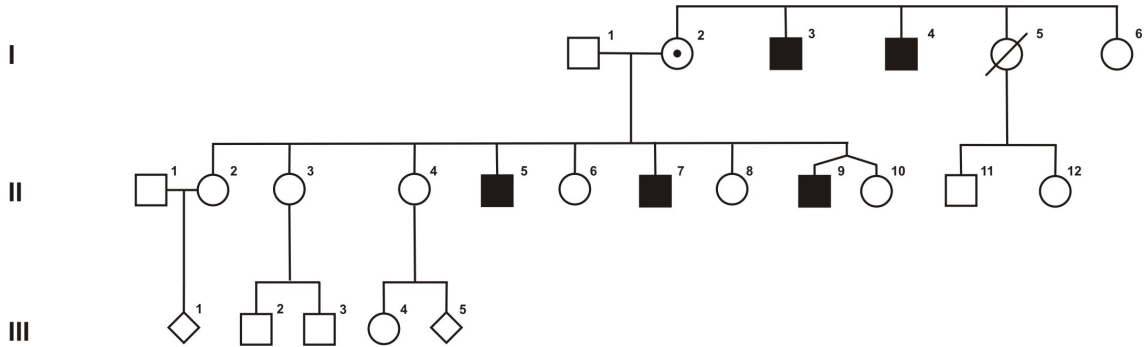
I.4 Familias con retraso mental inespecífico

fELX2: Familia de cinco generaciones con 5 individuos afectados de retraso mental inespecífico en dos de ellas. El análisis de ligamiento permitió obtener un valor *lod* superior a 2, por lo que se le ha podido asignar un número MRX (**MRX73**). La región candidata a albergar el gen mutado en los pacientes de esta familia se encuentra en Xp22.2.



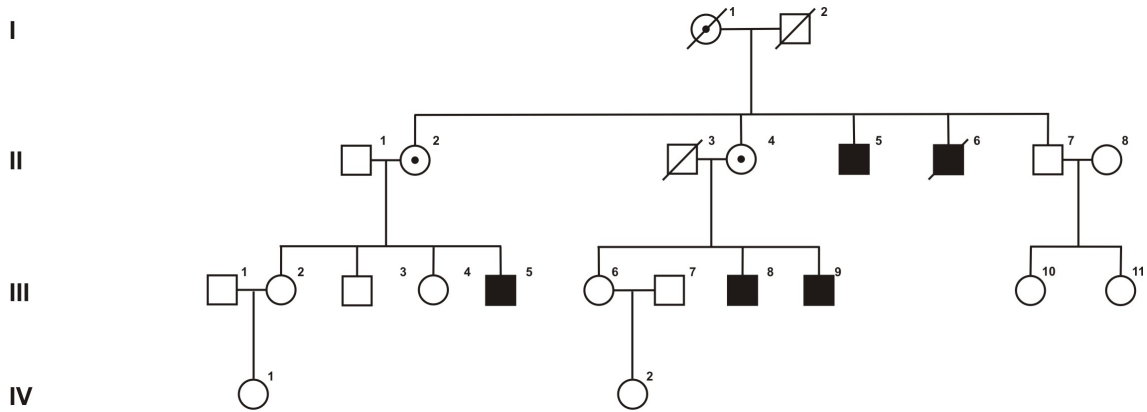
Para el análisis de mutaciones se ha trabajado con DNA genómico obtenido de IV-6 (EX28).

fELX17: En este caso se trata de una familia de tres generaciones, con 5 individuos afectados de retraso mental inespecífico en dos de ellas. El análisis de ligamiento ha permitido excluir el cromosoma X entero, salvo 2 regiones: Xp22.2 y Xq26-27.



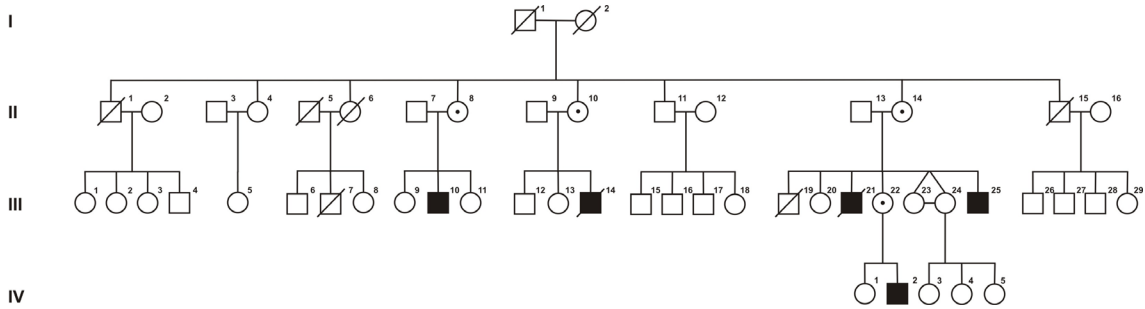
El DNA genómico empleado en el análisis de mutaciones proviene de varios pacientes: I-3 (EX 146), I-4 (EX 121) y II-9 (EX 119). A pesar de contar también con material de II-7 (EX 118), éste nunca dio resultados en las amplificaciones por PCR, debido probablemente a una degradación del DNA.

fELX18: En esta familia aparecen 5 individuos afectados de retraso mental inespecífico en dos de las cuatro generaciones. También en este caso hay dos posibles localizaciones candidatas a albergar el gen responsable: Xp22 y Xq22.2-Xq24.



El análisis de mutaciones se ha llevado a cabo con DNA genómico del individuo II-5 (EX 129).

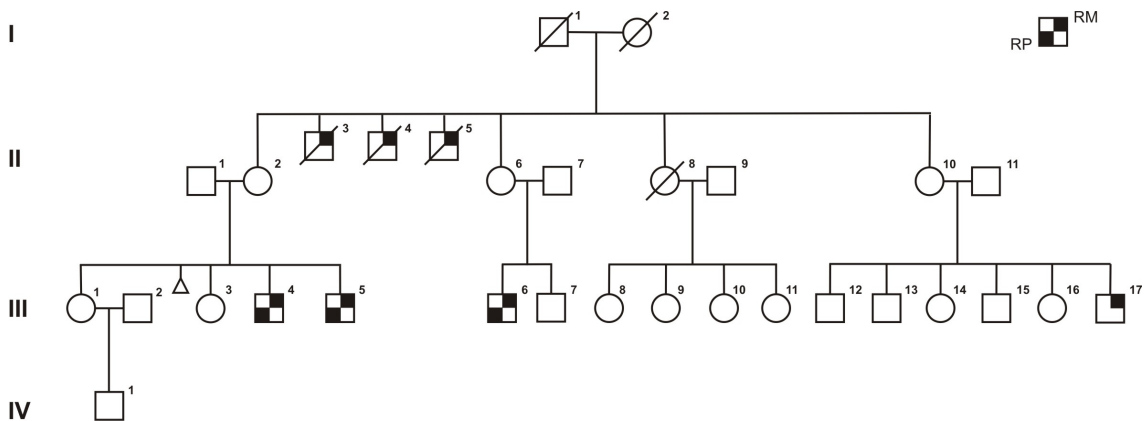
fELX101: En esta familia de cuatro generaciones aparecen 5 individuos con retraso mental inespecífico en las dos últimas. Al igual que para MRX73, se ha obtenido un valor *lod* superior a 2, por lo que se le ha podido asignar un número MRX (**MRX82**). La región candidata a albergar el gen mutado en los pacientes de esta familia se encuentra en Xq24-Xq25.



Para el análisis de mutaciones se ha usado DNA genómico de III-10 (EX553).

I.5 Familia fELX20 con retraso mental inespecífico y retinosis pigmentaria

Esta familia presenta un fenotipo más complejo que las cuatro anteriores, ya que los pacientes están afectados no sólo por retraso mental inespecífico (RM), sino además por una forma tardía de retinosis pigmentaria (RP) de progresión lenta. Los tres individuos de la segunda generación que presentaban retraso mental murieron jóvenes. Como además no se realizaron estudios de fondo de ojo, no se puede saber si hubieran desarrollado también retinosis pigmentaria. El individuo III-17 presenta únicamente retraso mental, pero muy probablemente de etiología diferente, por lo que no estaría relacionado con el resto de enfermos (de hecho, el análisis de ligamiento corrobora esta hipótesis). La región candidata a albergar el gen responsable de este fenotipo es Xp22.3-Xp22.2.



En este caso se han efectuado los análisis de mutaciones con DNA genómico del individuo III-6 (EX141), pero se ha dispuesto además de material de varios miembros más, como se recoge en la siguiente tabla:

Individuo	Código	Material	Individuo	Código	Material
II-2	EX 139	DNA	III-6	EX 141	DNA
II-6	EX 140	DNA	III-8	EX 272	DNA
II-9	EX 271	DNA	III-12	EX 221	DNA
II-10	EX 143	DNA	III-13	EX 222	DNA
III-1	EX 269	DNA	III-17	EX 145	DNA
III-4	EX 137	DNA	IV-1	EX 293	DNA
III-5	EX 138	DNA			

Tabla M4: Pacientes de la familia fELX20 para los que se dispuso de material genético.

Además de las muestras ya descritas, se ha trabajado también con dos muestras cedidas por el Dr. Schwartz, del *Greenwood Genetic Center* (Carolina del Sur, E.E.U.U.). Se trata de los pacientes CMS 3235, de la familia MRX59 (K8943), y CMS 3245, de la familia K8944. En ambos casos el material ha sido DNA genómico extraído de líneas celulares (linfoblastos) de los pacientes.

II. Material biológico

II.1 Cepas bacterianas

Cepa	Genotipo
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 ara</i> Δ139 Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK λ⁻ rpsL nupG</i> λ ⁻
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 ara</i> Δ139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL (Str^R) nupG</i>

Tabla M5: cepas bacterianas empleadas en este trabajo.

II.2 Líneas celulares eucariotas

Línea celular	Descripción
CHO-K1	Células de ovario de hámster (Chinese Hamster Ovary).

Tabla M6: líneas celulares eucarióticas empleadas en este trabajo.

III. Construcciones

Clon	Descripción	Resistencia
pSIH 1	Pauta de lectura completa del gen <i>FLJ14503</i> , amplificada con SIH-EGFP-F y SIH-EGFP-R, clonada en pCR2.1. Sin mutaciones.	Ampicilina / Kanamicina
pSIH 2	Pauta de lectura completa del gen <i>FLJ14503</i> subclonada en pEGFP-C1 en los sitios <i>SacI</i> y <i>SacII</i> , a partir de pSIH 1.	Kanamicina
pSIH 3	Pauta de lectura completa del gen <i>FLJ14503</i> , amplificada con SIH-EGFP-F y SIH-EGFP-R2, clonada en pCR2.1. Sin mutaciones.	Ampicilina / Kanamicina
pSIH 4	Pauta de lectura completa del gen <i>FLJ14503</i> subclonada en pEGFP-N3 en los sitios <i>SacI</i> y <i>SacII</i> , a partir de pSIH 3.	Kanamicina
pSIH 5	Pauta de lectura completa del gen <i>FLJ14503</i> , variante G1734T, generada por Megaprime Mutagenesis a partir de pSIH 1 con SIH-EGFP-F, SIH-MEGA-F, SIH-MEGA-R y SIH-EGFP-R2, clonada en pCR2.1.	Ampicilina / Kanamicina
pSIH 6	Pauta de lectura completa del gen <i>FLJ14503</i> , variante G1734T, subclonada en pEGFP-C1 en los sitios <i>SacI</i> y <i>SacII</i> , a partir de pSIH 8.	Kanamicina
pSIH 7	Pauta de lectura completa del gen <i>FLJ14503</i> , variante G1734T, subclonada en pEGFP-N3 en los sitios <i>SacI</i> y <i>SacII</i> , a partir de pSIH 8.	Kanamicina
pINS	Producto de PCR generado con los primers <i>rsk-4F</i> y <i>rsk-4R</i> sobre DNA genómico del paciente EX441 y clonado en pCR2.1. Contiene la inserción completa del elemento LINE1 causante de la mutación.	Ampicilina / Kanamicina

Tabla M7: construcciones generadas a lo largo de este trabajo.

IV. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos han sido suministrados por diferentes casas comerciales y se han diseñado durante la realización de este trabajo, salvo las excepciones que se especifican. A continuación se presenta la secuencia nucleotídica de los cebadores utilizados en la amplificación de cada gen analizado, así como las condiciones de cada amplificación (temperatura de asociación, concentración de iones magnesio, polimerasa y programa empleados). Estos mismos oligos se utilizaron para la secuenciación de los respectivos amplicones. La descripción de los diferentes programas de amplificación se realiza en el apartado VIII.2.2. Cuando en la columna de temperatura de asociación figuran dos valores, como programa de PCR aparecerá siempre un *touchdown* (TD). Los dos valores representan en estos casos las temperaturas inicial y final del programa (ver VIII.2.2). Los genes se indican siguiendo el orden que ocupan en el cromosoma X desde Xpter hasta Xqter.

Gen *RBBP7* (NM_002893).

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 1	RBBP7-F1 RBBP7-R1	CACGCCAATTCGCGCCTTTTCG AGTGTGACGCGCTTGAAACG	55°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN) + Q-Solution
Exón 2	RBBP7-F2 RBBP7-R2	GATCTATCTCAGCCACTTAATC TGATTACATACTTATGTTCTATGC	50°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 3	RBBP7-F3 RBBP7-R3	GATTTCTTGTAGGATTAGTGTG GTTCTGTAGAATAAAGTCCTAG	50°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 4	RBBP7-F4 RBBP7-R4	CTGTTAGGTTGATTGAAGTAAAGTG CTGCTCAAGTAATGACCTAACTC	50°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 5	RBBP7-F5 RBBP7-R5	CAGATCTCGTTCGTGTGCAGTTG GACACGTCAGCTCTCACTATATG	55°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 6	RBBP7-F6 RBBP7-R6	GTGACAGACTGAGACACTGTCTC GCAGCAATCACTGATGGTCATTC	55°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exones 7 y 8	RBBP7-F7/8 RBBP7-R7/8	GTGCAGTGACAGTGATGTGAG CATGTAACACCACGTACAAGAC	50°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 9	RBBP7-F9 RBBP7-R9	CAACAGCCACAAACCTAGCAGC GCAGTATCTTGTACAGGACTG	55°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 10	RBBP7-F10 RBBP7-R10	GTTTAGCAGATGTTCTGTGCTAC TGAAACCATCTGCAAGAGCTAG	50°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 11	RBBP7-F11 RBBP7-R11	CATAATATGCACCTACATATTCG AGGATTAACAGGAGAGTATATG	50°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 12	RBBP7-F12 RBBP7-R12	GCATTCATGTAGCATTACATTC ACATACGGAATTACACACTGG	50°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme

Tabla M8: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *RBBP7*.

Gen *REPS2* (NM_004726).

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 1	REPS2-F1 REPS2-R1	GTGAAATTGGGTGTTTCAGCATTG ACTAAGCTACCTACCTGCCAAG	55°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 2	REPS2-F2 REPS2-R2	AGTCTGACTAGAGCTTCTCTG GGAAGCTGAACAGTAGATACG	50°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 3	REPS2-F3 REPS2-R3	AAGGAGTCTCTAAGACACTGC TCCTGACTGCAGCTCAGAAC	53°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 4	REPS2-F4N REPS2-R4N	GGGTCCATCAAAAAGCCATGTC CTGAAAAGCAGATGCTGTAT	55°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 5	REPS2-F5 REPS2-R5	CTAAAGACAGGTTCTCTGAGC ATGTTCTGGTGAGAGTGATGC	55°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 6	REPS2-F6 REPS2-R6	GATGATGGTATGAATGTCATATG TGGTTATACAGAAGAGATTGCTG	50°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 7	REPS2-F7 REPS2-R7	GGTAGGTAATCATGACATTTG GGTTTACAGTTGATGGTGAGG	55°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 8	REPS2-F8 REPS2-R8	CATATGTGGTCTATCAGAGCTAG ATGGATTTAGCTCCATACACATC	50°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 9	REPS2-F9 REPS2-R9	TTCATCATATGTGCGCATCAC AGGTAACAGGTAGAACGCTG	55°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 10	REPS2-F10 REPS2-R10	GTAAGTGATGACTAGCGATTC GGTATCAATCTTCTACTCACTG	50°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 11	REPS2-F11 REPS2-R11	CTCATATCCTAAGCTTTACATC CTGTTGATGTGTTCTGTACTAG	50°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 12	REPS2-F12 REPS2-R12	CCACTGTGGCAGACACACATC TGCTTTGGTAGCTCATCGGTTTC	58°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 13	REPS2-F13 REPS2-R13	GAAGCACAGCGATAGGACAAC GCCATTGCCATTCCAAGTTAAC	55°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 14	REPS2-F14 REPS2-R14	GTGACTATCTTCCTAAGTGCTC GATCAGCTAATAGAGATAAGAAG	50°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 15	REPS2-F15 REPS2-R15	CTAAAGGCATGTGGGACACTG CATATCCGTCGACATCTCAGAG	58°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 16	REPS2-F16 REPS2-R16	CTCTCATGAATCAGAGTTCTG GTATGGAGACATCACTATGTAC	50°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 17	REPS2-F17 REPS2-R17	GATCTTGGCAGACAAGGTCAC CCTTTGTCTGGTCACCAGC	58°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme

Tabla M9: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *REPS2*.Gen *SCML1* (NM_006746).

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 1	SCML1-1F SCML1-1R	CGAAGTCAAGACTCGCTCTTC GAGCTCTCTGATCCACTCAG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 2	SCML1-2F SCML1-2R	CTACATGTTGCTATTCAGGAAATG TCTCTGCTTAATTTAAGACTTCTG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 3	SCML1-3F SCML1-3R	CTCACTTCTAGCTCATTGGCATC CAAGACATTTCTGATGGCTTGAG	52°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45''
Exón 4	SCML1-4F SCML1-4R	GATGATCCAGTATACCTATTCTC CTCACTGTTGTTTTATGCTGTG	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45''
Exón 5	SCML1-5F SCML1-5R	CCTGCACAGAGGTCATTCAAAG CAGGATAATGATCAGGTCGAGTG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 6	SCML1-6F SCML1-6R	CCACACTAAGAAGGCATTGGTG TCTGCAATGAGCTGCTCTCTAG	52°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45''

Tabla M10: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *SCML1*.Gen *RAI2* (NM_021785).

Fragmento	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
360 - 1260	RAI2-F1 RAI2-R1	GTGGCATCAGAGCTGAGTGATGG GAGGATGTCAAAGGGCTTCAGTTC	70°C 66°C	1.5 mM	Programa TD66, Taq (QIAGEN)
1138 - 2111	RAI2-F2 RAI2-R2	CAGAGTTCTGAATCCAAGTTCAGC CCTCTAGAGCCAATTCACCTTTCC	60°C 56°C	1.5 mM	Programa TD56, Taq (QIAGEN)
159 - 522	RAI2-F4 RAI2-R4	TCCACGCACACAGGATCATGTG CTTCTTTACCAGTTCAGTGGAG	55°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme

Tabla M11: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *RAI2*.Gen *CXorf20* (NM_153346).

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 1	Pred2-1F Pred2-1R	CAGACTCTTGACAGAAGCTTGAG CACACAGTTACCAAGCAGTTAC	62°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 2	Pred2-2F Pred2-2R	GCAAGCAGAAGTAAACATTGTGG AAGGTAGCTTCTCAAGAACTG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 3	Pred2-3F Pred2-3R	GATCACTTGAGCTCAAGAGTTG GTTGAATTTACAGCTCAGTTTGG	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 4	Pred2-4F Pred2-4R	GGATTACAGGCATGAGCCACTG GTTAGCATTCTGAGAGCATATCC	55°C 51°C	1.5 mM	Programa TD55, Hot start Taq (QIAGEN) + Q-Solution cortar banda
Exón 5	Pred2-5F Pred2-5R	AACACTAATTTGCATGAAGGGTG TCATGGAGAAATTGAAGTCTAGG	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 6	Pred2-6F2 Pred2-6R2	CTTCTGATGTCAGGTGATGCAC CCTGATGCTCCAAGATTCCTTC	60°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 7	Pred2-7F Pred2-7R	CCTGTGTATGATTCTGAACTAC TTCGTTTCGAGAAATGTCTTTACC	52°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 8	Pred2-8F Pred2-8R	TGAGTAGATCTGGTGATTGCATC CTGAAGGATAGTTTCACCTGATC	62°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 9	Pred2-9F Pred2-9R	GCTTTCAGTGTCTTGCATCAAGG AGTAGGTCTGCTGGCAACAAATC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 10	Pred2-10F Pred2-10R	GTTATTCCTTCAACTGCCAATAAC GTAATTCCTTGTGACTTTGAGG	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 11	Pred2-11F Pred2-11R	CCTCATGCTATCAGTTCTGAAAC AGAGTGCTCACCATTACACAATG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 12	Pred2-12F Pred2-12R	GTCCAGTGAGTCAGCAAAGAGC GTCAGTTGCTTCCCTAGCAACC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 13	Pred2-13F Pred2-13R	CAGAACAAACACAACCTGAATGG CCTCTCAAATTCTTGAGCCTAAC	62°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 14	Pred2-14F Pred2-14R	GCAAACACTCTGCCAGTACAGC TCCTTTCACAGTCGCAGTAGTAG	62°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Tabla M12: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *CXorf20*.Gen *SCML2* (NM_006089).

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 1	SCML2-1F SCML2-1R	CAGGCAACTAGGCATATACAAATC AAATTCTAAGCACCTAGCATCTCC	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)
Exón 2	SCML2-2F SCML2-2R	CTCTTTCAAGCTGTTGCTGTG GTGAGGAAGAAAACCTATGCTG	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)
Exón 3	SCML2-3F SCML2-3R	AAGAGGCATGGAACATAAAC CACAGACGTCCTCCAACAAG	55°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)
Exón 4	SCML2-4F SCML2-4R	CATAGCTGTCCATGTGTCTTC ACCACCTGACCATCTATTTGC	55°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)
Exón 5	SCML2-5F SCML2-5R	TCTCGAGAAGAATGGTGAATG CCATGTCACAGAAGATTAAGC	50°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)
Exón 6	SCML2-6F SCML2-6R	CACCAACGCTAATCACAAATGC TTCACCTCGAGCACATGAGTC	60°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)
Exón 7	SCML2-7F SCML2-7R	CAAATTAGGAGGACATACAAC TTGAGTCATGAGGAGACAATG	50°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)
Exón 8	SCML2-8F SCML2-8R	TCCAGGACTTCGAAGACACTG GTTTCCAACCTGAGGACTTCTG	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)
Exón 9	SCML2-9F SCML2-9R	GGAAGTGAATTAGACAATGTATTAG GTCTCATTGTTATGTATGCATAC	50°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)
Exón 10	SCML2-10F SCML2-10R	CACAAGATTCTCAAGTGAAC GTATTTCTCATCTCTCTGAGG	50°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)
Exón 11	SCML2-11F SCML2-11R	GAGTATACATAAGTGGTAGCAG AGTGTTTCATGCTGATGATATG	55°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)
Exón 12	SCML2-12F SCML2-12R	GACAAACACATTGAGAGTCAC CTATTGAAGATAGCCTCCTTTG	50°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)
Exón 13	SCML2-13F SCML2-13R	GAGGTCATTCAAAGGCATTAC GATAATGATCAGGTCAAGTATG	55°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)
Exón 14	SCML2-14F SCML2-14R	ACAGTACACCTGAGAATTATG GATTATGATTTCTTCTCTCTG	50°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)

Tabla M13: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *SCML2*.

Gen *STK9 / CDKL5* (NM_003159).

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 1	STK9-1F STK9-1R	GGCAGTTAGCAAAATAGGCTGC GATGTAAGGGTAAGAAGGCTTG	58°C	2 mM	Programa standard Netzyme
Exón 2	STK9-2F STK9-2R	AAGATTGGTTACTAGAGTACTGC CTCTTAGACACACATGTGAATTG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 3	STK9-3F STK9-3R	GAGAAGCAATGTCAGTATAGCAG AAGGAATGCTCAACCTGTACATG	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 4	STK9-4F STK9-4R	CTCTGGCTTCTTGCTACTCTGTC ACAGTGTCTGACCAGCTAGATCC	68°C 64°C	1.5 mM	Programa TD68 Netzyme
Exón 5	STK9-5F STK9-5R	GTACTTCTTATGCAGAAGTACTC GTCCTCAGATTATGAGTACATTG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 6	STK9-6F STK9-6R	GATTCAGCATGAGAAAGTTGTAG GTGATAGAAAAGGAGATATGGAG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 7	STK9-7F STK9-7R	CAGTGATCTAACAGTGTCAATC AATACTCTGAAGAGAGCAGTAC	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 8	STK9-8F STK9-8R	TTC AATTGACATGGAACACTCTAC AGCTGAACTCAAACCTGGTGATTC	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 9	STK9-9F STK9-9R	CACTTGTTCTGATGATTTGTC GTTTAGCATTCCATTGTGCAATG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 10	STK9-10F STK9-10R	CACAAGCACGTGCACACACATG AGGCTATGGTCACATGTAGACAC	64°C 60°C	1.5 mM	Programa TD64 Netzyme
Exón 11	STK9-11F STK9-11R	GATAAGTGCAGGATACAAAACCTG GTGGTTCTGAATCATGCAATAAG	62°C 56°C	1.5 mM	Programa TD62 Netzyme
Exón 12	STK9-12F1 STK9-12R1	GTTACAGAGTGAGTTGGTCTAAG ACAGACTTGGAGTCACTCAGTG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
	STK9-12F2 STK9-12R2	CAAGTCAAACAGCAGATCTCAG AAAGCACAAACCTCCTGTAGTAG	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 13	STK9-13F STK9-13R	GCTGGTTATGGTCTAGTTCTAC GATTACATGTGTGAGCCACCTGG	64°C 60°C	1.5 mM	Programa TD64 Netzyme
Exón 14	STK9-14F STK9-14R	ATGATCCTACTACTGCACTACAG TTCAGAAGGATCACTCTAGTCTC	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 15	STK9-15F STK9-15R	GGTTCATGTCTGTAATCTCATCAC CAACACAGTGGAAAGCGTATCAG	64°C 60°C	1.5 mM	Programa TD60 Netzyme
	STK9-15F2 STK9-15R2	AAGTCCATCAGTGACTTAC CTAGCAGGAGAAAGGACAC	---	---	Usados sólo para secuenciación
Exón 16	STK9-16F STK9-16R	GCTATAGGAACCTAGTGTCTATGC AGGCTCTGTTGAGAGGATAGTTG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 17	STK9-17F STK9-17R	CTAGCATCACTTGCATTGTGAAC GAGGCTAAGTTTTCTCTAGCATG	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 18	STK9-18F STK9-18R	GAAGAACAGATATGGCTGGAC CAGCTGTTGAGAGTAGGAAGG	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 19	STK9-19F STK9-19R	CAAACCTCTGGTCAATGGGATGTG ACAGAGCAAGACTCTGTCTCAG	64°C 60°C	1.5 mM	Programa TD64 Netzyme
Exón 20	STK9-20F STK9-20R	AGACGTGGATGCTGTACTTACTC CATCTGCATTTCTACAGCTCCTC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 21	STK9-21F2 STK9-21R2	AATCTTGGCTCAACGGTGAAG GTCTCGAACTCCTGAGCTCAG	55°C 51°C	1.5 mM	Programa TD55 Hot Start Taq (QIAGEN)

Tabla M14: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *STK9 / CDKL5*.

Gen *MAP3K15* (NM_001001671). Las particularidades de algunos de los exones de este gen se describen en la sección de Resultados.

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 1	Pred3-1F2 Pred3-1R	TGAGGGTAGGTGAACTGGGAC GTATACGTGCGCAGTGAGAGC	55°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme + GC-rich Solution Elongación: 45''
Exón 2	Pred3-2F2 Pred3-2R2	GTACGACTGTAGCACAGATGCTC GCTATAGCTCCTCACTGGTGATC	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45''
Exón 3	Pred3-3F Pred3-3R	CTCTGTTTCATTTGAAGGTGTAC AGATCCATAGTCGTATTGAACG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 4	Pred3-4F Pred3-4R	CTTACCACATACTAGTATAC GTTAGCCTAAGTCAGGTCAATG	52°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 5	Pred3-5F Pred3-5R	GACTGGACCTTGCCATCTTC CTCCTACACTCAGCTGTTTCC	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 6	Pred3-6F Pred3-6R	GAGATGCACATCCTTAGCCTATG ACTCCTGACCTCAAATGATCTAC	60°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 7	Pred3-7F3 Pred3-7R	GATCACTTGAGGTCAAGAGTTG TACTAGAGAGCTGCATGTGGCTG	52°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45''
	Pred-7F2 Pred3-7R	CAAGATCACACCACTACACTCCAG TACTAGAGAGCTGCATGTGGCTG	52°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45'' <i>nested</i> PCR sobre el producto anterior 1/50 cortar banda
Exón 8	Pred3-8F Pred3-8R	CAGTTGTGTCTGTGCTAACTTTG TACCTGCTTATCCTCAGTATGAC	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 9	Pred3-9F Pred3-9R	GTGAGCTGATCTATCACTACTG CAGTCGTTTATGAAGCACTCATG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 10	Pred3-10F Pred3-10R	AGGCAGGAGAATCACTTGAAC GTGTTCCATATTTATGCGTTGAG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 11	Pred3-11F Pred3-11R	CCTACTGTCTCTCATCTGTGATG ATTACAGGCGTGAGCCACTGTG	64°C 60°C	1.5 mM	Programa TD60 Netzyme Elongación: 30''
Exón 12	Pred3-12F Pred3-12R	GGACAACATAATAGAGAGTCCAC GCAGAAATGATTGACCATAGAATG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 14	Pred3-14F Pred3-14R	AGTGCTGAGATTACAGGCGTG ATTGTCTTGACAGATTTAGAGTGG	62°C 58°C	1.5 mM	Programa TD58 Netzyme Elongación: 30''
Exón 15	Pred3-15F Pred3-15R	TGAGATTCTTCTCTGGAGACAC CCACTAAAGTACCACGTCAAATC	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 16	Pred3-16F3 Pred3-16R3	GTTTCGAGACCAACCTGACCAAC CTAGGTGTTTTCTGACAACCTTG	52°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación 45''
	Pred3-16F Pred3-16R	GATCATGCCACTGCACTCCAGC GCACTGTGACTTGCCTGACAGTC	52°C	2mM	Programa Standard Netzyme 35 ciclos Elongación 45'' <i>nested</i> PCR sobre el producto anterior 1/50
Exón 17	Pred3-17F Pred3-17R	CTCAAGTGATCTTCCATCTCG GAGGTGAGATGTGGTTCTAGAG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exones 18 y 19	Pred3-18/19F Pred3-18/19R	CAGCTTGTGCAGAAAGCGTAAC GTTGGTGAAGCACTTAGGTTAG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 20	Pred3-20F Pred3-20R	CTTTGCAGTCTCAGTGGATTGC GTCTTGTTACATTGTCCAGGCTG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 21	Pred3-21F Pred3-21R	ATCGAGGTGCATGTATTAGTTGG AGGAGCTTTGGACTGAGACATG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 22	Pred3-22F Pred3-22R	CCTGCAGAAGGGAAGTAAACC TCTGAGTAGAAATACAGCACCTG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 23	Pred3-23F Pred3-23R	CAGTGATCACCGTAACTATGCAG GACTGCATCGCAGTTACCTCTC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 24	Pred3-24F Pred3-24R	CTGAAGCTTGGGATTACAGGTG GTGTGTTCTGAACTCTCGCTC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 25	Pred3-25F Pred3-25R	GATGCTCTCAGAACTACAGAATC TGATTCTCCGTGCAATGCACTG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 26	Pred3-26F Pred3-26R	AGTTCGTGGATGATGAAGCTGC CGTGATCAACTTTACGCTGCAG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 27	Pred3-27F Pred3-27R	GTAGTCTAGAATCTACTGGAGTC TGATGCACAACAGATGCTTGAG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exones 28 y 29	Pred3-28/29F Pred3-28/29R	CAGCTCTTCTCTGTACATTCC TAGCGTGGTTCAGTGATACAGG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 30	Pred3-30F Pred3-30R	GTGTGATCATGGCTCACTGCAG CAGCTCTCTGCAGGTACGTAC	60°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Tabla M15: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *MAP3K15*.Gen *CIN85 / SH3KBP1* (NM_031892).

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 1	CIN85-1F CIN85-1R	TGGATCCCAGCGCCCCGATC TCCGCGGTTCTGGGACTGGC	64°C	1.5 mM	Programa Standard 40 ciclos FastStart Polimerasa (ROCHE) + GC-rich Solution
Exón 2	CIN85-2F CIN85-2R	GACCTCAGCCTTCTCCAACATC CCATAGACTTTGGTCAGCAGAG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 3	CIN85-3F CIN85-3R	CAGTTCACCAGAAGTTTCCAG TAAGATAGTCCAAGAGGCATTTC	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 4	CIN85-4F CIN85-4R	GGTAAGCAGTACTATGACAGC GCATGCCTAGGAAGCCTCTC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 5	CIN85-5F CIN85-5R	GGCATAGGATACAGAACAGAAGG GAAACCACCATGTCTAACCTGAC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 6	CIN85-6F CIN85-6R	TTGGAAGCCTCCAGCACCAAAC CTGGTTGTGAAGTTCTTCTTCAG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 7	CIN85-7F CIN85-7R	CTGATGCGTTTGCAAAAGCTATC GCTTAATGGAGACAATCATCTTG	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 8	CIN85-8F CIN85-8R	GCTTATACTGTCCAGTCAACACC TCATGCAGCAGTAATATGCTACC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 9	CIN85-9F CIN85-9R	CCAGTGCTCTTCAACATTACACC GTAACCATTGCCTCATTAAACACG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 10	CIN85-10F CIN85-10R	CTATGGCACTTGAACCAGGAATC ACAATGTCTGTGGTCTTCTGTG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 11	CIN85-11F CIN85-11R	TGTAACAGACAGCTTACAGCTCC CTTACTGACTTTGCTCTACCTG	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 12	CIN85-12F CIN85-12R	GATGTAAGAGGGAAGCTTGAG CATCTAAGTACTGTCACTTACAC	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 13	CIN85-13F CIN85-13R	CTTCTCATCATGCTGGTTGAAGG CACACTCCTTAACGTGTGCAGC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 14	CIN85-14F CIN85-14R	GCAGAAGAGTCCTTAGCTAGAG AAGAGAGGTGCTTATGACATATC	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 15	CIN85-15F CIN85-15R	ACACCTGCACTGTTTGTGTATC ACAAAATAGCAGTGTGCGAGTGC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 16	CIN85-16F CIN85-16R	ATCCATGCTTTCAGAACTAGGTG GGAGAGTTTGACTAACCAGGAC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 17	CIN85-17F CIN85-17R	AGATCTGCAGAGAGGTGACAATC GATCTCTGATGAAGGAAGTCTGG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 18	CIN85-18F CIN85-18R	GGCACAAGATTATTTTGGCTGG GGGTTGATAATCTTTCAGCTTC	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Tabla M16: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *CIN85 / SH3KBP1*.Gen *CXorf23* (NM_198279).

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 1	Pred1-1F Pred1-1R	TTTCAAGGTGGTTTATCTTCAACC GTAACAGGAGAGCTCAGTATATG	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 2	Pred1-2F Pred1-2R	CCACTTGATGGACTCTAAACACAC CATTCTGCATTTAAAGCCATGCTG	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 3	Pred1-3F Pred1-3R	GTTTACCTGTATCTCGTGAATAG CATCTTTCTAGTTTTGTAGCTATC	54°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 4	Pred1-4F Pred1-4R	GAAATGCAATCCTACAGTCTAC GTGAAATCAGCTTAACATTGAG	55°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 5	Pred1-5F Pred1-5R	CCTTCTTCATGTACTTTAACTCC CTGTTCTGTAATAGTAGAATCAGG	57°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 6	Pred1-6F Pred1-6R	CATATAAGATGGATTGAAGGAGC CGTTCTTGTTAGATATGGTCTTTG	57°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 7	Pred1-7F Pred1-7R	TCTGTCATAATAACTTTAAGCATC GCTACTTTAATTGTTTCTGAAGG	55°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 8	Pred1-8F Pred1-8R	GCTACCATTTGAAAGCATATTAC GCTTTGTGTTCTTAATCCTGTAC	54°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 9	Pred1-9F Pred1-9R	TCAACTATCATGCAACAAGAAC AAGTAGACTTGGAAGGTGTAG	54°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 10	Pred1-10F Pred1-10R	ACACTATACAATTCAGACACTTG AACTAGCTCAGATGTTTGACAC	55°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme

Tabla M17: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *CXorf23*.Gen *FLJ14503* (NM_152780).

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 1	SIH-1F SIH-1R	AGGGCGTTTATCTCAGCTCTGC GTGCGCTTATCGCACGTGCAC	64°C 60°C	1.5 mM	Programa TD64 Hot start Taq (QIAGEN) + Q-Solution
Exón 2	SIH-2F SIH-2R	TCATGTTTCATCTAGCAACTGTCC CAGTTGCCTATAGTACTTAGCAG	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 3	SIH-3F SIH-3R	CATGTTGCTGAAAGAAGGCATGG ATCACTGCATGCTAGGATCCTAC	60°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 4	SIH-4F SIH-4R	ATCACATCTGAAAGTGGTGCCTC GTGACTCACACTGTGCACTGAG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 5	SIH-5F SIH-5R	GACTAGGACAATGACGGTATCTG GATGAGGACAGGAAGGACACTTC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 6	SIH-6F SIH-6R	GTCAAGCACAGAAGTAATCACAC AAGATCCATCCTGTGTACAATAG	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 7	SIH-7F SIH-7R	CAGAAGATACACAGAGAGTCAAG GTCATGTGAAGCGTTATAGCTTC	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 8	SIH-8F SIH-8R	AAAGAACTCAGGAGCAACGTGC GTCTTAGGAACAGAGAGCTCTG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 9	SIH-9F SIH-9R	CATTCTAGGTTCCCATACTTCTG GTCTTCCACTGTAAATGCGTCC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 10	SIH-10F SIH-10R	CATTACCAACTTCACTGCAACTG CTGTCAGCACACAGTTCTCTGG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 11	SIH-11F SIH-11R	CTATCCAATCACTGCAGAAGAG GATGAGATGAAGGAACATGTGC	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 12	SIH-12F SIH-12R	CAAGACCTACAATTTCACTGAGTG GACATTGCATGTAAACCAAGCTAC	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 13	SIH-13F SIH-13R	CCTACACCAAGTCTTACGAGCT GTCCAGGCTCAAATATCATCG	54°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 14	SIH-14F SIH-14R	CCTGTAATGTCAATCAAACCTGC AGCAGTATCAGTGAAGCAGAGC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 15	SIH-15F SIH-15R	AAGAGGCTGAGTGATATACATCC TGTGCCATGTTGTCTGTCTGTC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 16	SIH-altF SIH-altR	AGTGCTTGACGCAGACATGGTG GTTCTTGACTTTGCTGTATTGTGC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Tabla M18: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *FLJ14503*.

Oligonucleótidos para la amplificación y secuenciación de la pauta de lectura completa del gen *FLJ14503* a partir de cDNA y de las construcciones descritas en el punto 3.

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
20 - 2218	SIH-EGFP-F	GAGCTC CGATGGAGCGCGGCGGCGGC G	60°C	1.5 mM	Pwo SuperYield DNA Polimerasa Elongación: 2'
	SIH-EGFP-R	CCGCGG GTCAACAGAAGGTGTTGAGAG GAGT			Para la clonación en pEGFP-C1
	SIH-EGFP-R2	CCGCGG GACAACAGAAGGTGTTGAGAG GAGT			Para la clonación en pEGFP-N3
891 - 1235	cSIH-2F cSIH-2R	CTGTGATATCCAAGACAGCTAC CAGCCAAGATCTTCGACG	55°C	2 Mm	Programa Col-PCR Netzyme
1571 - 1832	cSIH-4F cSIH-3R	GTAGCTGAACAGATGCGTCTCG CAGCGTGATCCACACCATTAAC	55°C	2 mM	Programa Col-PCR Netzyme
---	cSIH-1F cSIH-1R cSIH-3F cSIH-4R cSIH-5F	GGAGGACATGATGCATGTGAC TTCGTAAGTGCAGCCTGGCTC GCTGCGAAGATCTTGGCTG CAGATGTAGACGTAGATGTAGC GAGCACTCAAGATCTCTTAG	---	---	Usados sólo para secuenciación

Tabla M19: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de la pauta de lectura de *FLJ14503*.

Oligonucleótidos para la modificación de la pauta de lectura de *FLJ14503* mediante *Megaprime Mutagenesis*.

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
---	SIH-MEGA-F SIH-MEGA-R	GTGTGGAAAAGAATACAAAAGTGG CCAGTTTTGTATTCTTTCCACAC	---	---	Para introducir el cambio G1734T en FLJ14503

Tabla M20: oligonucleótidos empleados en la mutagénesis de *FLJ14503*.

Gen *EIF1A* (NM_001412).

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 1	EIF1A-1F EIF1A-1R	CTGGGTGACCTGCAATCTACG CTCGGCTCTAACAATAGGAGTC	52°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 2	EIF1A-2F EIF1A-2R	AATCGTGCCACCACACTTCACC GTGTTAATGTTGGGATTGGAGATTG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 3	EIF1A-3F EIF1A-3R	CCAAAAATGAAGTCCATGGACAG CATAGAGTCTTAGTTCTAGCTCTG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 4	EIF1A-4Fa EIF1A-4Ra	CACTTAACTCATTGCTGTATC CTAAACTAATTGATTGTTACTCTG	52°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 5	EIF1A-5F EIF1A-5R	CACCTAACCAGCAACACATAACC CAGGCATGTACATAAGCTTCCTC	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 6	EIF1A-6F EIF1A-6R	GGAAAGTTGGTTTCTCCATGG ACTTAGCAGTGACACTGCAG	60°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 7	EIF1A-7F EIF1A-7R	ATGGTCTTCTACCCATAAGCTCC GTTTCTCACATAGCCTAAGGAGG	66°C 62°C	2 mM	Programa TD66 Netzyme

Tabla M21: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *EIF1A*.

Gen *RPS6KA3 (RSK2)* (NM_004586). Los cebadores, excepto rsk15FN y rsk15RN se han tomado de Jacquot *et al.*, 1998.

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 1	rsk1F rsk1R	GGCTCGGGCGGCGACGGAGC GCCGCCCTGCTGCACTCAC	63°C	1.5 mM	Programa RSKex1 Pfu Polymerase 10% DMSO
Exón 2	rsk2F rsk2R	TGATGTGAGGTCTGTTTTGGT TTCATTTATCTATACCCTTTGTG	54°C	1.5 mM	Programa RSK Netzyme
Exón 3	rsk3F rsk3R	TTTGATTTTTAGCGGGAG AAGACTGGTAGCATTTCATAA	51°C	1.5 mM	Programa RSK Netzyme
Exón 4	rsk4F rsk4R	GCAGGGTCTTATTTTAAACA GACCTTTCAGTTTGTTAGAC	50°C	1.5 mM	Programa RSK Netzyme
Exón 5	rsk5F rsk5R	AGTGGATATTACAATGTAGCA GGGAGACGGCTCATACTTA	49°C	1.5 mM	Programa RSK Netzyme
Exón 6	rsk6F rsk6R	TATGAATGACCTAATGTAAACC CAGGATGCATGTAAATAGACT	50°C	1.5 mM	Programa RSK Netzyme
Exón 7	rsk7F rsk7R	ACAGACACAAAAGAAAATAAAT ATCATATTACATTGTATTCAACT	55°C	1.5 mM	Programa RSK Netzyme
Exón 8	rsk8F rsk8R	GGATGTCATTTCACTCTTA GCCCTAATACAAGTTTTT	46°C	1.5 mM	Programa RSK Netzyme
Exón 9	rsk9F rsk9R	GATTAATGTCAGAACTCAAAG ACAATCTCCTTCCCCTC	54°C	1.5 mM	Programa RSK Netzyme
Exón 10	rsk10F rsk10R	ACACTTCTGATTATTTTGCCT CATCAAAACATCTATATTAAGGG	47°C	1.5 mM	Programa RSK Netzyme
Exón 11	rsk11F rsk11R	CCACCACAAAACAAATATCTACT AAAATAAAAATACAGATGCCTCC	54°C	1.5 mM	Programa RSK Netzyme
Exón 12	rsk12F rsk12R	TTTCAAGCAAGTTTTTCACTTCT GAAATAAAATTATCAGTGAATCC	46°C	1.5 mM	Programa RSK -0.1°C/ciclo Netzyme
Exón 13	rsk13F rsk13R	GTATAGAATGAAAACCTGCTTG TATTTGTTGTCTTATATTTGGAT	51°C	1.5 mM	Programa RSK Netzyme
Exón 14	rsk14F rsk14R	CTTCTTTGTCCTTCTTACTC TATCTTACAACATTCCAAATC	52°C	1.5 mM	Programa RSK Netzyme
Exón 15	rsk15FN rsk15RN	AGGCATTATGGGACTCTTCA ACATGCATGAACAAGAAGCTG	61°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 16	rsk16F rsk16R	TGTATAGTTGATGAGGTTT AGACAACTGATTCAAATGA	40°C	1.5 mM	Programa RSK -0.1°C/ciclo QIAGEN Taq
Exón 17	rsk17F rsk17R	GTATATGATGATGGAAAGTAT GTGTGTATGAAGATATAGAGTGG	55°C	1.5 mM	Programa RSK Netzyme
Exón 18	rsk18F rsk18R	AGGTCAGCACTCATCATC TAAACATACTAATACTGCAA	52°C	1.5 mM	Programa RSK Netzyme
Exón 19	rsk19F rsk19R	CAACTCATAGCCTTACAAATA AAATGCTTAGGTGCTTAGAAC	47°C	1.5 mM	Programa RSK Netzyme
Exón 20	rsk20F rsk20R	TTGATAGGAAGTGACT GAGTACTTTTGAGATTACC	45°C	1.5 mM	Programa RSK Netzyme
Exón 21	rsk21F rsk21R	AAGAGCCATAGAAAAAGAAGC TGGAGGACCTGTGAAAAAC	60°C	1.5 mM	Programa RSK Netzyme
Exón 22	rsk22F rsk22R	TGTGTACGTGTGACTATCCATT GTGTGCTTGCAGGTGTCTCTC	60°C	1.5 mM	Programa RSK Netzyme

Tabla M22: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *RPS6KA3*.

Oligonucleótidos para secuenciar la inserción LINE en el gen *RPS6KA3* en el paciente EX441.

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
---	insF1 insF2 insF3 insF4 insF5	CAGGTAGTGTGATGCCTCCAGC GACTTTGCTGAAGTTGCTTATCAG TTGCATCAATGTTTCATCAAGG GAAGGATATGAACAGACACTTCTC GCATATTCTCACTCATAGGTG	---	---	Usados sólo para secuenciación

Tabla M23: oligonucleótidos empleados en la secuenciación de la inserción LINE en EX441.

Oligonucleótidos para la amplificación sobre cDNA del gen *RPS6KA3*. Secuencia de referencia: NM_004586.

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
105 - 375	rsk2ex2D rsk2ex5R	GGAGGAGATTAACCCACAAAC AACCTCTACCAAGATATCACG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Tabla M24: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de un fragmento de la pauta de lectura de *RPS6KA3*.

Gen *BCOR* (NM_017745). Los cebadores fueron cedidos por la Dra. Juliane Ramser, del Departamento de Genética Médica de la Ludwig-Maximilians-Universität de Munich.

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 1	BCOR-1F BCOR-1R	ACCTAGAAAAGAGGCCTTCTC ACTAGGCGGGAAGCTCTTTC	55°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones	
Exón2	BCOR-2F	GAAAGATGGATTTCAGTGAGG	68°C	2 mM	Programa TD64 Netzyme Clonado en pCR2.1	
	BCOR-2R	CAACTCATGGAAGAGCTG	64°C			
Exón 3	BCOR-3/1F	CAAGTCCAAAGGGACCAATGT	55°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)	
	BCOR-3/1R	ACCTAGAGTGCTTGTGGCAG				
	BCOR-3/2F	CGTCTATTCTAGCTTGTGTGG	55°C			
	BCOR-3/2R	AGGCCTTGACATGTTCAGTG				
	BCOR-3/3F	CAATCCTTACATGGAGGGTGC	60°C			
	BCOR-3/3R	GTTCTGGATGTGAGGATAGG				
	BCOR-3/4F	ATTGCGCAGACAAAAGCCTC	55°C			
	BCOR-3/4R	TGTCTTGAACCGCTGTCTTC				
	BCOR-3/5F	CTCTCCAATGGCAAGTATCC	55°C			
	BCOR-3/5R	ACAACCATTTCTGGAGGAG				
BCOR-3/6F	AAGTGGCTTAGTGCTCTCCG	56°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)		
BCOR-3/6R	TGCTGAATAACGGATGGTGTG					
BCOR-3/7F	AACGTTTCAGGGTCAGTGTG	58°C				
BCOR-3/7R	CAGGTCCTTTGCCATGTAAG					
BCOR-3/8F	AGTTACCTCCCTTACCCAGC	55°C				
BCOR-3/8R	GGTTCGGCTTTAGGTTCTTG					
BCOR-3/9F	GGAAACTAGCAGCACCAAGT	58°C				
BCOR-3/9R	GCAACCCTAGGTTCTCTTTG					
BCOR-3/10F	TCAAACAGCCAGTCTTCACC	55°C			2 mM	Programa Standard Netzyme ¹
BCOR-3/10R	TACCACAAGCTTCATTCACC					
Exón 4	BCOR-4F	GGATGAAGTTATCTAAATGATCC	55°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)	
	BCOR-4R	GAATAAAGACGACCATGGCC				
Exón 5	BCOR-5F	CATCTCATAAGCTGTGGTTGG	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)	
	BCOR-5R	TTTCTCCAAGCAGATGCCAAC				
Exón 6	BCOR-6F	GAAGCAGCTGTCAATAGCAG	56°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)	
	BCOR-6R	ATCCACATCTCCTGTCCATC				
Exón 7	BCOR-7F	TTAGATGACTGGCCTGAGAGG	56°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)	
	BCOR-7R	TACAGAGAGTGGATGACCCAC				
Exón 8	BCOR-8/1F	GCTCCAGTGATCAGTGTTAAC	54°C	1.5 Mm	Programa Standard Taq (QIAGEN)	
	BCOR-8/1R	TGGCAATCCTCTTCTTCGTC				
	BCOR-8/2F	AGTCTTTCATCCACAGTGC	56°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)	
	BCOR-8/2R	CAGAAGACATGCTCCTCTAG				
Exón 9	BCOR-9F	TTAGAAGGACACGGGCTTAAC	55°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)	
	BCOR-9R	TCTGCTCTCCATGTCCCTC				
Exón 10	BCOR-10F	TACAGAGAGGTCCACCTTAC	53°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)	
	BCOR-10R	AGTGTGCTTACAG				
Exón 11	BCOR-11F	TACCCAAGGTGCACATGTG	54°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)	
	BCOR-11R	TTCAAACACTCGGCTGCTC				
Exón 12	BCOR-12F	GACAGGAAATGACCTTCCAG	55°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)	
	BCOR-12R	CTCACCCATACCAGACAGAA				
Exón 13	BCOR-13F	TTCTGTCTGGTATGGGTGAG	53°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)	
	BCOR-13R	GAGGTTCTGTGGACAGTTAAG				

¹ Esta PCR se repitió después con el programa TD64, 2mM Mg²⁺ y Netzyme, y los productos fueron clonados en pCR2.1.

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 14	BCOR-14F BCOR-14R	AGAATGAAAGGACATAGAGGC ACACATATGCACAAGGATTAAC	55°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)

Tabla M25: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *BCOR*.

Oligonucleótidos para amplificación del gen *BCOR* sobre cDNA. Los cebadores fueron cedidos por la Dra. Juliane Ramser. Secuencia de referencia NM_017745 (transcrito largo).

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
208 - 744	cBCOR-1F cBCOR-1R	TCAGACTAGACGCTTGAAGC CTTCTGCTGTGGCTACAGC	57°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)
640 - 1172	cBCOR-2F cBCOR-2R	AGACAGTGGAGGCTTCTG GATGTGAGGATAGGCGTGG	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)
1085 - 1680	cBCOR-3F cBCOR-3R	TCTCGTCCATTGCGCAGAC GCACTAAGCCACTTCCAGCC	57°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)
1538 - 2268	cBCOR-4F cBCOR-4R	GCAGACCGTTACCAAGACG AGGAGAGGGGACTTACAGC	57°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)
2173 - 2851	cBCOR-5F cBCOR-5R	CTCCAAATGAGGCATTCAGG TCGTGGAAGTCACTGATGCC	57°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)
2732 - 3444	cBCOR-6F cBCOR-6R	AGCAGAGAGTGTGGCCAG CCGACTTTGGCTTTTTGTCC	58°C	1.5 mM	Programa Standard Hot Start Taq (QIAGEN) Clonado en pCR2.1
2651 - 3210	cBCOR-6/1F cBCOR-6/1R	CGACAAGCTTGTCTACGTAG CTGCATACAGTTCGGTAGTG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
3373 - 4002	cBCOR-7F cBCOR-7R	CCGAGATGTGCAAATTCAG GCAAGCCTTGTTTCATTGTCAC	57°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)
3934 - 4590	cBCOR-8F cBCOR-8R	CAGAGGCCAAAGGCAACAG ACAGGACCACTTCTCATAG	57°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)
4522 - 5156	cBCOR-9F cBCOR-9R	TCAATAAGAACGCTGGCGAG GACATCCGAAAGCAGTAGC	57°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN)

Tabla M26: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de la pauta de lectura de *BCOR* sobre cDNA.

Oligonucleótidos para completar la amplificación del gen *BCOR* sobre cDNA. Secuencia de referencia NM_017745. Los cebadores Bcor-1DF y Bcor-1EF están diseñados sobre exones 1 alternativos tomados de la base de datos Aceview. El 1DF corresponde al exón 1 del transcrito D, y el 1EF al exón 1 del transcrito E.

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
57 - 307	Bcor-1AF Bcor-1R-2	GCTCGTTAACGTCGCCAACC CTCTCGCTGTTTCATCCAGCTGTG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Incluido en 1ER+1R2 No se secuenció

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
/ - 307	Bcor-1DF Bcor-1R-2	CACACTAGACAAGGCTGCATGTG CTCTCGCTGTTTCATCCAGCTGTG	52°C	1.5 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme + Q-Solution Elongación: 45" Cortar banda
/ - 307	Bcor-1EF Bcor-1R-2	GGACCGCAAACCTTTGCTGCTC CTCTCGCTGTTTCATCCAGCTGTG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
243 - 535	Bcor-1F-2 Bcor-1R-3	GAAGACGACATGCTCTCAGCAAC CCACACAAGCTAGAATAGACGATG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
434 - 744	Bcor-1F-3 cBCOR-1R	CCATAGGATCGATGGCCTG CTTCTGCTGTGGCTACAGC	55°C	1.5 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme + Q-Solution Elongación: 30"
3116 - 3314	Bcor-6F-2 Bcor-6R-3	GAAACCGAAGCCATCTAAGCTGG CATCATTGCACGCTCACAGTAAGC	58°C	1.5 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
3241 - 3483	Bcor-6F-3 Bcor-6R-2	CATTGCAGATGGAAGGATTACAAG CACTTTCGTTCTGTTCTGCAATGG	58°C	1.5 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
3373 - xxx ²	cBCOR-7F Bcor-7R-2	CCGAGATGTGCAAATTCAG CTGTTAATTCATGCACACCTTCAG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
5093 - 5482	BcoR-11F BcoR-11R	GTGTTATAACATCCAAGTATCTG GTATTATGACACATATGCACAAG	50°C	1.5 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme Elongación: 45"

Tabla M27: oligonucleótidos empleados para completar la amplificación y secuenciación de la pauta de lectura de *BCOR* sobre cDNA.

Gen *ATP6AP2* (NM_005765). Los cebadores fueron cedidos por la Dra. Juliane Ramser.

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 1	ATPase-1F ATPase-1R	CTATCAGGCTGTCGCTTCC TCCCAGGCACGTCCTG	66°C 62°C	1.5 mM	Programa TD62 Fast Start Polymerase + GC-rich Solution
Exón 2	ATPase-2F ATPase-2R	GCTAAGTCAGTGGTGAATGG TACCTACGTTTCGTTTGTATGC	58°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
Exón 3	ATPase-3F ATPase-3R	TCAGTGTCATCTCAGAACCC GACAGCTGACAAGGGAAAATG	58°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
Exón 4	ATPase-4F ATPase-4R	TTTCTTCCCACTTTGGTTCAC GTTCCAATACCCAGAGGTATG	57°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 5	ATPase-5F ATPase-5R	CATACCTCTGGGTATTGGAAC TTCAAGTAGTATAAGGAATGGG	52°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 6	ATPase-6F ATPase-6R	GCAAATAAAGATCTCTGGTG CATGGGATCATAAATCTAGGG	58°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme

² El cebador Bcor-7R-2 está diseñado para amplificar un transcrito alternativo. Se localiza en un intrón, abarcando las bases -1 a -25 de la posición 3754 de NM_017745.

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 7	ATPase-7F ATPase-7R	AACTGGCTGTGTTTGACGTC TTAGAGGAGCCCCAAAGAAG	58°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
Exón 8	ATPase-8F ATPase-8R	GTGGACTTAAGCCATTCCAC GACTGCTCATTATGTCACC	58°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
Exón 9	ATPase-9-1F ATPase-9-1R	CATCAGTGCAAGTGTCGTC ATTCTGGCACAGGTAACATTC	57°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
	ATPase-9-2F ATPase-9-2R	ATGGATCCTGGATATGATAGC ATACCACAGTGGGATTCACG	57°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Tabla M28: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *ATP6AP2*.

Oligonucleótidos para la amplificación del gen *ATP6AP2* sobre cDNA. Secuencia de referencia NM_005765.

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
706 - 1145	cATPasa-F1 cATPasa-R1	CATCTAGCCAAGGATCATTCTC CGAATCTTCTGGTTTGTCTATCC	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Tabla M29: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de un fragmento de la pauta de lectura de *ATP6AP2* sobre cDNA.

Gen *MGC39350 / CXorf38* (NM_144970). Los cebadores fueron cedidos por la Dra. Juliane Ramser.

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 1	Exon1-F Exon1-R	TCGGTACTTCCCAGGCTC TGGGTCTGGGACAGGAACG	62°C	1.5 mM	Programa Standard Fast Start Polymerase + GC-rich Solution
Exón 2	Exon2-F Exon2-R	CAAGTGTCTCTGTTCCCTCC GACCACAAGACCAGATAGCC	64°C 60°C	1.5 mM	Programa TD60 Fast Start Polymerase + GC-rich Solution
Exón 3	Exon3-F Exon3-R	ACCATTGCCTTTCCATCTCC CATCACAGGTGTAGCTCATG	58°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 4	Exon4-F Exon4-R	CAGTCCTTCTCATCTGAAGAC CTCTCTCTTCTTCTGTATGCC	56°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
Exón 5	Exon5-F Exon5-R	CAGTGGAAATGCCTTCTTCATG GTTAAGATGAGCTACTCTTCC	56°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
Exón 6	Exon6-F Exon6-R	TGAGTAGGAGCCAGTCTAG GACATGAAAGAGATGAGGTG	58°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme

Tabla M30: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *MGC39350 / CXorf38*.

Oligonucleótidos para la amplificación del gen *MGC39350* (*CXorf38*) sobre cDNA. Secuencia de referencia NM_144970.

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
6 - 905	cPredict6-F1 cPredict-R1	ATGGTGCTGTCGGAGCTAGC ACAGAGGCTGTCTAGCTTCTG	52°C 48°C	2 mM	Programa TD48 Fast Start Polymerase
276 - 896	cpred6-F2 cpred6-R2	CATGTCAACAGAAATGGAGATGTG GTCTAGCTTCTGCATATCTTCTG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Tabla M31: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de un fragmento de la pauta de lectura de *MGC39350* / *CXorf38* sobre cDNA.

Gen *EXLM1* / *CRSP2* (NM_004229). Los cebadores fueron cedidos por la Dra. Juliane Ramser.

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 2	EXLM1-2f EXLM1-2r	GCCTGTAGTAGCTGTTTACC CCACACACCAACTCATAG	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45"
Exón 3	EXLM1-3f EXLM1-3r	GTGGTTGTAAGCAAAGGCTG ACTCAAATCAGCAGGGATAAG	60°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45"
Exón 4	EXLM1-4f EXLM1-4r	AAACTGATACTAATTCCCCTTG ATCCAATCCAATCCAGTGCC	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45"
Exón 5	EXLM1-5f EXLM1-5r	TAGGTAAAGTACGCAACTG CTCAAACCTCTGACCTCAAG	60°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45"
Exón 6	EXLM1-6f EXLM1-6r	CTAGGTCAGGAGGAAGATTC TGGGATTACAAGCATGAGCC	60°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45" cortar banda
Exón 7	EXLM1-7f EXLM1-7r	CCTTAGTTGGTATAGTGACAC AGGCTGCTACAGTTCAAGAC	60°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45"
Exón 8	EXLM1-8f EXLM1-8r	AATGAAGTTCTCTGGACTTG TGTTGTCCAAGGGTCAACTG	60°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45"
Exón 9	EXLM1-9f EXLM1-9r	ATTCCAGGCTGTGGCTAAAC AAATTTGTGCTAAGAGTTAAGG	56°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45"
Exón 10	EXLM1-10f EXLM1-10r	AACACTTAATCAGTGTGATTCC AGCATAAGTTTGGCAGATCAC	56°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45"
Exón 11	EXLM1-11f EXLM1-11r	TGAGACAGGCATGTTTGTTC GGAAGTACATCAGTCAGAG	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45"
Exón 12	EXLM1-12f EXLM1-12r	GTTGGCTTATATCTAATGGTAC ACCAAACGGCACTTAAGTTTC	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45"
Exón 13	EXLM1-13f EXLM1-13r	TTGTAAATCGATAGGGCACAG GGGTTTCACTATACCAAAGTC	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45"

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 14	EXLM1-14f EXLM1-14r	TTACTTGATGATGTACGGAGG TAAGCCTTATTGCTGCCTCG	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45''
Exón 15	EXLM1-15f EXLM1-15r	GTTTAGTTCAGTATTTACTCAG CAGGATCACAAACATTCTGC	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45''
Exón 16	EXLM1-16f EXLM1-16r	GAGTTCCACTGGACTTCATG GGTTCTGAACACTGCTTTATG	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45''
Exones 17 y 18	EXLM1-17&18f EXLM1-17&18r	CATACCTTGCTGTGTCATTGTG TTGGAACACTGTGCATGTTTC	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45''
Exón 19	EXLM1-19f EXLM1-19r	ACTTAACTAGAGACCTGTCTG CCCTAACTTTTACTTGAGCTC	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45''
Exón 20	EXLM1-20f EXLM1-20r	CACATCTGGAGTTGCAATCC TCCTGAGCACAAAGCAATCC	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45''
Exón 21	EXLM1-21f EXLM1-21r	AATGTGCCAGAAGGACGTTG CAGATGATGAGTTAACTGTC	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45''
Exón 22	EXLM1-22f EXLM1-22r	AGGATCAACATACTGTGTCTC TAAGTATTTCTGGGCATCTC	56°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45''
Exón 23	EXLM1-23f EXLM1-23r	GTTTCCTATTTGGTAACCAGC CTAGATGCACAGTGCTTCTC	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45''
Exón 24	EXLM1-24f EXLM1-24r	CAGTGCTTGGCATGAAGTTG AGTCCAAGGCAGAGACAAAC	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45''
Exón 25	EXLM1-25f EXLM1-25r	TAGAGATTGAGCATGACATG TCTCTCATCTGCATCCTTTG	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45''
Exón 26	EXLM1-26f EXLM1-26r	AGGAATGTCACGTTAGTTCAG GTTACACCACAAGGAGTAGC	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45''
Exones 27 y 28	EXLM1-27&28f EXLM127&281r	ATGCTCAATGCTGTAGGTGC TAAACTGCTCCCACCAAC	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45''
Exón 29	EXLM1-29f EXLM1-29r	TAACCTCTCAGACTTTCCTAC TGGCCTCTATTTGGACACC	56°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45''
Exón 30	EXLM1-30f EXLM1-30r	ATTGTGTAGCACAGTTGCATC AACCAGACCTTATTGCTATG	58°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45''
Exón 31	EXLM1-31f EXLM1-31r	CAAACCTAACTGGGACTTGC TTAAACTGAAGGCTGAATTGAG	56°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco) Elongación: 45''

Tabla M32: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *EXLM1* / *CRSP2*.

Oligonucleótidos para la amplificación y secuenciación del cDNA del gen *EXLM1/CRSP2*. Secuencia de referencia NM_004229.

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
74 - 509	cEXLM1-1F cEXLM1-1R2	AGGACCGCATCGTGTGCCGTTGC CACAAACAGGATGGCTTGCTGATC	52°C 48°C	1.5 mM	Programa TD48 Hot start Taq (QIAGEN) + Q-Solution
306 - 872	cEXLM1-2F2 cEXLM1-2R	TACTCGGAGCTTATGGTGTGAC TTCTAGCTTGAGAAGACGCCATG	56°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
583 - 872	cEXLM1-2F cEXLM1-2R	CATATGCCATTGATGTACTAACTAC TTCTAGCTTGAGAAGACGCCATG	59°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
750 - 1186	cEXLM1-4F2 cEXLM1-4R2	CAGTTAGCAAATCTTACAGTTGC TTGTGAACAGATGCTGTTCCAG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
1054 - 1479	cEXLM1-5F2 cEXLM1-5R2	CTCTAATGTTAATCCGAGAACG TGTGCAGACACTCTGAATTACC	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
1341 - 1859	cEXLM1-6F2 cEXLM1-6R2	AGAGCTCATCAGAAGCTCCAAG GTCTTCACGATCTGCAGCATTG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
1770 - 2250	cEXLM1-7F2 cEXLM1-7R2	GTTGTGGAGATGTTGGAGGTTG GGAAAGTGCAATCAAGAAGAGAG	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
2111 - 2665	cEXLM1-8F2 cEXLM1-8R2	GGAGATTCCACATCAAGGAGTGC TTGTGACAGTTACTGCAACCTGAG	60°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
2478 - 3042	cEXLM1-9F2 cEXLM1-9R2	CTACCAGACATACCTGCTCATC TTCGAGCATCCTGATTGCTGTC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
3007 - 3428	cEXLM1-10F2 cEXLM1-10R2	AGTCGAGGTGTTGTGGCAATAC ACTTGGTGACACCATAGTGTATG	60°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme Clonación en pCR2.1
3304 - 3870	cEXLM1-11F2 cEXLM1-11R2	CAGCGTCATTTGTTCCAACCTCC CTCTGCATTTCAAGTGCATCAGTC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
3748 - 4091	cEXLM1-12F2 cEXLM1-12R2	AGTCATCATGAGACGACATCTTC CAGCTCCAGCTTCATAATGTG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
3754 - 4351	cEXLM1-3F cEXLM1-3R	GATCAGTCATCATGAGACGACATC GCAGCAACAGAAGAGTTCTGCTG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
4031 - 4527	cEXLM1-13F2 cEXLM1-13R2	GCTATTAGGAGCTCCTACACAC GTTGTCTCATCTGTCAGCCTTC	60°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme

Tabla M33: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de la pauta de lectura de *EXLM1/CRSP2* sobre cDNA.

Gen *LAVA*. La secuencia de este gen se ha obtenido de la base de datos Aceview.

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 1	LAVA-1F LAVA-2R	CCTCAGAACAGGAAAGCCGTGC GGTGTAGACAGCTGAGAGAAC	64°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
	LAVA-3F LAVA-2R	TGGTGGTTCTCCAGCTGCACTG GGTGTAGACAGCTGAGAGAAC	63°C	2 mM	Programa Standard Netzyme 35 ciclos
Exón 2	LAVA-2F LAVA-SonR	GCAAAGGCTACTCTGCTAATGG CACCTGATTCACACTTCAGATCG	68°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Tabla M34: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *LAVA*.

Oligonucleótidos para la amplificación de un fragmento del gen *LAVA* para ser empleado como sonda en una hibridación tipo *Northern*.

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
430 - 794	LAVA-SonF LAVA-SonR	CCTCTCGACTTCACTATGAATGC CACCTGATTCACACTTCAGATCG	52°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Tabla M35: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación del fragmento empleado como sonda del gen *LAVA*.

Gen *MKRN4 / ZNF127* (NM_030757). Los cebadores, excepto ZNF127af2, fueron cedidos por la Dra. Juliane Ramser.

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
5 - 1555	ZNF127af ZNF127dr	CAGTACAGTGCCTTACTTGC ATGCCCTTGTTGCTCATTGCC	56°C 52°C	1.5 mM	Programa TD52 Hot start Taq (QIAGEN) + Q-Solution Elongación: 2'
1205 - 1842	ZNF127df ZNF127er	CACAGCATATACAAGCGTGC CTCATTTTCAGAGTCTGTGAC	56°C 52°C	1.5 mM	Programa TD52 Hot start Taq (QIAGEN) + Q-Solution
---	ZNF127af2	TTGGACCTCTGTGATTCCG			Usados sólo para secuenciación
---	ZNF127ar	AGTGACCTGTTTAGTCCAGC			
---	ZNF127bf	ACAACAGTCACAACATCGGG			
---	ZNF127br	GAACCTGCTACTACAGTTGC			
---	ZNF127cf	CTGGACTAAACAGGTCACTTG			
---	ZNF127cr	GCTGCACAGCAAATGAGAAC			
---	ZNF127ef	GTTCTCATTTGCTGTGCAGC			

Tabla M36: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *MKRN4 / ZNF127*.

Gen *DFFRX / USP9X* (NM_004652). Los cebadores fueron cedidos por la Dra. Juliane Ramser.

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 1	DFFRX-F1 DFFRX-R1	GGTTATGCAATGGTCTCTGC CCCCTGTAGCTTTAACTAG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45"
Exón 3	DFFRX-F3 DFFRX-R3	TAGCTCATTTGTAGTGCCTC CATCCGCTTTTGGGATAAAG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 4	DFFRX-F4 DFFRX-R4	GCTGTCGGTGAAGTTCCAG CAGCCACACACATATACC	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45"
Exón 5	DFFRX-F5 DFFRX-R5	TAGGATACGATTAATATTGGAAG CACTGAAGATTCTGTGTCAG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 6	DFFRX-F6 DFFRX-R6	ATGTTTTGTGGTCCTTTGAAAG CAAAAACCAGCAATTCTACGG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45"
Exón 7	DFFRX-F7 DFFRX-R7	GTGCACCGTAGAATTGCTGG ACTTCATTCAGTGCATTTCATC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45"

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 8	DFFRX-F8 DFFRX-R8	TAGGTAAGATACTTACCTCTT CAAAACACCTCCCAATTCAG	59°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 9	DFFRX-F9 DFFRX-R9	TTTCATTAAAGCAACATAAG ATACAAGCCTGCATCCATTC	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45"
Exón 10	DFFRX-F10 DFFRX-R10	TCAGCAAGCAGTATACTACTAC TTCCTTCACACCACAGACTG	59°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 11	DFFRX-F11 DFFRX-R11	TCTGTGCTTAGCTACGTTGC TATCCTGTAACAAAGCCAACC	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45"
Exón 12	DFFRX-F12 DFFRX-R12	TTGGAGTTCTGGTAGTAAGTG ATAGCCTCTTCTCACTCCAC	64°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45"
Exón 13	DFFRX-F13 DFFRX-R13	GATAGTACGAACTCTTCTGG AGAGTTGGGAGTAATAGTGG	57°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 14	DFFRX-F14 DFFRX-R14	TTGGTTGAAGTCAAAGCAGTG GAAAAGGCCACCCAACAAAG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45"
Exón 15	DFFRX-F15 DFFRX-R15	GGTAATACAGATTGCCTTTCC ACTACACCAAATTCCTGAGAC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45"
Exón 16	DFFRX-F16 DFFRX-R16	AGTGTGTTTAAGATAACTGAGG CAAGACAACCTAACAAGGCAAG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45"
Exón 17	DFFRX-F17 DFFRX-R17	AATTAATCAGCCATTGCCATC TGCTCTCCTTTTACCAAATGG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45"
Exón 18	DFFRX-F18 DFFRX-R18	TCCCCAGCATTATTTTCTTGG CCGAAAGACTACATGCTATAC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45"
Exón 19	DFFRX-F19 DFFRX-R19	GTATAGCATGTAGTCTTTCGG TCAAAAACCTAGCATGATGC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45"
Exón 20	DFFRX-F20 DFFRX-R20	AAGTATAGGGATTAACACAGAG TCTATACCAAAAAGCACGGTC	57°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 21	DFFRX-F21 DFFRX-R21	AGTTAAATATGTATGAACACATG ATTCACCTTACCATATGAAAGG	50°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 22	DFFRX-F22 DFFRX-R22	CAAGAGTTTCTTGGCACTGAC ACATTGAGTCAACCTTGAACCT	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45"
Exón 23	DFFRX-F23 DFFRX-R23	AGAGCAATTGGTTAGGTCTGG ACTGATATTAAGGGGACATTATC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45"
Exón 24	DFFRX-F24 DFFRX-R24	ATTCCTATTTCCCTTACAAAGT ATTAAGAAACATTTGTTTACAAGG	53°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 25	DFFRX-F25 DFFRX-R25	AGCACTAACTAGAAGTTGTGTG TTGGGGACACATTTTGCCAG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 26	DFFRX-F26 DFFRX-R26	ACCTCTCCTCCCAAGAGGG AAGAATGAATCACATTGATAAGC	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 27	DFFRX-F27 DFFRX-R27	AGTGGATTTTGAGGATGGACG TCTTTGGAGTTTTCCATTTAACC	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 28	DFFRX-F28 DFFRX-R28	CTAGACATTTGATTTCTTCCC TGATATGTAGCTTACAACCAAG	55°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 29	DFFRX-F29 DFFRX-R29	TAGCATTGCTAATATGTAATCCC AATGGTCTTAACTGTTCAATCAC	53°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 30	DFFRX-F30 DFFRX-R30	TGAAAGGACAGAATGGCCGTG TACGTTTGATGAAAGTATAACACTC	55°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 31	DFFRX-F31 DFFRX-R31	TGCTTGCCATTTGTCTCAACG TGCCTCCAACATGTCTTTTAG	53°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 32	DFFRX-F32 DFFRX-R32	GTTCTGTGAATGTTACATGTTAC TGTTAGTATATACATGGTACAAC	53°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 33	DFFRX-F33 DFFRX-R33	AGGCAAATGTAGTTTACATTAAG TGACTACTTCTCTGCTACCAC	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 34	DFFRX-F34/1 DFFRX-R34/1	ATCATTTAAAAGTTTGCTTGGGG TACCAGCGATTTCTCTCACC	59°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco)
	DFFRX-F34/2 DFFRX-R34/2	TCATCCAAAGGAATGGTGGAG ACTTAAACATGTTGACGCCCTAC	59°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (Gibco)
Exón 35	DFFRX-F35 DFFRX-R35	GACTTGTTTGAAGAAATGGGGTTG CAAACCAAACATTAGTATAATAGG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 36	DFFRX-F36 DFFRX-R36	ATCCTTTTACTATAGAGAACAAG TGCTTGTGACTTCGACTTCCAGG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 37	DFFRX-F37 DFFRX-R37	AGTATACATATACCTTGTGCTG TTCATCACTTGACCTAAATGAC	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45"
Exón 38	DFFRX-F38 DFFRX-R38	ATTCATGAAGCCCTTGCCATC TAGTGTAAAGAATGGAGCATTG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exones 39 y 40	DFFRX-F39/40 DFFRX-R39/40	TAGGCTATTTTCTATCGTGAAAG TAACTCTAACACCTGGGCAAGCC	62°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45"
Exón 41	DFFRX-F41 DFFRX-R41	TAGGCACTCAGTATATATTAGC AAATGACAACCCCAAGTTCTC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 45"
Exón 42	DFFRX-F42 DFFRX-R42	TAGAAATCTTAATCAGAATTAAGG AAAGAATTACTTTGCTCTCTTCC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 43	DFFRX-F43 DFFRX-R43	AGTTGCTAATGGGTCAGTTTTG AACAAACAATTGAGCCATCCTC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 44	DFFRX-F44 DFFRX-R44	ACATTTCCAGAGACTTCAGACC TGGACTGTAAGGCCTGGGTG	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Tabla M37: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *DFFRX/USP9X*.

Oligonucleótidos para la amplificación y secuenciación del cDNA del gen *DFFRX/USP9X*. Secuencia de referencia NM_004652. Existe la variante NM_021906 que tiene una delección en pauta de 48 nucleótidos en el exón 42.

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
8 - 840	DFFRX-1FN DFFRX-4R	CAAGACAACACTACATAAGCAGAC GAGTGAGAAACTCATAGCATTGC	50°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
664 - 1530	DDFRX-4F DDFRX-5R	CTCGTTCTCCAGATCCTCGATC CATCTTCTGCAAGACGACGTATC	55°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
1320 - 2333	DDFRX-5F DDFRX-6R	CTCCTGAACAACCTTGATCATCC GTCATCCATCATATAGGCTCTC	50°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
2208 - 2986	DDFRX-6F DDFRX-1R	GTGCTTCAGCTTGATCCTTCTC GAGGAATCAGAAGAGCTATCAG	50°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
2781 - 4972	DDFRX-2F DDFRX-9R	GTACGACGATGTATTCTCAATCG CTTAGGACACCAATGTTGTAICTC	50°C 46°C	2 mM	Programa TD50L Netzyme
---	DDFRX-7F DDFRX-7R DDFRX-8F DDFRX-8R	GTGTAGAAGGTGTGAATCCCATG CTCGGATGATGGATTAGGAATG CAGCAAGAGAGAGAGCTAAACAC CTCCTTTGTCCTCCAAGGTGG			Usados sólo para secuenciar
4808 - 5592	DDFRX-9F DDFRX-2R	CACAGGTAGTGATGTAGATGATG GCTCACTCTGTTGTATCAACTG	50°C 46°C	2 mM	Programa TD50L Netzyme
5189 - 6482	DDFRX-3F DDFRX-10R	CTTTGCTGATCAGAAGATCTGC GTCATAAGCCTGACTAGAAGGTC	50°C 46°C	2 mM	Programa TD50L Netzyme
6329 - 7251	DDFRX-10F DDFRX-11R	CAAATCGCTTCTCCGAATACCTTC GGATTTGGTAAGCAACAGGACAG	53°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
7135 - 7874	DDFRX-11F DDFRX-3RN	GAGATGGGCTGTTTGACACAATC CTCTCCACTCCATGTTGATTAGG	50°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
5598 - 5824	DDFRX-12F DDFRX-12R	GAAAGTGAGACAGCAGGAAGCAC ACTTCTCCCATGTACTCTCCACC	64°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Tabla M38: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de la pauta de lectura de *DDFRX/USP9X* sobre cDNA.

Gen *DDX3X* (NM001356). Los cebadores fueron cedidos por la Dra. Juliane Ramser.

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 1	DDX3-Ex1F DDX3-Ex1R	GCTTTCCAGCGGGTATATTAG GCCATTAGCCAGGTTAGGTC	57°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
Exón 2	DDX3-Ex2F DDX3-Ex2R	AATGCTAGAGGGCAGGACTAG TTTTACATAAGCCCAATGAAATC	62°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
Exón 3	DDX3-Ex3F DDX3-Ex3R	ATCAGATTGGAAGGCTGGAG CCCAAATGCCTGGTTTTCTC	60°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
Exón 4	DDX3-Ex4F DDX3-Ex4R	GATAGTCAGTGGAGGCTTTC AGGTGGTCAGGATAACGACT	58°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
Exones 5 y 6	DDX3-Ex5+6F DDX3-Ex5+6R	TAGGGATAAGAATCTGATAATGG TGAAAACATTTAACCTCTCTGTG	58°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
Exón 7	DDX3-Ex7F DDX3-Ex7R	ACCAATCAGCTGTTGGTTGG CAGCTGCAAACTGCATGAC	58°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 8	DDX3-Ex8F DDX3-Ex8R	CACTGTCATCTACCAATGTCTG ACCTACAAAGTTCTACAATTTCCC	58°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
Exones 9 y 10	DDX3-Ex9+10F DDX3-Ex9+10R	TGTGATGAACTTTTCAAACAGGG CAACAAGAGCGCAACTCTGC	57°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
Exones 11 y 12	DDX3-Ex11+12F DDX3-Ex11+12R	TCCTCAAATTCTAAACTCAGGC ACAAAGAGAAACCCCATGTC	57°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
Exón 13	DDX3-Ex13F DDX3-Ex13R	TGTGCATACATAAGTGCAAAGAG ACTTTTATGAGATATGGCCAC	58°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
Exón 14	DDX3-Ex14F DDX3-Ex14R	TTTAGTGGCTACAGCAGTATGT CTTTCCTGCACACATCACAGC	57°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
Exón 15	DDX3-Ex15F DDX3-Ex15R	AGGAAAGTAAGAATAGTAGCAAG TGTAAGTGAACACCCATTCCC	57°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
Exón 16	DDX3-Ex16F DDX3-Ex16R	ATATGGCTGGATGGGGAATTG CCTCCATATCCATCACTGTTG	57°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
Exón 17	DDX3-Ex17F DDX3-Ex17R	CAAATTACGTAAGGGAAGGATTGT CACCTTCTGAACAGGGCTGC	58°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme

Tabla M39: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *DDX3X*.

Oligonucleótidos para la amplificación y secuenciación del cDNA del gen *DDX3X*. Secuencia de referencia NM_001356. La variante NM_024005 sólo se diferencia en parte de la región 3' no traducida.

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
608 - 1300	DBX-1F DBX-1R	GAAATCCCTTGAGCTTAGACCTG CTGTTCCAAGCGTTCACTTGGTG	57°C 53°C	2 mM	Programa TD53 Netzyme Clonación en pCR2.1 ó cortar banda
1161 - 1971	DBX-2F DBX-2R	GTGATTACGATGGCATTGGCAGC GGAGGCATAGTATCTTGTTCGAC	50°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
1827 - 2379	DBX-3F DBX-3R	CAGGACGTCTAGTGGATATGATG GAAATGTCCAGTCTCTTGCTGC	57°C 53°C	2 mM	Programa TD53 Netzyme
2280 - 2967	DBX-4F DBX-4R	GTTCTCAGAGGGATAGAGAAGAG GTGGAGAATCACAGCTGGTAATG	57°C 53°C	2 mM	Programa TD53 Netzyme

Tabla M40: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de la pauta de lectura de *DDX3X* sobre cDNA.

Gen *CASK* (NM_003688).

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
24 - 764	CASK-F1 CASK-R1	GACCATGGCCGACGACGACGTG GAGATATGGCTCCACTGCCCTTGG	58°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
608 - 1459	CASK-F2 CASK-R2	AGCCTTACGGAAAGCCTGTAGAC CGTTAGCACTTTCTGGAGAATCG	50°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
1344 - 2191	CASK-F3 CASK-R3	CTTACTTCAGACTCACGACGTAG TGACAAGATCTGCATTGTGCTTTG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
	CASK-R3N	GATCAAACACTGCATTGTGCTTTG			Equivalente a R3, pero para 15 bases alternativas
2069 - 2915	CASK-F4 CASK-R4	GAGTAGCTTGCATTGCCATGGAG GTAGGTCACACTACAACACTAGGTAG	56°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
1344 - 1826	CASK-F3 CASK-R5	CTTACTTCAGACTCACGACGTAG GAATTGTTAGTGTGCTATGACC	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
1766 - 2191	CASK-F5 CASK-R3	GAGATTCCTCCCTCCACTTCCAG TGACAAGATCTGCATTGTGCTTTG	50°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Tabla M41: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de la pauta de lectura de *CASK* sobre cDNA.

Gen *GPR34* (NM_005300).

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
? ³ - 1434	GPR34F GPR34R	GAAGTACACATGAGGAATATGTC CAAGCAGAGCTTTGAGATCTGAG	52°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme Elongación: 1' 30"
---	GPR34R2	CGTTATGCTTATCTCTGTAATGG	---	---	Usado sólo para secuenciación

Tabla M42: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *GPR34*.

Gen *GPR82* (NM_080817). Los cebadores fueron cedidos por la Dra. Juliane Ramser.

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
intr. ⁴ - 515	GPR82-1F GPR82-1R	TATACTTTCCCGTTCCATCC TTGACCACTCTGCATTGAGC	54°C	2 mM	Programa 45"-45"-45" 35 ciclos Netzyme
387 - 867	GPR82-2F GPR82-2R	AACGCACATCTACCTGTACAC AAATGTGGTTCCAATGAGACC	57°C	2 mM	Programa 45"-45"-45" 35 ciclos Netzyme

³ En este caso aparece el símbolo ? en lugar de la base correspondiente del cDNA, porque dicho cebador fue diseñado sobre una secuencia con un 5' UTR diferente al de la secuencia de referencia actual. Sin embargo, la amplificación se llevó a cabo con éxito y el fragmento pudo secuenciarse, por lo que el cebador sigue siendo útil.

⁴ Cuando aparece la abreviatura intr., indica que el cebador está situado en un intrón que separa el exón que contiene la pauta abierta de lectura de otros exones que contienen secuencia 5' UTR.

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
755 - 1089	GPR82-3F GPR82-3R	TATACTACTCAGTCATAGAGGC TTGCTGACAGTTATCTCTTTGG	54°C	2 mM	Programa 45"-45"-45" 35 ciclos Netzyme
936 - 1348	GPR82-4F GPR82-4R	AACCTGTACGTCCATTATGG GTCAACCAAGCTGTGACATG	54°C	2 mM	Programa 45"-45"-45" 35 ciclos Netzyme

Tabla M43: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *GPR82*.

Gen *LOC158781* (NG_001562). Los cebadores fueron cedidos por la Dra. Juliane Ramser.

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
-34 ⁵ - 926	LOC88448a-f LOC88448b-r	ATGGTGATTTCCCATCTCGC TTTGTGGGACAGCATGGATG	55°C	1.5 mM	Programa Standard Taq (QIAGEN) Elongación: 1'30"
---	LOC88448a-r LOC88448b-f	CCTCTGCCAAGTAATGGTAG AAGTTCTTGATCCCCAGTGC	---	---	Usados sólo para secuenciar

Tabla M44: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *LOC158781*.

Gen *TNRC8*. La secuencia de este gen se ha obtenido de la base de datos Aceview y las bases indicadas corresponden al transcrito "a".

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
222 – 408	TNRC-RP1F TNRC-RP1R	ATGACCTAGCTGCATATACTTAC GTTCTGCTGATGGAATGGAAGC	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Amplifican la repetición CTG.
1506 - 2037	TNRC8-1F TNRC8-1R	CAATACTGAGAGCGATTACAGG CACAAAGAGCTAAGACTTAGGAG	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme Amplifican la pauta de lectura.

Tabla M45: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *TNRC8*.

Gen *PQBP1* (NM_005710; NM_144494; NM_144495).

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 1	PQBP1-1F PQBP1-1R	ACGCTGGATGAGCCCATTCTGAAG GCTAGGTATCAAGCGTCAGTATCAAC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 2	PQBP1-2F PQBP1-2R	CTCTAGGCTCTACATGTAGGATG TCCTGCAGATACCTAATGCCAAC	58°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 3	PQBP1-3F PQBP1-3R	GCTGACAGTGTCTTCTCTCAGGAG CTCTGATCCACTATCATTCTACTTGG	55°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme

⁵ En este caso aparece un número negativo como primera base del producto de PCR porque el cebador se encuentra localizado a nivel de DNA genómico 34 bases antes del comienzo de la secuencia de referencia.

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exones 4-6	PQBP1-4F PQBP1-6R	CCAAGTAGAATGATAGTGGATCAGAG GCTCCACACTATCTCTTAGCTGAG	55°C	2 mM	Programa Standard 35 ciclos Netzyme
---	PQBP1-4R PQBP1-5F PQBP1-5R PQBP1-6F	GCCATGTACCACAGCACCCCTC GAGGGTGCTGTGGTACATGGC AGGATGGTGTCCACGTACTGAG CTCAGTACGTGGACACCATCCT	---	---	Usados sólo para secuenciar

Tabla M46: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *PQBP1*.

Gen *AGTR2* (NM_000688). Los cebadores AGTR2-F y AGTR2-R se han tomado de Vervoort *et al.*, 2002.

Bases	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
intr. - 1310	AGTR2-F AGTR2-R	TCAAGGATGTCCTCAGCTCTGTATGTG TCTGGTGAGCCTCAAAGCAAGTAGC	61°C	2 mM	Programa Standard Netzyme 35 ciclos
---	AGTR2-iF AGTR2-iR	TATCACCTGCATGAGTGTG CTATATAAGATGCTTGCCAGG	---	---	Usados sólo para secuenciar

Tabla M47: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *AGTR2*.

Gen *GRIA3* (NM_000828 (variante flop); NM_007325 (variante flip); NM_181894). Los cebadores, excepto GRIA3-2AF, GRIA3-2AR, GRIA3-2BF, GRIA3-2BR, GRIA-13F2 y GRIA13-R2, se han tomado de Gecz *et al.*, 1999.

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 1	GRIA1d GRIA1r	GTTGCGCCCATGCTCTTGTC GGGAGAGCCTGGACCGACG	64°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 2	GRIA2d GRIA2r	CAATTCCTAACTGGCCCTAGTG ACAAGAAAGATGCAAATGAGGTC	60°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón alt. A NM_181894	GRIA3-2AF GRIA3-2AR	CCACTGTGTAAGTAGGCTTGAC GGACAGTGACATCAAGGTTTAC	55°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón alt. B NM_181894	GRIA3-2BF GRIA3-2BR	CAACCTGTGTAAGATGAGCTATG CACACTACTTAGATGAGTGCTAC	52°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 3	GRIA3d GRIA3r	AGGGACCATGGAGCTATTGAATC AACACAATTACATGAATATCTAAAG	48°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 4	GRIA4d GRIA4r	CAGTAGAATCTTTAATACCTACAG ATATGGGAGCTGACTTAGGTTG	60°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 5	GRIA5d GRIA5r	GAAAATGTCCTTCTTGAATAAGC TAAATAGGATATATTGCCAGGG	60°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 6	GRIA6d GRIA6r	CATACAACCTCCACAATCATG GTTTTTTTACATGCCATGGAAC	60°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 7	GRIA7d GRIA7r	GAGGGTATCATTTATCATGATATC TATGTCTTTATAAGTTTCTTCCAC	50°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 8	GRIA8d GRIA8r	ACCTCATCCCAGAGACTTAG CCAAATGCTGTCTCTTTCAAG	60°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme

Exón	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
Exón 9	GRIA9d GRIA9r	GGGAAAAATAGGCATCCAGG AACGGAAGTCTTGCTGGACAG	60°C	1.5 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 10	GRIA10d GRIA10r	ATGTATAGGAGTAATCCTTTTATC TAATTGGAAAGCACAGAATAAATG	60°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 11	GRIA11d GRIA11r	CAAATAACTGATTAAGACTGTCTC CTGCTGACTAGGAAAAGAACTAC	60°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
	GRIA11(2)d GRIA11(2)r	GGCTTATGAAATCTGGATGTGC GAATGGAGTATGACCATAAAATG	60°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 12	GRIA12d GRIA12r	CCCTCTGGGTCTGGATTTG GATAAAATAAATATCAGCAGGCTC	60°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 13	GRIA13F2 GRIA13R2	CTACTAGGTTGCAGTGAACGTG GTCACATATGGCACCATAACTTG	60°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 14	GRIA14d GRIA14r	CTAAGCATTGTGCATTTTCTTAC GATTACTCGTCACTAAGGGTAC	60°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 15	GRIA15d GRIA15r	GCTCAGGTTGCCTGCAGTG AAAGACCTTCAGCGACTGAC	60°C	2 mM	Programa Standard Netzyme
Exón 16	GRIA16d GRIA16r	TATTATATTGTTCCATTGCCTTTG CTGATTAGTTTACTAGACCTTAAC	48°C	2 mM	Programa Standard Netzyme

Tabla M48: oligonucleótidos empleados en la amplificación y secuenciación de *GRIA3*.

Oligonucleótidos para la amplificación de los nuevos marcadores genéticos diseñados para refinar la región de ligamiento en la familia *fELX 7*.

Marcador	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
<i>Contig 1</i>	contig1F	GTTTCCCTTCTGTAAGGCCAC	60°C	1.5 mM	Programa syn/araf Netzyme
	conig1R	GCTGATAATTGTCACAAGCTAC	55°C		
<i>Contig 2</i>	contig2F	GTGACTTCTTTATCTCTACATGC	60°C	1.5 mM	Programa syn/araf Netzyme
	contig2R	GCAACAGACATCTTCATGCC	55°C		
BAC1	BAC1-F	GTGATGTGAGCTGTACATCGTAAG	60°C	1.5 mM	Programa syn/araf Netzyme
	BAC1-R	CCACTACCAATGTCATTAACCTTC	55°C		
50A13	50A-F	GTAGATTGGGACTATACCATG	60°C	1.5 mM	Programa syn/araf Netzyme
	50A-R	GTAGGAAGTTCAACAAGATGAC	55°C		
308	308-F	GCCTATTTGAATGTACTCCAC	60°C	1.5 mM	Programa syn/araf Netzyme
	308-R	CTTCTCATGGTCACCTCATC	55°C		
735	735-F	CATTGATACAGTCTTTCTGAAG	60°C	1.5 mM	Programa syn/araf Netzyme
	735-R	CATGCATCTTTATACTCTAGTG	55°C		

Tabla M49: oligonucleótidos empleados en la amplificación de marcadores polimórficos en *Xp11.4*.

Otros oligonucleótidos

	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T ^a	[Mg ²⁺]	Observaciones
---	M13F M13R	GTA AACGACGGCCAGT CAGGAAACAGCTATGAC	---	---	Usados con el programa Col-PCR sobre plásmidos o para secuenciar

Tabla M50: otros oligonucleótidos empleados en este trabajo.

V. Enzimas, ácidos nucleicos, anticuerpos y kits

V.1 Enzimas de restricción

Los enzimas de restricción se obtuvieron de las casas comerciales Fermentas, Roche y Promega.

Enzima	Diana 5' → 3'	Aplicación
<i>EcoRI</i>	G/AATTC	Digestión del DNA genómico para el análisis por Southern blot en la familia fELX 72. Digestión de construcciones clonadas en pCR2.1 para comprobar la presencia de inserto.
<i>SacI</i>	GAGCT/C	Clonación de la pauta de lectura de FLJ14503 en pEGFP-C1 y pEGFP-N3
<i>SacII</i>	CCGC/GG	Clonación de la pauta de lectura de FLJ14503 en pEGFP-C1 y pEGFP-N3
<i>Sau 96I</i>	G/GNCC	Comprobación de la variante c.1692A>G del gen <i>BCOR</i>
<i>Asp700I</i>	GAANN/NN TTC	Comprobación de la variante c.4177T>C del gen <i>USP9X</i>

Tabla M51: enzimas de restricción empleados en este trabajo.

V.2 Polimerasas

Netzyme	NEED
Taq DNA Polimerasa	Qiagen
Hot Start Polimerasa	Qiagen
Fast Start Polimerasa	Roche
Expand High Fidelity Polimerasa	Roche
Pwo SuperYield DNA Polimerasa	Roche

V.3 Otros enzimas

Expand Reverse Transcriptase	Roche
T4-DNA-Ligasa	Roche

V.4 Nucleótidos

dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Roche
[α - ³² P]dCTP	Hartmann Analytic GMBH, Braunschweig
Dig DNA labelling Mix (Dig-11-dUTP)	Roche

V.5 Marcadores

Marcador XIV (marcador de 100 pb)	Roche
Marcador II (λ DNA <i>HindIII</i>)	Fermentas
Marcador VII	Roche

VI. Sondas

V.6.1 Sondas TaqMan® para PCR cuantitativa

Sonda	Gen	Sonda	Gen
Hs 99999905_m1	<i>GAPD</i>	Hs 00188481_m1	<i>CRSP2</i>
Hs 00372369_m1	<i>BCOR</i>	Hs 00245009_m1	<i>USP9X</i>
Hs 00372378_m1	<i>BCOR</i>	Hs 00606179_m1	<i>DDX3X</i>
Hs 00366626_m1	<i>ATP6AP2</i>	Hs 00377808_m1	<i>GPR34</i>
Hs 00376487_m1	<i>MGC39350</i>	Hs 00177620_m1	<i>CASK</i>

Tabla M52: Sondas TaqMan®.

V.6.2 Sondas para hibridación en *Southern* y *Northern blots*

Gen	Cebadores	Producto	Aplicación
RPS6KA3	rsk4F rsk4R	Exón 4	<i>Southern blot</i> en la familia fELX72 (CLS)
LAVA	LAVA-SonF LAVA-SonR	Bases 430 - 794 del transcrito de Aceview	<i>Northern blot</i> sobre MTN-12 Lane

Tabla M53: Sondas para *Southern* y *Northern blots*.

V.7 Membrana

Human 12-Lane MTN™ Blot BD Biosciences

V.8 RNA

RNA poli(A⁺) de cerebro fetal humano BD Biosciences

V.9 Anticuerpos

anti- α -tubulina, clonDM 1A (ratón) dilución 1/1000 Sigma
 Alexa Fluor 546 *goat anti mouse* IgG dilución 1/1000 Morbitec

V.10 Kits

Jetquick PCR Product Purification Spin Kit Genomed, Bad Oeynhausen
 High Pure Plasmid Isolation Kit Roche
 Genopure Plasmid Midi Kit Roche
 Genopure Plasmid Maxi Kit Roche
rediprime®II random prime labelling system Amersham Biosciences
 TOPO® TA Cloning Kit Invitrogen, Carlsbad, USA
GFXPCR DNA and Gel Band Purification Kit Amersham Biosciences
 BigDye® terminator v3.1 Cycle sequencing kit Applied Biosystems
 TF Geneamp Gold RNA PCR Core Kit Applied Biosystems
 TaqMan Universal PCR Master Mix Applied Biosystems
 CSPD- ready-to-use Roche
 FuGENE 6 Transfection Reagent Roche

VI. Medios, Aditivos, Tampones y Disoluciones

VI.1 Medios y Aditivos para el cultivo de bacterias

Medio LB:		10 g	Triptona
		5 g	Extracto de Levadura
		10 g	NaCl
	hasta 1000 ml		Agua destilada pH 7,0
Agar para placas:	por 1000 ml de LB:	15 g	Agar
Kanamicina:	por 1000 ml de LB:	1 ml	25 mg/ml en agua destilada, estéril
Ampicilina:	por 1000 ml de LB:	0.5 ml	100 mg/ml en agua destilada, estéril
X-Gal:	por 1000 ml de LB:	2 ml	20 mg/ml en dimetilformamida

VI.2 Medios, Tampones y Aditivos para el cultivo de células eucariotas

Nutrient Mixture F12 (HAM)	Medio base	Invitrogen Life Technologies
Suero bovino fetal (FCS)	10% en medio base	Invitrogen Life Technologies
Antibióticos (Penicilina / Estreptomina)	1% en medio base	Invitrogen Life Technologies
PBS 1x	Lavado de las células	137 mM NaCl 2.68 mM KCl 7.57 mM Na ₂ HPO ₄ 0.6 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 1.5 mM KH ₂ PO ₄
Tripsina		Invitrogen Life Technologies
DMSO	10% en medio completo (con FCS y antibióticos) para congelación	Sigma

VI.3 Tampones y disoluciones para la electroforesis en geles de agarosa

Tampón de carga 6x	Carga del DNA en los geles de agarosa	0.05% azul bromofenol 0.05% azul xilencianol 100 mM EDTA 0.5 M pH 8,0 50% Glicerol
TBE 1x	Tampón para elaborar los geles de agarosa y en el que se desarrolla la electroforesis	89 mM Tris 89 mM Ácido bórico 2 mM EDTA
Bromuro de etidio	Tinción del DNA en los geles de agarosa	0.5 µg / ml en el gel y el TBE

VI.4 Tampones y Disoluciones para la electroforesis en geles de acrilamida

Tampón de carga 6x	Carga del DNA en los geles de acrilamida	95% Formamida 0.025% Azul de bromofenol 0.025% Xilen-cianol 10mM NaOH
Etanol	Fijación de los geles	10% en H ₂ O
HNO₃	Oxidación	1% en H ₂ O
AgNO₃	Tinción	12 mM en H ₂ O
Revelador	Reducción de los iones Ag ⁺ a plata metálica (Ag ⁰), que es insoluble y precipita	29,6 g Na ₂ CO ₃ anhidro 540 µl Formaldehído 37% hasta 1 litro H ₂ O
Ácido acético 5%	Detención del revelado	5% en H ₂ O

VI. 5 Tampones para inmunofluorescencia

PBS +/-	Lavado de las células Receta PBS, añadiendo:	0.5 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂
PFA 4%	Fijación de las células	4% Paraformaldehído en PBS
Blocking	Bloqueo de uniones inespecíficas Disolución de anticuerpos	1% BSA en PBS +/-
Mowiol	Montaje de las preparaciones	

VI.6 Otros tampones

TE 1x	Tampón para la disolución de DNA	10 mM Tris 1 mM EDTA pH 8,0 HCl
Acetato amónico 4M	Purificación de productos de PCR	
rxn 5x	Tampón para la dilución del BigDye [®] terminator v3.1 Cycle sequencing kit	400 mM Tris-HCl, pH 9.0 10 mM MgCl ₂

VII. Programas informáticos y bases de datos

VII.1 Programas informáticos

Programa	Aplicaciones
Sequencher v.4.0.5	Edición y comparación de secuencias, elaboración de contigs
Webcutter 2.0	Elaboración de mapas de restricción http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html
RepeatMasker2 Web Server (Smit, 1996-2004)	Identificación de elementos repetitivos en secuencias de DNA http://www.repeatmasker.org
BLAST (Altschul <i>et al.</i> , 1990)	Búsqueda de homologías entre secuencias de DNA o de proteínas http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
Map Viewer	Búsqueda de genes, marcadores, etc. en el genoma completo de un organismo http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview
ORF-Finder	Identificación de pautas abiertas de lectura en secuencias de DNA http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html
PSORT II (Nakai y Kanehisa, 1992; Nakai y Horton, 1999)	Predicción de la localización subcelular de proteínas en base a su secuencia primaria http://psort.nibb.ac.jp
ExPASy-PROSITE (Sigrist <i>et al.</i> , 2002)	Identificación de dominios funcionales en proteínas http://expasy.org/prosite
Entrez	Búsqueda simultánea y cruzada en diferentes bases de datos http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html
ClustalW (Chenna <i>et al.</i> , 2003)	Alineamiento múltiple de secuencias de DNA y proteínas http://www.ebi.ac.uk/clustalw
Boxshade	Sombreado de alineamientos múltiples para su impresión http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html
UCSC (Kent <i>et al.</i> , 2002)	Representación de regiones de diferentes genomas con la información disponible sobre ellas http://genome.ucsc.edu
PROF (Rost, 1993; Rost y Sander, 1996)	Predicción de estructura secundaria de proteínas http://www.predictprotein.org
Rescue-ESE (Fairbrother <i>et al.</i> , 2002)	Predicción de secuencias exónicas potenciadoras del procesado http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese

Tabla M54: Programas bioinformáticas empleados.

VII.2 Bases de datos

Base de datos	Características
GenBank	Recoge las secuencias genéticas del NIH (National Institute of Health), así como todas las secuencias públicas de DNA
RefSeq	Recoge un conjunto de secuencias exhaustivo, integrado y no redundante, que incluye secuencias de DNA genómico, transcritos y proteínas
nr	Contiene todas las secuencias nucleotídicas de GenBank, RefSeq, EMBL (European Molecular Biology Laboratory), DDBJ (DNA Data Bank of Japan) y PDB (Protein Data Bank), pero no ESTs, STSs, GSSs o HTGSs. Inicialmente fue una base de datos "no redundante".
dbEST	División de GenBank que contiene los datos de secuencia de ESTs
SwissProt	Base de datos de secuencias de proteínas que incluye anotaciones funcionales, estructurales, etc.
Aceview	Ofrece una visión integrada de los genes humanos, reconstruyéndolos por alineamiento de todas las secuencias de mRNAs y ESTs disponibles públicamente
Entrez-Gene	Organiza la información sobre características y secuencias definitorias de genes de diferentes especies
Entrez-Nucleotide	Recopila secuencias de DNA de distintas procedencias: GenBank, RefSeq y PDB
Entrez-Protein	Recopila secuencias de proteínas de distintas procedencias: SwissProt, PIR (Protein Information Resource), PRF (Protein Research Foundation) y PDB, y secuencias obtenidas por traducción de las secuencias codificantes anotadas en GenBank y RefSeq
CDD	"Conserved protein domain database", contiene dominios derivados de Smart (Simple Modular Architecture Research Tool), Pfam (Protein FAMILies database of alignments and hidden Markov Models) y COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins)
OMIM	Es un catálogo de genes humanos y enfermedades genéticas
PubMed	Proporciona acceso a más de 12 millones de citas bibliográficas de MEDLINE
dbSNP	Base de datos de polimorfismos de un solo nucleótido ("Single Nucleotide Polimorphism").

Tabla M55: Bases de datos consultadas.

Excepto el programa *Sequencher* versión 4.0.5 de la empresa *Gene Codes Corporation*, cuya licencia tiene adquirida la Universidad de Valencia, el resto de programas y bases de datos son de acceso libre a través de internet.

VIII. Métodos moleculares

VIII.1 Identificación de nuevos marcadores genéticos y análisis en la familia fELX7.

VIII.1.1 Búsqueda de repeticiones de di- o trinucleótidos y diseño de cebadores.

Para obtener nuevos marcadores con los que poder redefinir la región candidata a albergar el gen responsable del síndrome de Prieto, se partió de las secuencias genómicas de los clones mapeados en la región Xp11.4 disponibles en aquel momento en las bases de datos públicas. Se realizó una búsqueda de todas las combinaciones posibles de dinucleótidos y trinucleótidos, empleando programas de edición de texto y, una vez encontradas, se valoró el número de repeticiones y la pureza de las mismas. Aquellas repeticiones puras de más de 14 unidades se consideraron posibles marcadores polimórficos. Para estos casos se diseñaron cebadores en las regiones que flanqueaban la repetición.

Los criterios seguidos a la hora de diseñar los cebadores utilizados en el presente trabajo han sido los siguientes, salvo si se indica lo contrario:

- Longitud de entre 18 y 24 nucleótidos (generalmente 21-23)
- Contenido en G/C de aproximadamente el 50% del total de bases
- Evitar en lo posible tramos de más de tres G/C o A/T seguidos
- Primera y última base G o C, cuando sea posible

VIII.1.2 Análisis de los posibles marcadores en la familia fELX7.

Una vez diseñados los cebadores y establecidas las condiciones de amplificación en DNAs control, se procedió a amplificar los marcadores en los distintos miembros de la familia fELX-7 para los que se disponía de DNA (los detalles sobre la amplificación por PCR pueden consultarse en el apartado VIII.2.2 y las condiciones de amplificación en la tabla M49). Tras verificar la amplificación en geles de agarosa, se cargaron en geles de acrilamida al 12%, dejándolos correr a 700 V durante 8 h. El revelado de los geles se hizo mediante tinción con plata: tras fijar los geles en etanol al 10% durante 10 min, se aplicó HNO₃ al 1% durante 3 min como oxidante. A continuación se realizaron 2 lavados cortos con H₂O y se dejó el gel durante 20 min en una solución de AgNO₃. Antes del revelado se hicieron otros 2 lavados muy cortos con H₂O, para luego añadir un poco de revelador, que fue sustituido por mayor cantidad después de eliminar el precipitado formado. El proceso de revelado se detuvo con ácido acético al 5%.

VIII.2 Análisis de mutaciones de los genes candidatos

VIII.2.1 Identificación de genes candidatos y diseño de cebadores.

Los genes localizados dentro de las regiones de ligamiento y, por tanto, candidatos a ser responsables de los fenotipos en las diferentes familias, se identificaron, en su mayoría, mediante búsquedas en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). La publicación del primer borrador del genoma humano en el año 2001 facilitó mucho esta labor. La herramienta MapViewer, que permite buscar genes, clones, marcadores, etc. en regiones concretas de los cromosomas, fue de gran utilidad. En concreto, para la región Xp11.4, la colaboración mantenida con el laboratorio del Dr. Alfons Meindl, del Departamento de Genética Médica de la Ludwig-Maximilians-Universität de Munich, permitió disponer de secuencias de un número importante de genes todavía no descritos en las bases de datos, puesto que este grupo ha elaborado un mapa de transcritos de la zona .

El diseño de los cebadores siguió los criterios descritos en VIII.1.1. y se abordó de forma diferente, según se fuera a analizar el gen sobre cDNA o sobre DNA genómico. En los casos en que se pretende analizar cDNA, los cebadores pueden diseñarse directamente sobre la secuencia del gen disponible en la base de datos, colocándolos de forma que amplifiquen fragmentos solapantes. De este modo, al secuenciar dichos fragmentos, se obtiene la secuencia completa del gen. Sin embargo, cuando el análisis ha de efectuarse sobre DNA genómico, es necesario averiguar primero la estructura del gen, ya que la amplificación se hará exón a exón. Como los cebadores se han de colocar en los intrones flanqueantes, se hace necesario, además, obtener un mínimo de secuencia genómica a cada lado del exón. Para ello, tras obtener la secuencia de cDNA del gen, se llevó a cabo un análisis BLASTN frente a la base de datos nr. Esto proporcionó varias informaciones relevantes: qué clon o clones genómicos contienen el gen, por cuántos exones está formado, y cuál es la posición de esos exones en el clon. Por último, se obtuvo la secuencia del clon (o clones) genómicos y se seleccionaron fragmentos de unas 1000 pb, que contenían los exones y unas 400 pb de los intrones a uno y otro lado de cada exón.

VIII.2.2 Amplificación de exones y fragmentos de cDNA por PCR.

Una vez diseñados los cebadores, se procedió a la amplificación de los exones y fragmentos de cDNA en las muestras de pacientes. La optimización de las condiciones de amplificación se realizó con muestras de individuos control, dado que la cantidad de material proveniente de pacientes era siempre limitada. En las tablas M8 a M48 se recogen las secuencias de los cebadores, el fragmento que amplifican, la temperatura de asociación y la concentración de iones magnesio empleados en cada caso. También aparece el tipo de programa de PCR que se aplicó, con modificaciones cuando fueron necesarias. En concreto, se emplearon las siguientes mezclas de reacción:

DNA (50 - 500 ng/ μ l)	mín. 50 ng
dNTPs (10 mM)	0.5 μ l
Cebador directo (10 pmol/ μ l)	0.5 - 1 μ l
Cebador reverso (10 pmol/ μ l)	0.5 - 1 μ l
Tampón PCR 10X	2.5 μ l
MgCl ₂ (25 mM) ⁶	1.5 μ l
Polimerasa	0.5U
H ₂ O	hasta 25 μ l

Las reacciones de amplificación se realizaron en termocicladores Eppendorf Mastercycler y MJ Research PTC 200. Los diferentes programas empleados fueron:

Programa Standard	Programa RSK	Programa RSKex1
95°C 5'	95°C 5'	94°C 3'
95°C 30''	95°C 15''	98°C 30''
X°C 45''	X°C 1'	63°C 1'
72°C 1'	72°C 10''	74°C 30''
72°C 5'	72°C 5'	74°C 7'

⁶ En muchos casos el tampón de PCR empleado ya contenía MgCl₂ y por tanto no fue necesario añadirlo como tal a la reacción.

Programa TD	Programa Col-PCR
95°C 5'	95°C 5'
95°C 30" } X°C 45" } × 3 72°C 1' }	95°C 1' } 55°C 1' } × 31 72°C 1' }
95°C 30" } X-2°C 45" } × 3 72°C 1' }	72°C 5'
95°C 30" } X-4°C 45" } × 31 72°C 1' }	
72°C 5'	
Programa syn/araf	Programa 45"-45"-45"
95°C 5'	95°C 5'
95°C 30" } 60°C 45" } × 10 72°C 1' } -0.5°C / ciclo	95°C 45" } X°C 45" } × 31 72°C 45" }
95°C 30" } 55°C 45" } × 24 72°C 1' }	72°C 5'
72°C 5'	

El programa TDL es idéntico al TD excepto en el tiempo de elongación, que es superior a 1'. La temperatura de asociación se ajustó a los cebadores en cada ocasión, tomando como temperatura de partida la indicada por el proveedor (ver tablas M8 a M48) y el tiempo de elongación también se varió en función del tamaño del fragmento a amplificar, sobre todo en el caso de fragmentos de gran tamaño (más de 1000 pb), donde se incrementó a 1 min 30 sec o incluso 2 min. En algunos casos en que la cantidad del producto de PCR obtenido era menor, se aumentó el número de ciclos a 35 ó 40.

Los productos de PCR generados se comprobaron siempre en gels de agarosa de entre 0.8% y 1.5%, en función del tamaño del fragmento amplificado. Tras verificar que la amplificación se había producido correctamente, los productos se analizaron mediante SSCPs (apartado VIII.2.3) o bien fueron purificados y secuenciados (apartados VIII.2.4 y VIII.2.7).

VIII.2.3 Análisis de SSCPs

Este tipo de análisis se basa en la diferente movilidad de las cadenas simples de DNA en geles de acrilamida en función de su secuencia nucleotídica. Puede aplicarse como método para identificar nuevos cambios nucleotídicos, o para comprobar si un cambio previamente detectado en un paciente está presente también en otras muestras. En este último caso presenta la ventaja de permitir procesar un elevado número de muestras en un tiempo relativamente corto.

Para realizar este análisis se tomó un volumen de producto de PCR de entre 2 μ l y 5 μ l, según el rendimiento de la amplificación, y se añadió 1 μ l de tampón de carga. A continuación se calentó la mezcla a 95°C durante 5 min, desnaturalizando el DNA y obteniendo así cadenas sencillas. Tras enfriar rápidamente en hielo para impedir la renaturalización, se cargaron las muestras en geles de acrilamida al 12%, aplicando un voltaje de 500 V durante toda la noche (o/n) y aumentándolo al día siguiente a 1000 V durante 2 horas antes del revelado del gel. El revelado se llevó a cabo según se ha descrito en el apartado VIII.1.2.

VIII.2.4 Purificación de productos de PCR

Cuando se quiere secuenciar un fragmento de DNA que ha sido amplificado por PCR, es necesario purificarlo previamente, ya que los nucleótidos y cebadores sobrantes de la reacción de amplificación interferirían con la secuenciación. Además también se eliminan así los restos de enzima y de las sales del tampón de la polimerasa. Esto puede llevarse a cabo de dos maneras: con un kit comercial (se ha utilizado el Jetquick PCR Product Purification Spin Kit, de Genomed) o bien precipitando el producto de PCR con acetato amónico 4M. En principio esta precipitación se recomienda cuando la cantidad total de cebadores en la reacción de PCR no sobrepasa los 10 pmoles, pero a lo largo de este trabajo se ha comprobado que también es efectiva en reacciones con 20 pmoles totales.

El protocolo para la precipitación es el siguiente:

15 μ l - 20 μ l de producto de PCR
15 μ l (aprox. 1 volumen) de acetato amónico 4M
90 μ l (aprox. 6 volúmenes) de etanol 100%

- mezclar bien y centrifugar a temperatura ambiente durante 15' a 13.000 rpm, eliminar el sobrenadante
- añadir 400 μ l de etanol 70%
- vortex y centrifugar a temperatura ambiente durante 5' a 13.000 rpm, eliminar el sobrenadante
- secar el pellet durante 5' a 37°C
- disolverlo en 20 μ l de H₂O

VIII.2.5 Clonación de productos de PCR y análisis de colonias

Existen ocasiones en que la amplificación por PCR no genera un único producto. Esto sucede, sobre todo, cuando se usa como molde cDNA y existen transcritos alternativos. Para poder secuenciar las distintas variantes es necesario obtenerlas por separado, y para ello se optó en algunos casos por clonar los productos de PCR, empleando el TOPO[®] TA Cloning Kit de Invitrogen. Este kit incluye el vector pCR[®]2.1-TOPO[®], que está linearizado y presenta dos timidinas desapareadas y la enzima topoisomerasa localizada sobre el lugar de clonación. Como la mayoría de polimerasas incorpora de forma inespecífica una adenina en el extremo del amplificado, éstas aparearán con las timidinas del vector, y la topoisomerasa catalizará la

ligación, de forma que el proceso puede realizarse en tan sólo 5 minutos. Con esta reacción de ligación se transforman luego bacterias competentes, siguiendo las instrucciones del manual y, al día siguiente, pueden analizarse ya las colonias resultantes de la transformación.

Con este proceso de clonación se consigue aislar los diferentes productos de PCR, ya que cada colonia contiene ahora uno de los fragmentos que se habían generado inicialmente. Para llevar a cabo el análisis de estas colonias, se realizó una PCR a cuya mezcla de reacción se añadió, en lugar de DNA molde, el DNA genómico de las bacterias transformadas. Para ello se transfirió con un palillo o una punta estéril una muestra de la colonia a la reacción de PCR. El programa empleado fue el Col-PCR (ver apartado VIII.2.2) y los cebadores fueron M13F y M13R (ver tabla M50), que flanquean el lugar de clonación del vector. Los productos de esta PCR se comprobaron luego en un gel de agarosa, siendo luego purificados y secuenciados.

Es importante resaltar que, debido a que en estos casos el producto que se secuencía se ha amplificado a partir de un clon, es necesario obtener un número mínimo de secuencias para cada variante. De esta forma se pueden identificar los cambios introducidos por la polimerasa en la primera reacción de PCR, excluyéndolos como posibles mutaciones o polimorfismos.

VIII.2.6 Extracción de DNA a partir de bandas de geles de agarosa

Otra opción para los casos en que se obtiene más de una banda tras la amplificación por PCR, sobre todo si se trata de una reacción supuestamente específica (p.ej. porque se está amplificando un exón sobre DNA genómico), es cortar la banda de un gel de agarosa, extraer el DNA y usarlo después para la secuenciación. En concreto, se cargó la totalidad de la reacción de PCR en geles de agarosa al 0.8%-1%, se cortó la banda de interés y a continuación se empleó el *GFXPCR DNA and Gel Band Purification Kit*, eluyendo en 20 µl de H₂O. Este DNA se usó después como molde en una reacción de secuenciación.

VIII.2.7 Secuenciación de fragmentos de DNA

El método de secuenciación aplicado está basado en el método de los didesoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977) y el kit utilizado ha sido el BigDye[®] terminator v3.1 Cycle sequencing kit, que incorpora en una única mezcla todos los componentes necesarios para la secuenciación, excepto el DNA y el cebador. En esta mezcla se incluyen los cuatro dNTPs, una polimerasa, el tampón de reacción y los cuatro didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia, cada uno con un fluorocromo diferente. El DNA que se quiere secuenciar actúa de molde y cada vez que la polimerasa incorpora uno de estos ddNTPs, lo que ocurre al azar, la síntesis se interrumpe, de forma que al final se habrá generado una mezcla de fragmentos de diferentes tamaños con su última base marcada. Esta mezcla se purifica para eliminar aquellos ddNTPs que no se han incorporado y se carga en un secuenciador, que separará los fragmentos por electroforesis según su tamaño. Un láser permitirá identificar la base marcada en cada uno de los fragmentos obtenidos. Tanto la filtración de las reacciones, como su electroforesis y la lectura de las secuencias se llevo a cabo en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Valencia.

Las mezclas de reacción empleadas fueron las siguientes:

Para fragmentos con un contenido normal en GC:			Para fragmentos con alto contenido en GC:		
DNA		1 - 7 µl	DNA		1 - 5 µl
Cebador (10 pmol/µl)		1 µl	Cebador (10 pmol/µl)		1 µl
BigDye [®]		2 µl	BigDye [®]		2 µl
			GC-rich solution (Roche)		2 µl
H ₂ O	hasta	10 µl	H ₂ O	hasta	10 µl

El BigDye[®] terminator v3.1 Cycle sequencing kit se usó sin diluir en aquellos casos en que el fragmento a secuenciar era de gran longitud, por ejemplo al secuenciar clones. Sin embargo, para fragmentos más cortos, por ejemplo exones, se aplicó una dilución 1:2 en 400 mM Tris-HCl pH9 con 10 mM MgCl₂, preparada siempre en el momento.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo con los siguientes programas:

Programa Standard	Programa Seq-L	Programa Seq-GC
96°C 5'	96°C 5'	96°C 10'
96°C 30'' 50°C 15'' 60°C 4' } × 36	96°C 30'' 50°C 15'' 60°C 4' } × 46	98°C 30'' 50°C 15' 60°C 4' } × 46
4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞

El programa Seq-L se empleó en aquellos casos en que se diluyó el kit, para compensar la menor cantidad de reactivos con un mayor número de ciclos, de forma que la intensidad de las señales fluorescentes fuera suficiente para ser detectada por el lector láser del secuenciador. El programa Seq-GC se aplicó cuando el fragmento a secuenciar presentaba un alto contenido en GC, combinándolo además con la mezcla de reacción descrita anteriormente.

VIII.2.8 Análisis de secuencias

Las secuencias se obtuvieron del Servicio de Secuenciación de la Universidad de Valencia en formato .abi. Para analizarlas se usó el programa *Sequencher* versión 4.0.5 de la empresa *Gene Codes Corporation*, que permite visualizar los cromatogramas y así comprobar la calidad de las secuencias, pudiéndolas editar en caso de errores en la asignación de bases por parte del secuenciador. Además este mismo programa puede realizar alineamientos múltiples, de forma que se pueden alinear las diferentes secuencias de un mismo exón en diferentes pacientes y analizarlas conjuntamente, o bien generar la secuencia completa de un cDNA a partir de fragmentos de secuencia solapantes, comparando al mismo tiempo con la secuencia de referencia de la base de datos.

Las secuencias editadas se usaron también en otros programas, como BLAST 2.0 (Basic Local Alignment Search Tool) en sus diferentes versiones (BLASTN, BLASTP, BL2SEQ), ORF Finder, etc.

VIII.2.9 Comprobación en los controles de los cambios hallados en los pacientes

Cuando se identifica un cambio en la secuencia de un gen en una muestra de un paciente, hay que comprobar si se trata de una mutación patológica o de un polimorfismo. Esto se llevó a cabo de diferentes maneras:

Cuando el cambio de nucleótido provocaba la aparición o desaparición de una nueva diana de restricción, se empleó el enzima de restricción correspondiente para digerir el producto amplificado por PCR. En la tabla M51 aparecen todos los enzimas usados y en el apartado VIII.5.3 se describen las reacciones de digestión.

Si el cambio no provocaba alteraciones en dianas de enzimas de restricción, la presencia de dicho cambio en los controles se comprobó por SSCPs (ver apartado VIII.2.3) o

bien secuenciando productos de PCR amplificados a partir de muestras de los individuos control.

En otras ocasiones se optó por comparar la secuencia obtenida en el paciente con las bases de datos dbEST y nr (utilizando el programa BLASTN), y dbSNP. Si dicho cambio aparecía en estas bases de datos, se asumió que se trataba de un polimorfismo.

VIII.3 Análisis cuantitativo de la expresión de los genes candidatos

VIII.3.1 Obtención de cDNA

Para realizar un análisis de la expresión de los genes es necesario partir de una cantidad suficiente de cDNA, que se genera por retrotranscripción a partir de RNA extraído de sangre periférica. Esto se llevó a cabo con el TF Geneamp Gold RNA PCR Core Kit, siguiendo las instrucciones del manual.

Por este método se obtuvo cDNA de un total de 7 individuos:

Controles	CNA6; CNA12; CNA13; CNA14; CNA15
Pacientes (S. de Prieto)	EX446; EX656

VIII.3.2 PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa se realizó mediante el uso de sondas TaqMan[®]. En la tabla M52 pueden consultarse todas las sondas empleadas. Estas sondas están formadas por 20-25 nucleótidos y llevan un fluorocromo en uno de sus extremos y un secuestrador de fluorescencia en el otro, de forma que la emisión de fluorescencia en la sonda intacta es nula. La sonda aparea con el fragmento que se pretende amplificar y cuando la polimerasa, que posee actividad 5'→3' exonucleasa, llega a la posición de la sonda, comienza a degradarla. Esto hace que el fluorocromo se separe físicamente del secuestrador y pueda emitir su fluorescencia, cuya intensidad será proporcional a la cantidad de producto sintetizado. En la figura M1 está esquematizado el proceso.

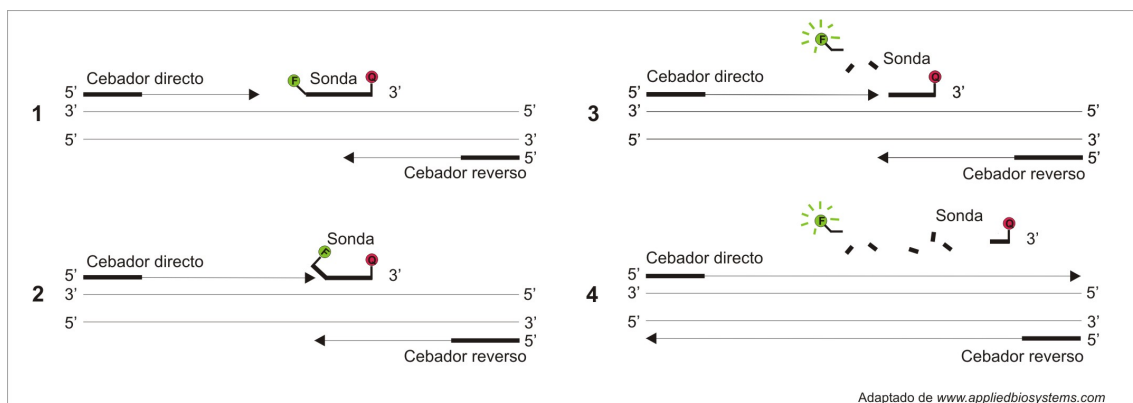


Fig. M1: Esquema de la técnica empleada en la PCR cuantitativa.

1. La sonda Taqman, con el fluoróforo en un extremo y el secuestrador en el otro aparea con el fragmento que se quiere amplificar. 2. Cuando la polimerasa alcanza la posición en la que hibrida la sonda, su actividad exonucleasa 5'→3' comienza a degradarla. 3. Esta degradación permite que el fluoróforo se separe físicamente del secuestrador, pudiéndose así registrar su fluorescencia. 4. La polimerasa completa la elongación y puede comenzar un nuevo ciclo.

Para la reacción se usó el TaqMan Universal PCR Master Mix, que incluye todos los reactivos necesarios excepto la sonda TaqMan®, los cebadores y el cDNA. En la disolución de la sonda TaqMan® correspondiente a cada gen se encuentran también los cebadores para la reacción de PCR. En concreto, la mezcla de reacción fue la siguiente:

Mix (2X)	12.5 µl
Sonda TaqMan® (20X)	1.25 µl
cDNA	1.5 µl
H ₂ O	9.75 µl
Total	25 µl

Para la amplificación de cada uno de los genes se usaron 3 réplicas de cada cDNA. Además se realizó una amplificación con 3 diluciones de un cDNA control (1; 1/10; 1/100), haciendo 3 réplicas por dilución, para el cálculo de la eficiencia de la PCR. El programa empleado fue:

50°C	2'	
95°C	10'	
95°C	15''	} × 40
60°C	1'	

VIII.3.3 Análisis de los resultados

El método seguido para el análisis fue de cuantificación relativa, por comparación del valor C_T. Es un método similar al de las curvas standard, pero en este caso se emplean fórmulas matemáticas para la cuantificación.

La ecuación que describe la amplificación exponencial que tiene lugar en la PCR es:

$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n$$

Donde X_n = número de moléculas diana en el ciclo n
 X₀ = número inicial de moléculas diana
 E_x = eficiencia de la amplificación de la diana
 n = número de ciclos

El ciclo umbral (C_T) indica el número fraccional de ciclo en el que la cantidad de diana amplificada alcanza un umbral determinado. Por tanto:

$$X_T = X_0 \times (1 + E_x)^{C_{T,X}} = K_x$$

Donde X_T = número umbral de moléculas diana
 C_{T,X} = ciclo umbral para la amplificación de la diana
 K_x = constante

Una ecuación similar para la reacción de referencia es:

$$R_T = R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R$$

Donde R_T = número umbral de moléculas de referencia
 R₀ = número inicial de moléculas de referencia
 E_R = eficiencia de la amplificación de la referencia
 C_{T,R} = ciclo umbral para la amplificación de la referencia
 K_R = constante

Si se divide X_T entre R_T , se obtiene la siguiente ecuación:

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 \times (1 + E_X)^{C_{T,X}}}{R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_X}{K_R} = K$$

Como los valores exactos de X_T y R_T dependen de varios factores, la constante K no tiene que ser necesariamente 1.

Asumiendo que la eficiencia de la amplificación de la referencia y la diana son iguales:

$$E_X = E_R = E,$$

$$\frac{X_0}{R_0} \times (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K$$

ó

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta C_T} = K$$

Donde $X_N = X_0/R_0$, cantidad normalizada de diana
 $\Delta C_T = C_{T,X} - C_{T,R}$, diferencia en el ciclo umbral de la diana y la referencia

Reorganizando la ecuación anterior se obtiene:

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta C_T}$$

El paso final consiste en dividir X_N de cualquier muestra q por X_N de la muestra que se considerará como calibrador (cb):

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T}$$

Donde $\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb}$

Para amplicones diseñados según las directrices de Applied Biosystems, la eficiencia es cercana a 1. Por tanto, la cantidad de diana, normalizada respecto a una referencia endógena y relativa al calibrador, viene dada por:

$$2^{-\Delta \Delta C_T}$$

El gen de referencia usado fue el *GAPDH* y los genes diana *BCOR* (2 sondas), *ATP6AP2*, *MGC39350*, *CRSP2*, *USP9X*, *DDX3X* y *CASK* (ver tabla M52). Como calibrador se empleó una de las muestras control (CNA6), de forma que el resto de valores quedaron cuantificados con respecto a ella. Como la aplicación de este método está condicionada a que las eficiencias en la amplificación de la diana y la referencia sean prácticamente iguales, este punto se comprobó analizando la variación de ΔC_T en función de la dilución de la muestra. Al haberse realizado para cada sonda una amplificación con 3 réplicas de 3 diluciones diferentes, se calculó la media de C_T para cada dilución, tanto para el gen correspondiente como para *GAPDH*, obteniendo luego mediante una resta el valor ΔC_T . Al representar estos valores de ΔC_T frente al logaritmo de la dilución del cDNA, se obtuvieron una serie de puntos. La pendiente de la recta de regresión que pasa por dichos puntos debe ser lo más próxima a 0. Si su valor absoluto es menor de 0.1, puede aplicarse el método descrito en este apartado.

VIII.4 Análisis de la expresión tisular del gen *LAVA* por Northern Blot

VIII.4.1 Obtención de la sonda

La sonda que se empleó en la hibridación se generó mediante PCR, usando como molde DNA genómico. El producto así generado se cargó en un gel de agarosa y la banda se cortó para extraer el DNA (ver apartado VIII.2.6), eluyendo en TE en el paso final.

VIII.4.2 Marcaje de la sonda con [α - 32 P]dCTP

El marcaje radioactivo de la sonda se efectuó con el *rediprime*[®] II random prime labelling system, ampliando el tiempo de incubación a 2 horas.

VIII.4.3 Hibridación, lavados y revelado de la membrana

Se empleó una membrana comercial, el *Human 12-Lane MTN*[™] *Blot*, que contiene muestras de RNA de 12 tejidos humanos diferentes. La solución de hibridación fue la recomendada en el manual, *ExpressHyb Hybridization Solution*, y la hibridación y los lavados se realizaron siguiendo las instrucciones que se indican en el mismo. A continuación se expuso una película fotográfica a la membrana durante periodos de tiempo de entre 24 horas y 7 días a -70°C y, transcurrido el tiempo oportuno, se reveló la película.

VIII.5 Análisis de localización subcelular del gen *FLJ14503*

Para estudiar la localización subcelular de una proteína es necesario partir de la pauta de lectura completa de la misma. El siguiente esquema pretende dar una visión de conjunto para la mejor comprensión de los pasos realizados en la clonación de dicha pauta de lectura en diferentes vectores.

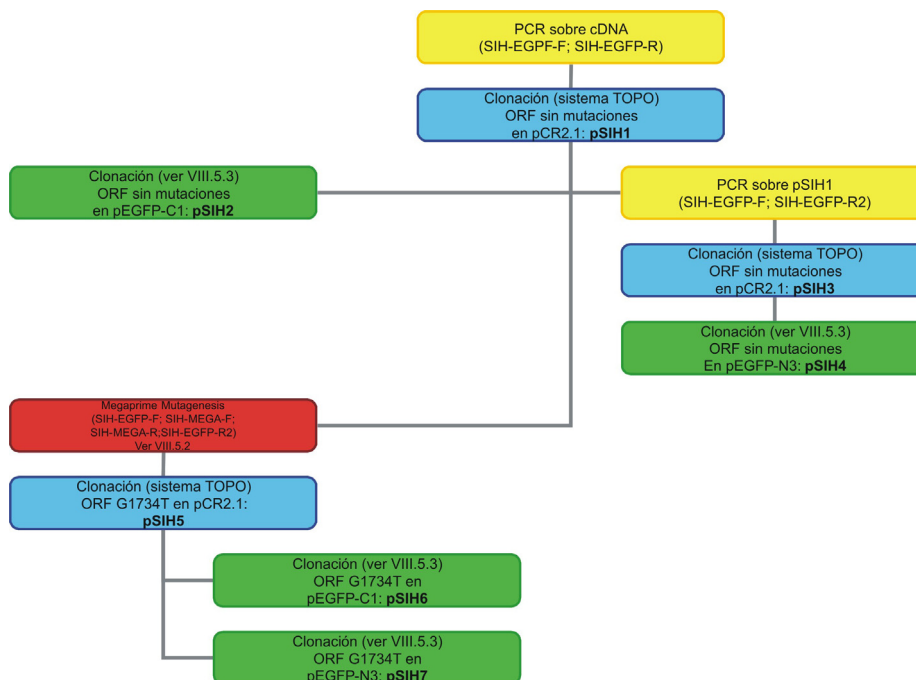


Fig. M2 (en la página anterior): Esquema de la generación de las diferentes construcciones de FLJ14503 para el análisis de su localización subcelular.

En amarillo aparece los pasos de PCR estándar, bien sea sobre cDNA o sobre clones, para amplificar la pauta de lectura completa de *FLJ14503*. En rojo se muestra el paso de *Megaprime Mutagenesis*, que comprende 3 reacciones de PCR (ver VIII.5.2). En ambos casos se indican los cebadores empleados. En azul se reflejan los pasos de clonación por el sistema TOPO de Invitrogen (ver VIII.2.5) y en verde los de clonación en los vectores pEGFP-C1 y pEGFP-N3.

VIII.5.1 Obtención de la pauta de lectura del gen *FLJ14503*

Para obtener la pauta de lectura completa del gen *FLJ14503*, se partió de cDNA de cerebro fetal humano generado por retrotranscripción a partir de RNA poli(A⁺) comercial. Esta reacción se llevó a cabo como sigue:

RNA poly(A ⁺) 100ng/μl	1 μl
Oligo dT (50pmol/μl)	2 μl
H ₂ O	7.5 μl

Se desnaturalizó la mezcla de RNA y cebadores durante 10' a 65°C, pasándolo después a hielo otros 5'. A continuación se añadió:

Expand Reverse Transcriptase Buffer 5x	4 μl
DTT (100 mM)	2 μl
dNTPs (10 mM)	2 μl
Rnase Inhibitor	0.5 μl
Expand Reverse Transcriptase	1 μl
Volumen total	20 μl

Esta mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 43°C.

Una vez obtenido el cDNA, y como muestra el esquema de la figura M2, se amplificó la región codificante de *FLJ14503* mediante PCR, usando cebadores que incluían las secuencias de corte de los enzimas *SacI* y *SacII* (ver tabla M19) y Expand High Fidelity como polimerasa. Los cebadores se diseñaron de manera que las regiones codificantes de *FLJ14503* y *GFP* quedaran en pauta para que se pudiera generar una proteína de fusión. El producto obtenido se cargó en un gel de agarosa al 0.8%, se cortó la banda de interés y se clonó en el vector pCR2.1 siguiendo el sistema TOPO (ver apartado VIII.2.6) e incubando la reacción 30' dado el elevado tamaño del fragmento a clonar. A partir de esta PCR se obtuvo el clon pSIH1 (ver fig. M2).

Para obtener la pauta de lectura del gen *FLJ14503* sin el codón de parada final y así poder generar fusiones con proteínas en su extremo C-terminal, se realizó una PCR sobre el clon pSIH1 con los cebadores SIH-EGFP-F y SIH-EGFP-R2 (ver tabla M19), empleando Pwo SuperYield DNA polimerasa. En este caso también se cortó la banda de un gel de agarosa y se clonó en pCR2.1 mediante el sistema TOPO. Dado que las polimerasas con actividad exonucleasa 3'→5' generan productos de PCR romos, para poder clonarlos mediante este sistema fue necesario añadir adeninas en los extremos. Para ello se incubó durante 15' a 72°C la siguiente mezcla de reacción:

Banda extraída	x μl
dATPs (10 mM)	0.5 μl
Tampón PCR 10X	1.25 μl
Polimerasa (Netzyme)	1 μl
H ₂ O	hasta 12,5 μl

La cantidad de DNA que se añade a la reacción depende del rendimiento, tanto de la amplificación por PCR, como de la extracción posterior a partir de la banda de agarosa.

VIII.5.2 Modificación de la pauta de lectura mediante *Megaprime Mutagenesis*

Al no disponer de cDNA de ningún paciente de la familia fELX20, hubo que generar el transcrito con el cambio G1734T a partir de un clon preexistente. Para ello, se introdujo dicho cambio en la secuencia clonada en pSIH 1 mediante *Megaprime Mutagenesis*.

La base de esta técnica es la amplificación por PCR unida al uso de cebadores que llevan el cambio que se desea incorporar a la secuencia. Se producen así 2 amplificados solapantes que se usan después al mismo tiempo como cebador y molde en los ciclos iniciales de una nueva PCR, a la que se añaden los cebadores externos tras 3 ó 4 ciclos. En la figura M3 se puede ver un esquema de la técnica:

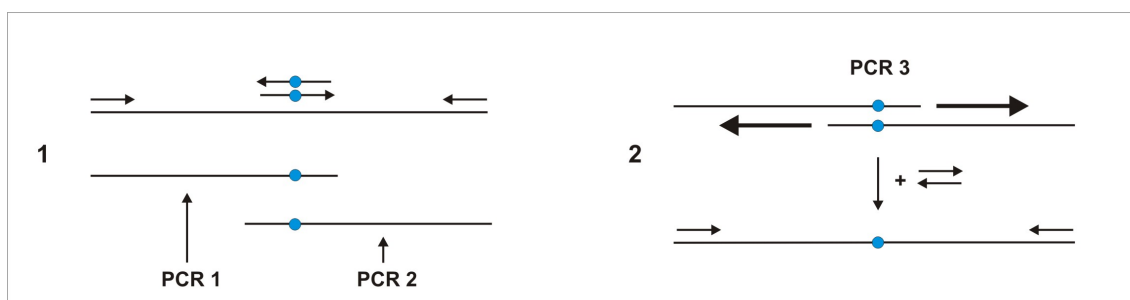


Fig. M3: Principio de la *Megaprime Mutagenesis*.

1. En primer lugar se deben diseñar cebadores que contengan el cambio que se desea introducir en la secuencia (representado aquí por un punto). Combinando estos cebadores con otros situados en los extremos del fragmento, se generan dos productos de PCR, cada uno con el cambio en un extremo. 2. Estos dos productos se combinan, permitiendo un par de ciclos de PCR para que sean elongados, tras lo cual se añaden los cebadores de los extremos, amplificando así un producto que contiene ya el cambio en la posición deseada.

Las dos primeras PCR se realizaron como se ha descrito en VIII.2.2, empleando como molde pSIH1 y los cebadores SIH-EGFP-F y SIH-MEGA-R para la PCR 1 y SIH-MEGA-F y SIH-EGFP-R2 para la PCR 2. La tercera PCR se llevó a cabo de la siguiente manera:

Producto PCR 1		1 μ l
Producto PCR 2		1 μ l
dNTPs (10 mM)		0.5 μ l
Tampón PCR 10X		2.5 μ l
Polimerasa		0.5 μ l
H ₂ O	hasta	25 μ l

Esta mezcla de reacción se sometió a 3 ciclos de PCR:

95°C	3'	
95°C	15''	} × 3
40°C	20''	
72°C	2'	

A continuación se añadió 1 μ l de los cebadores SIH-EGFP-F y SIH-EGFP-R2, y se completó la PCR con el programa:

95°C	3'	
95°C	15''	} × 20
55°C	10''	
72°C	2'	
72°C	10'	

Los productos así generados fueron cargados en geles de agarosa de 0.8% para cortar la banda de interés, que fue luego clonada en pCR2.1, tras añadirle adeninas en los extremos. Todos estos clones fueron comprobados por secuenciación antes de proseguir con la subclonación.

VIII.5.3 Subclonación de las pautas de lectura clonadas en pCR2.1 a pEGFP-C1 y pEGFP-N3

VIII.5.3.1 Digestión

Como se indica en el punto IV.12, los cebadores utilizados en la amplificación de la pauta de lectura de *FLJ14503* contenían secuencias diana para los enzimas de restricción (*SacI* y *SacII*). Dado que dichos enzimas presentan una efectividad de corte muy baja cuando su diana se encuentra en el extremo de un fragmento, la clonación de las pautas de lectura obtenidas por PCR en el vector pCR2.1 representó un paso intermedio destinado a facilitar la digestión posterior para la clonación en los vectores pEGFP-C1 y pEGFP-N3.

El primer paso en la subclonación fue digerir los fragmentos clonados en pCR2.1 y los vectores pEGFP con los enzimas de restricción adecuados. Estas digestiones se realizaron según el siguiente protocolo, incubándolas durante 2 horas a 37°C⁷:

Clon en pCR2.1	hasta 1 µg	Vector	hasta 1 µg
Tampón	2 µl	Tampón	2 µl
Enzima de restricción 1	1 µl	Enzima de restricción 1	1 µl
Enzima de restricción 2	1 µl	Enzima de restricción 2	1 µl
H ₂ O hasta	20 µl	H ₂ O hasta	20 µl

La totalidad de las digestiones se cargó después en un gel de agarosa al 0.8% y se cortaron las bandas de interés, eluyéndolas en 20 µl de H₂O.

VIII.5.3.2 Ligación

Una vez obtenidas las bandas se procedió a la ligación de las moléculas de vector e inserto. Para cada ligación, las cantidades de vector e inserto añadidas se determinaron cargando previamente 1µl de las bandas extraídas en un gel de agarosa para comprobar su concentración relativa. La mezcla de ligación fue:

Inserto	hasta 1 µg
Vector digerido	hasta 0.5 µg
Tampón para la ligasa T4 (10x)	1-2 µl
Ligasa T4	1 µl
H ₂ O hasta	10-20 µl

El volumen final de la reacción de ligación se determinó en función de las cantidades de vector e inserto empleadas, procurando mantenerlo siempre lo menor posible. Las reacciones se incubaron o/n a 14°C, almacenándolas después a -20°C hasta su uso en la transformación de bacterias competentes.

VIII.5.3.3 Transformación

Con estas reacciones de ligación se transformaron bacterias competentes de la cepa *E.coli* DH10B, preparadas según el método de Sambrook y Russell (2001). Para ello se descongelaron en hielo 200 µl de bacterias y se les añadió la totalidad de la ligación, manteniéndolas en hielo durante 30'. A continuación se las sometió a un choque térmico de 45''

⁷ En el caso de las digestiones con un único enzima de restricción, por ejemplo en la comprobación de cambios en las secuencias, el protocolo es básicamente el mismo, pero empleando 0.5 µl del enzima correspondiente en lugar de 1µl.

a 42°C, volviendo a colocarlas después en hielo durante 1' ó 2'. Por último, se les añadió 800 µl de LB en condiciones estériles y se incubaron en agitación durante 1 hora a 37°C. Estas bacterias se sembraron luego en placas preparadas con LB y kanamicina para seleccionar los clones bacterianos transformantes. Las placas se incubaron a 37°C o/n.

VIII.5.3.4 Cultivo de bacterias y extracción del DNA plasmídico

Al día siguiente, tras comprobar por PCR de colonia los clones positivos para el inserto, se sembraron dichos clones en 4 ml de LB con kanamicina, incubándolos o/n a 37°C con agitación. La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo con el *kit* High Pure Plasmid Isolation Kit, siguiendo las instrucciones del manual, pero con los siguientes cambios:

- se suprimió la incubación tras añadir el tampón de lisis
- una vez finalizados los lavados, se dejó secar al aire durante 5', añadiendo después 40 µl de H₂O_d (en lugar de 100 µl) e incubándolo 15'
- la centrifugación final se realizó durante 4' a 12.500 rpm

En los casos en que interesó obtener una mayor cantidad de plásmido, se usó el *Genopure Plasmid Midi ó Maxi Kit*. En estos casos también se partió de un mayor volumen de cultivo, generado a base de incorporar un precultivo de 4 ml, crecido durante varias horas a lo largo del día, a un volumen de entre 50 y 150 ml de LB con el antibiótico correspondiente para su incubación o/n.

La comprobación del DNA plasmídico obtenido se realizó por digestión de 1 ó 2 µl, como se ha descrito en el apartado VIII.5.3.1.

VIII.5.4 Transfección de los clones pEGFP-C1 y pEGFP-N3 en células eucariotas.

Las células CHO-K1 se mantuvieron en cultivo a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ en el Servicio de cultivos celulares de la Universidad de Valencia. Para transfectarlas se usó el reactivo FuGENE 6 de Roche. Los pasos seguidos fueron:

Día 1:

- Depositar sobre varios cubreobjetos colocados en el fondo de los pocillos de una placa de 24 pocillos, 0.5 × 10⁵ células, en medio sin antibióticos.
- Incubar hasta el día siguiente a 37°C.

Día 2:

- Para cada pocillo, añadir 97 µl de medio sin suero ni antibióticos a un tubo de 1,5 ml y 3 µl de FuGENE 6 atemperado directamente en el medio, cuidando de no tocar las paredes del tubo.
- Mezclar e incubar durante 5 min a temperatura ambiente.
- Añadir 1 µg del plásmido a transfectar, mezclar e incubar durante 15 min a temperatura ambiente.
- Añadir esta mezcla gota a gota a las células, agitando suave pero continuamente para que se mezcle bien.

Día 3:

- Análisis de las células transfectadas. En su forma más simple, consiste en fijar las células con paraformaldehído, lavar y montar sobre un portaobjetos (se llevan a cabo los tres primeros pasos de la inmunofluorescencia descrita en VIII.5.5, pero con 3 lavados en PBS antes del montaje). Sin embargo, si se quiere marcar alguna estructura celular, puede llevarse a cabo con anticuerpos específicos (inmunofluorescencia, ver VIII.5.5).

VIII.5.5 Inmunofluorescencia.

Cuando se quiere determinar la localización subcelular de una nueva proteína, puede ser necesario marcar alguna estructura celular con anticuerpos específicos, para así complementar la información obtenida con la GFP fusionada a dicha proteína. En este caso fue

necesaria una tinción de microtúbulos, para lo que se empleó un anticuerpo anti- α -tubulina. El procedimiento seguido fue el siguiente:

- Lavado rápido de las células con PBS +/-
- Fijación durante 10 min con una disolución de paraformaldehído al 4% en PBS
- 2 lavados de 10 min cada uno con PBS +/-
- Incubación durante 5 min en Tritón-X-100 al 0,2% en PBS para permeabilizar las células y permitir la entrada de los anticuerpos
- 1 lavado de 10 min en PBS +/-
- Incubación durante un mínimo de 30 min en 1% BSA en PBS +/- para bloquear uniones inespecíficas del anticuerpo
- Incubación durante 1 hora con el anticuerpo primario diluido en 1% BSA en PBS +/-
- 3 lavados de 5 min cada uno con PBS +/-
- Incubación de 45 min con el anticuerpo secundario diluido en 1% BSA en PBS +/-
- 3 lavados de 10 min cada uno con PBS +/-
- Lavado rápido con H₂O y montaje sobre un portaobjetos con Mowiol

Debe dejarse secar la preparación hasta el día siguiente antes de visualizarla al microscopio.

VIII.6 Análisis por *Southern blot* de la mutación identificada en el paciente con Síndrome de Coffin-Lowry

VIII.6.1 Obtención de la membrana

Para comprobar si un paciente ha sufrido una reordenación en su DNA, por ejemplo una inserción o una delección, se puede realizar un análisis de *Southern blot*. En este caso se digirió DNA de los cuatro miembros de la familia fELX72 con el enzima *EcoRI*, corriéndolo a continuación en un gel de agarosa al 0.8% durante 16 horas a 35V. Tras comprobar que la digestión se había producido, el gel se usó para una transferencia tipo *Southern*, siguiendo el protocolo descrito en Sambrook y Russell (2001).

VIII.6.2 Marcaje de la sonda

Se empleó el marcaje con Digoxigenina-11-dUTP. Para ello se amplificó, por PCR, el fragmento que funcionará como sonda y se comprobó en un gel de agarosa. A continuación, y sobre una dilución 1/100 del producto, se llevó a cabo una reamplificación por PCR, con menos ciclos y con Dig-11-dUTP. La sonda puede consultarse en la tabla M53.

VIII.6.3 Hibridación, lavados y detección

Para la hibridación, los lavados y la detección de la membrana se siguieron los protocolos recomendados por Roche para las sondas de DNA marcadas con digoxigenina descritos en *The DIG System User's guide for filter hybridization*, Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica (1993), y Sambrook y Russell (2001). El tampón de hibridación usado fue el estándar con formamida.

RESULTADOS

RESULTADOS

En este trabajo se ha abordado el estudio de diversas familias, todas ellas con miembros afectados de RMLX, pero con diferente sintomatología. Tres de las familias presentan formas sindrómicas: Síndrome de Coffin-Lowry, Síndrome de Lenz y Síndrome de Prieto, respectivamente, mientras que el resto presenta retraso mental inespecífico. Respecto a la localización cromosómica de las regiones candidatas a albergar el gen responsable, son tres las regiones que se han estudiado: Xp22, Xp11.4 y Xq24-q25. Así, aparecen casos en que para una misma sintomatología (MRX) se han estudiado regiones diferentes en familias diferentes (Xp22 y Xq24-q25), y otros en que para sintomatologías distintas (S. de Lenz y S. de Prieto) se ha estudiado una misma zona (Xp11.4), por coincidir las regiones de ligamiento.

Dada esta diversidad de resultados, esta sección se ha estructurado según las características clínicas de los pacientes, incorporando además un criterio de localización física sobre el cromosoma (Xpter. → Xqter.). De este modo aparecen tres apartados principales: Retraso Mental Inespecífico, Síndrome de Coffin-Lowry y Síndromes de Prieto y Lenz, con una subdivisión por regiones en el primero de ellos.

I. Retraso Mental Inespecífico

I.1. Región Xp22

I.1.1 Definición de la región de ligamiento en la familia fELX2

La región estudiada en Xp22 se basa en los resultados del análisis de ligamiento efectuado en la familia fELX2, por quedar así definido el intervalo de menor tamaño en el que se espera identificar un gen responsable de MRX. Sin embargo, dicho análisis se ha llevado a cabo sobre miembros de seis familias diferentes:

- cuatro familias españolas: fELX2, fELX17, fELX18 y fELX20
- dos cedidas por el Dr. Schwartz (K8943 y K8944),

ya que en todas ellas la región candidata a albergar el gen responsable de MRX incluye en su totalidad la región definida por fELX2 (Fig. R1).

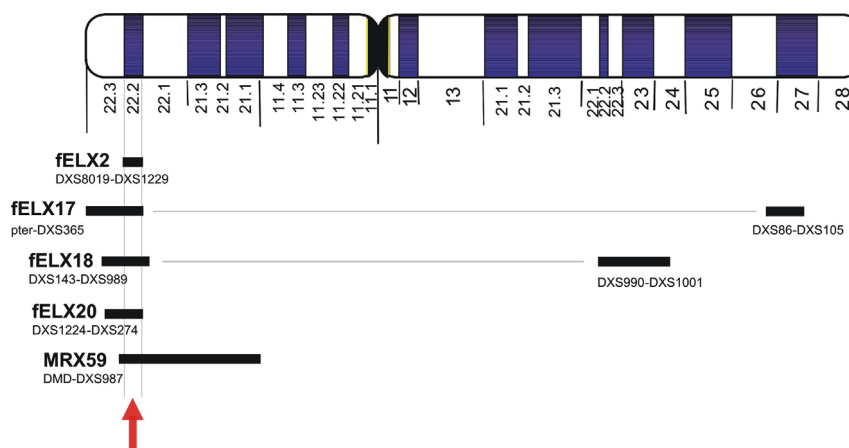


Fig. R1: Regiones de ligamiento de las familias fELX2, fELX17, fELX18 y fELX20.

Las regiones candidatas para las diferentes familias aparecen como líneas horizontales gruesas en negro. Si una familia muestra ligamiento en más de una región, una línea horizontal gris las conecta. El intervalo de menor tamaño lo define fELX2, y dicho intervalo está incluido en las regiones candidatas de fELX17, fELX18, fELX20 y MRX59, como indica la flecha roja. Para K8944 no se dispone de datos de ligamiento.

Esta región fue definida previamente por los marcadores DXS8019 y DXS365 (Martínez *et al.*, 2001). Actualmente, tras la caracterización de nuevos marcadores en la Unidad de Genética de La Fe, la región candidata está definida por los marcadores DXS8019 y DXS1229, por lo que el intervalo se pudo reducir de 3,91 Mb a 2,82 Mb en Xp22.2.

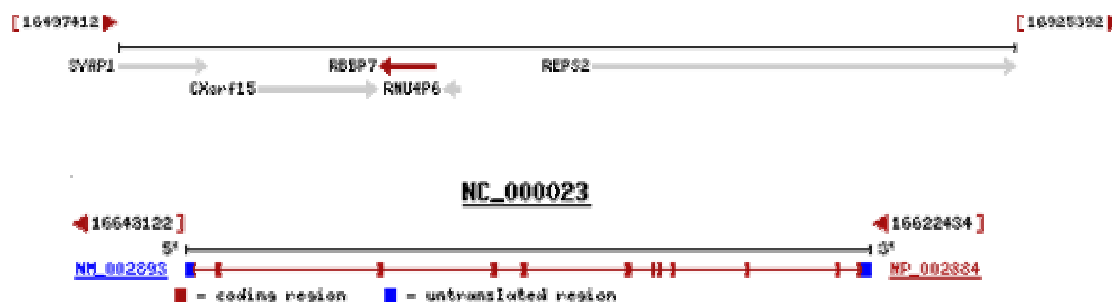
Como en esta región se localiza el gen *RPS6KA3* (*RSK2*), responsable del síndrome de Coffin-Lowry y de algunas formas de retraso mental inespecífico, su análisis y posterior exclusión fueron necesarios antes de poder asignar un número MRX a la familia fELX2.

Dado que este trabajo se inició antes de la publicación de la primera versión del genoma humano en el año 2001, y que tras dicha publicación se han ido corrigiendo varios errores en la posición de los *contigs* genómicos, el intervalo objeto de estudio en estas familias ha ido variando en tamaño y en genes, hasta la versión definitiva que se presenta aquí. Por dicho motivo se consideró el análisis de dos genes adicionales, *RBBP7* y *REPS2*, distales a la región candidata, que en un principio se localizaban en ella y que después se mantuvieron en el análisis dado que sólo podían ser excluidos en fELX2 y no así en el resto de familias que cartografiaban en Xp22.

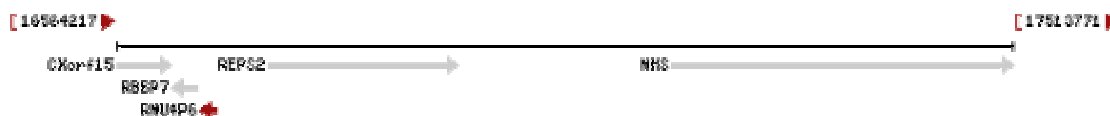
I.1.2 Identificación de los genes comprendidos en el intervalo *RBBP7* - DXS1229

Mediante búsquedas en bases de datos se han identificado, en este intervalo, un total de 19 genes y un pseudogen. A continuación se detallan, siguiendo el orden Xpter.→Xqter., e indicando brevemente sus características principales y las razones por las cuales han sido considerados para el análisis de mutaciones o, por el contrario, excluidos del mismo. En la descripción de cada gen se han incluido dos esquemas, obtenidos de la página correspondiente de la base de datos *Entrez-Gene*: en el primero de ellos se representa el entorno cromosómico del gen y en el segundo su estructura genómica.

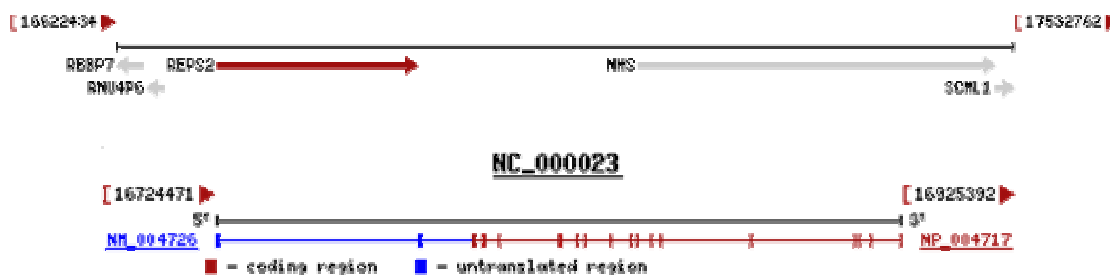
RBBP7 (*Retinoblastoma-binding protein 7*): también llamado *Rbap46*, codifica una proteína nuclear de expresión ubicua que se une a la proteína pRB (Qian *et al.*, 1995). Presenta dominios WD, que reciben este nombre porque están formados por unidades repetitivas que generalmente terminan en Trp-Asp (WD) y aparecen en proteínas relacionadas con numerosas funciones celulares: división celular, transcripción, modificación de RNAs, fusión de vesículas, etc. Se trata de una proteína muy conservada evolutivamente, que forma parte de complejos proteicos con actividad histona deacetilasa (Zhang *et al.*, 1997 y 1998) y que actúa también como inhibidor del crecimiento celular (Guan *et al.*, 1998). Este gen ha sido analizado en los pacientes mediante la técnica de SSCPs, secuenciando todas aquellas muestras que presentaran un patrón electroforético diferente a los controles. En concreto, de los 12 exones que posee este gen, se han secuenciado los exones 1, 3, 4, 7, 8, 11 y 12 en todos los pacientes. En la familia fELX2 se han secuenciado además los exones 2, 5 y 9.



RNU4P6: Se trata del pseudogen 6 del snRNA U4, como se describe en Bark *et al.* (1985). Por tratarse de un pseudogen y estar localizado fuera de la zona de ligamiento definida para fELX2, no ha sido analizado en los pacientes.



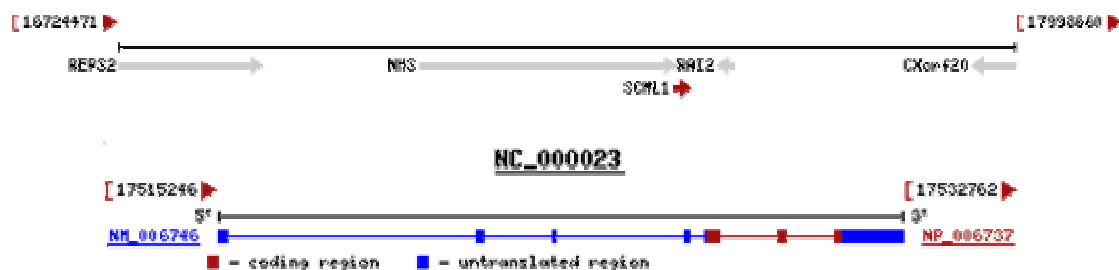
REPS2 (*RalBP1 associated Eps domain containing 2*): también llamado *POB1*. La proteína que codifica interacciona con el efector de Ral, RalBP1, con la proteína adaptadora Grb2 y con el receptor EGF (Ikeda *et al.*, 1998). Es un gen candidato muy interesante, puesto que Ral está localizado en vesículas sinápticas en neuronas y RalBP1 presenta además actividad GAP frente a Rac y CDC42, que controlan la dinámica del citoesqueleto de actina. Este gen también ha sido analizado en los pacientes mediante SSCPs y secuenciación. En el paciente de la familia fELX2 se ha secuenciado el gen en su totalidad, mientras que en el resto de familias se han secuenciado los exones 4, 7, 8, 10, 13 y 16, y en fELX17 también los exones 14, 15 y 17.



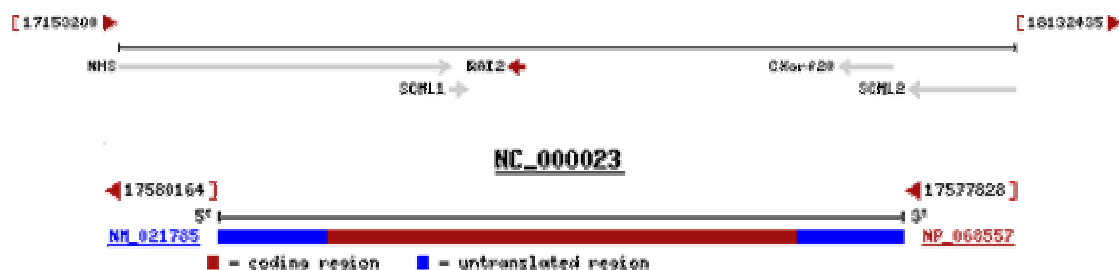
NHS (*Nance Horan Syndrome*): este gen ha sido descrito recientemente como causante del síndrome de Nance Horan (Burdon *et al.*, 2003), que se caracteriza por anomalías oculares y dentales. Codifica una proteína de función desconocida que se expresa en varios tejidos, entre ellos el cerebro. Entre los síntomas de este síndrome aparece, en un 30% de los casos, retraso mental (Walpole *et al.*, 1990; Toutain *et al.*, 1997) por lo que, teniendo en cuenta que varios genes responsables de síndromes lo son a su vez de retraso mental inespecífico, se ha considerado como un candidato, pero cuyo análisis no se presenta en este trabajo.



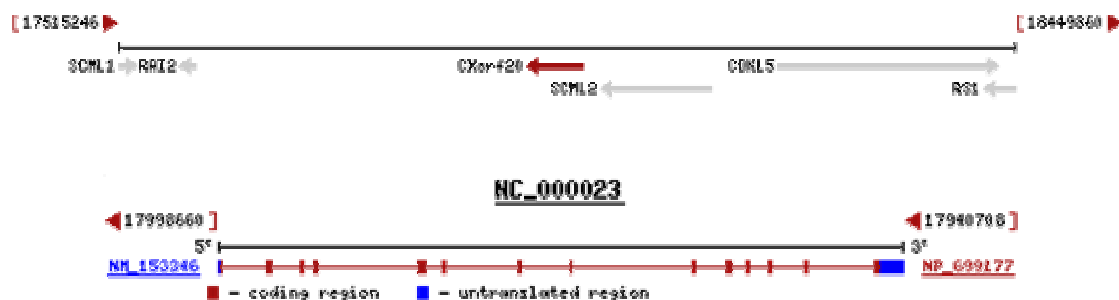
SCML1 (*sex comb on midleg-like 1*): este gen codifica una proteína de 208 aminoácidos que presenta similitud de secuencia con la proteína del gen *Scm* (*sex comb on midleg*) de *D. melanogaster*, perteneciente al grupo de genes *polycomb* (PcG), y con otras proteínas de este grupo (Van de Vosse *et al.*, 1998). Los genes PcG codifican represores transcripcionales de los genes homeóticos, por lo que son necesarios para un correcto desarrollo. El análisis de este gen en los pacientes se ha realizado mediante secuenciación de cada uno de sus exones.



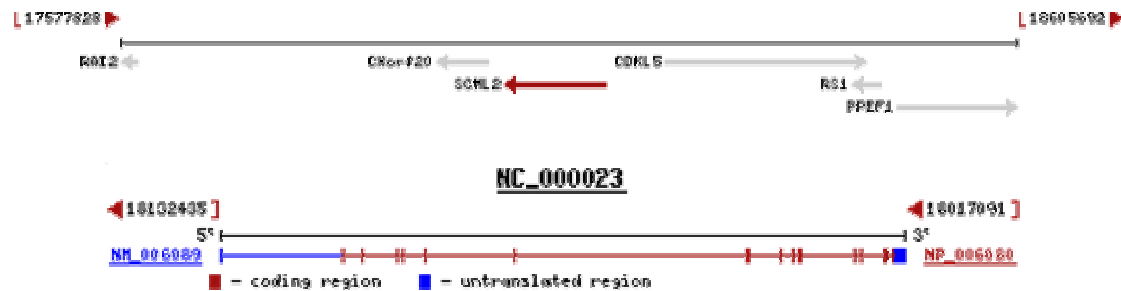
RAI2 (*retinoic acid-induced 2*): la proteína codificada es la homóloga a la proteína MM3f8R de ratón (Jonk *et al.*, 1994), cuya expresión es inducida por el ácido retinoico, sustancia que juega un papel muy importante en el desarrollo de vertebrados, influyendo en el crecimiento celular y la diferenciación. En el caso de *RAI2*, se cree que la inducción estaría mediada por un elemento secundario de respuesta, el factor de transcripción AP-2 (Walpole *et al.*, 1999). Este gen, formado por un único exón, se ha secuenciado en todos los pacientes.



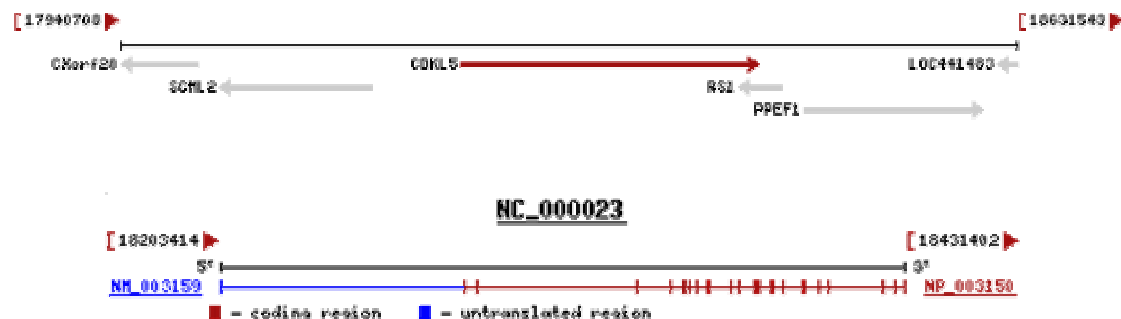
CXorf20: gen predicho en Xp22, avalado por dos clones de cDNA que contienen en su totalidad la pauta abierta de lectura: IMAGE4827886 y TESTI4029743. El análisis de este gen se ha realizado mediante secuenciación de sus 14 exones.



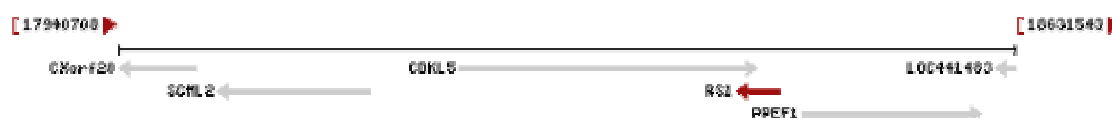
SCML2 (*sex comb on midleg-like 2*): codifica otra proteína homóloga a SCM y, por tanto, a SCML1. Sin embargo, en este caso la homología incluye no sólo al dominio SPM, como ocurre en SCML1, sino a dos dominios mbt en la parte N-terminal de la proteína (Montini *et al.*, 1999). El dominio mbt sólo se ha identificado, hasta el momento, en las proteínas de los genes *Scm* y *letal(3) malignant brain tumor*, ambas en *D. melanogaster*, siendo SCML2 la primera proteína de mamífero en que se describe su presencia. Este gen ha sido analizado en los pacientes mediante SSCPs y secuenciación. En fELX2 se han secuenciado todos los exones, mientras que en el resto de familias se han secuenciado los exones 1, 2, 4, 6, 8 y 9. En fELX17 se ha secuenciado, además, el exón 13.



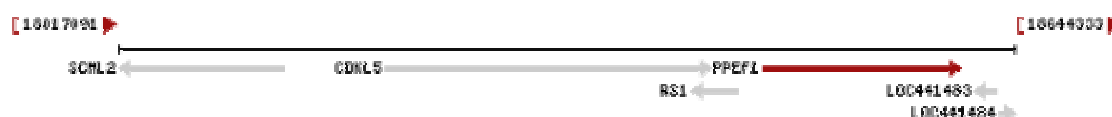
CDKL5 (*Cyclin-dependent kinase-like 5*): también llamado *STK9*. Este gen codifica una serín-treonín quinasa que se expresa en diversos tejidos, incluyendo el cerebro (Montini *et al.*, 1998). La función de esta proteína se desconoce, pero por las homologías que presenta con otras protein-quinasa podría pertenecer a la familia de las MAP quinasa, que son reguladores importantes de la plasticidad sináptica en las neuronas. Se han descrito dos pacientes con translocaciones X-autosoma, en los que este gen se encuentra interrumpido, y que presentan formas severas de ISSX (espasmos del lactante ligados al X) y retraso mental profundo (Kalscheuer *et al.*, 2003). Recientemente, se han hallado además dos mutaciones que alteran la pauta de lectura en dos pacientes afectadas por una variante del Síndrome de Rett, que cursa con espasmos del lactante (Scala *et al.*, 2005). Esto, unido al hecho de que otra serín-treonín quinasa (RPS6KA3) sea responsable de formas sindrómicas e inespecíficas de retraso mental, hacen de este gen un buen candidato. La búsqueda de mutaciones se ha realizado mediante secuenciación de todos los exones.



RS1 (*retinoschisis (X-linked, juvenile) 1*): codifica una proteína de 224 aminoácidos, denominada retinosquisina, que cuando está mutada provoca la retinosquisis juvenil ligada al cromosoma X (Sauer *et al.*, 1997). La proteína posee un péptido señal de 23 aminoácidos y es secretada por los fotorreceptores de la retina, que son las células que la producen (Grayson *et al.*, 2000). El único dominio funcional que se le conoce es un dominio discoidina, que aparece en otras proteínas de las que se piensa que pueden estar implicadas en interacciones intercelulares. Sin embargo, la función de la retinosquisina no se ha caracterizado todavía. Este gen no ha sido analizado en el presente trabajo, puesto que los pacientes afectados de retinosquisis juvenil ligada al cromosoma X no presentan retraso mental.



PPEF1 (*Protein Phosphatase with EF calcium-binding domain*): codifica una serín-treonín fosfatasa con un alto grado de similitud de secuencia con la codificada por *rdgC* (*retinal degeneration gene C*) de *D. melanogaster* (Montini *et al.*, 1997). Se trata de la única familia descrita de protein fosfatasas que presenta, además, un dominio de unión a iones calcio. Este gen no ha sido considerado en este trabajo, ya que se ha descrito una deleción de 136 kb, en tres pacientes afectados de retinosquisis, que elimina los exones 1-9 del gen y su zona promotora (Huopaniemi *et al.*, 2000). La deleción abarca también los exones 1-3 del gen *RS1* y el último exón de *STK9*, pero a pesar de ello, dos de los pacientes sólo presentan síntomas de retinosquisis y el tercero una hemiplejía leve, epilepsia y una cicatriz en un hemisferio cerebral.



PHKA2 (*phosphorylase kinase, alpha 2 (liver)*): la proteína codificada por este gen es la subunidad α de la fosforilasa quinasa de hígado (PHK). Mutaciones en este gen provocan dos formas de glucogenosis hepática ligada al X: la tipo I y la tipo II, que se diferencian porque los pacientes de tipo II muestran una actividad normal de PHK *in vitro*, cosa que no ocurre en los de tipo I (Hendrickx *et al.*, 1995 y 1996, Berg *et al.*, 1995). Este gen tampoco se ha analizado en la serie de nuestros pacientes, dado que en la sintomatología de esta enfermedad no aparece el retraso mental.



GPR64 (*G-Protein coupled receptor 64*): también llamado *HE 6*, codifica un receptor de membrana acoplado a proteína G específico de epidídimo (Osterhoff *et al.*, 1997) Debido a esta distribución tisular tan restringida, no se ha considerado este gen en el análisis de mutaciones.



PDHA1 (*pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1*): codifica la subunidad E1 del complejo mitocondrial piruvato deshidrogenasa (Dahl *et al.*, 1987; Koike *et al.*, 1988; de Meirleir *et al.*, 1988). Defectos en este gen provocan acidosis láctica primaria (Endo *et al.*, 1989), por lo que se ha descartado en este trabajo como candidato en el análisis de mutaciones, ya que ninguno de los pacientes presenta este síntoma.



MAP3K15: se trata de una predicción, confirmada por la existencia del clon de cDNA TESTI4031745 (número de acceso AK131477). También parece confirmar esta predicción el hecho de que en ratón aparezca una secuencia con un 85% de similitud a nivel de aminoácidos (XP486812). Codificaría una proteína de función desconocida que presenta una identidad a nivel proteico del 59% con la proteína MAP kinasa kinasa kinasa 5 (MAP3K5) humana.



La organización genómica de este gen ha ido variando en el tiempo y la versión actual de 23 de abril de 2005, en el Genbank, incluye dos exones (exones 10 y 13, respectivamente) algo controvertidos: uno de ellos rompe la pauta de lectura y provoca que el codón de inicio de la proteína se sitúe en el exón 11; mientras que el otro corresponde a un fragmento de un elemento Alu. Asimismo, los exones 1 y 2 de esta predicción no presentan ninguna similitud a nivel proteico ni con la proteína de ratón (XP_486812) ni con MAP3K5. Por ello, se decidió realizar un análisis de la secuencia de aminoácidos de XP486812 y MAP3K5 empleando el programa tblastn para alinearlas con los clones genómicos de la región. De esta forma se han

podido predecir dos nuevos exones en la región 5' del gen, que sustituirían a los dos primeros exones descritos en la base de datos, en concreto entre las bases 114909-114993 y 88836-88975 de la secuencia genómica AL732423, perteneciente al clon RP11-345L8. A continuación se muestra el alineamiento.

```

Score = 78.2 bits (191), Expect = 6e-12
Identities = 60/143 (41%), Positives = 68/143 (46%), Gaps = 15/143 (10%)
Frame = -1

Query: 37      PNRAEPCNPRLGRRPGWGRGAG--EPAGG-----ALGVAAPRLSAAPPPPVLTSPPPLS 89
              P+ ++P      L  RPG GR  G  E  GG      ALG A+      PPP V  +  P
Sbjct: 115326  PSGSQP----LATRPGEGRAGGHMESGGNAPAGALGAASESPQCPPPPGVEGAAGPAEP 115159

Query: 90      RGLSKGARGKPAL--SSAPPAAGEPVVTCPPRPLRPPPAPAP-----CGRRPSSAEGAH 141
              G ++GA G      S  P      V      +  A  P      C  R  AEGAH
Sbjct: 115158  DGAAEGAAGSGEGESGGGPRRALRAVYVRSESSQGAAGGPEAGARQCLLRACEAEGAH 114979

Query: 142     LTSVFPFGE LDFGETAVLDAFYDA 164
              LTSVFPFGE LDFGETAVLDAFYDA
Sbjct: 114978  LTSVFPFGE LDFGETAVLDAFYDA 114910

Score = 96.7 bits (239), Expect = 2e-17
Identities = 46/53 (86%), Positives = 51/53 (95%)
Frame = -2

Query: 160     AFYDADVAIVDMSDISRQPSLFYHLGVRESFDMANNVILYD TDADTALS LKV 212
              + + ADVA+VDMSD+SRQPSLFYHLGVRESFDMANNVILY+DTDADTALS LKV
Sbjct: 88991   SLFIADVAVVDMSDVSRQPSLFYHLGVRESFDMANNVILYHDTADTALS LKV 88833

```

Fig. R2: Alineamientos entre la secuencia similar a *MAP3K15* predicha en ratón y el clon genómico que contiene el extremo 5' de la secuencia humana.

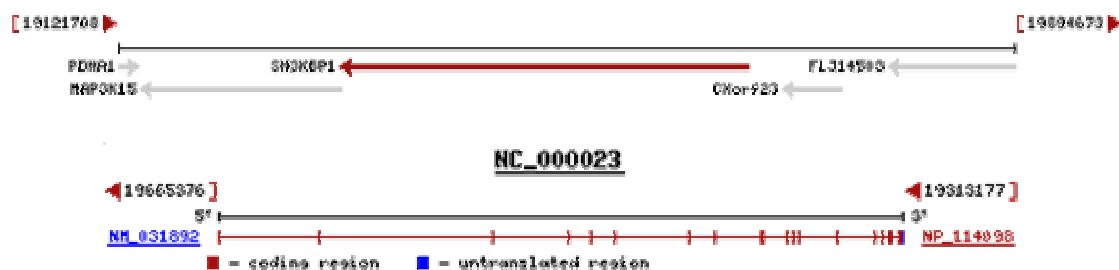
Para generar estos resultados se empleó la herramienta bl2seq, que permite alinear dos secuencias entre sí, con el programa tblastn, que compara una secuencia proteica con una nucleotídica traducida en sus 6 posibles pautas. Las secuencias introducidas fueron XP_486812.1 -secuencia de la proteína de ratón- y AL732423 -secuencia del clon genómico que contiene el extremo 5' de *MAP3K15*-. Por tanto, los números en la fila superior corresponden a aminoácidos y los de la inferior a nucleótidos.

Para la delimitación del que sería el primer exón de *MAP3K15*, se ha considerado únicamente la zona de similitud de secuencia con ratón, es decir, la posición 114993 del clon AL732423 (ver figura R2). Es posible que la secuencia proteica esté incompleta en su extremo 5', ya que tanto la proteína murina, como el resto de proteínas que muestran similitud de secuencia con *MAP3K15*, son más extensas en esa dirección. Hay que destacar aquí que, con fecha 16 de abril de 2004, se ha incorporado una nueva secuencia al GenBank, con número de acceso CAI40279, que no sólo confirma los dos exones identificados en este trabajo, sino que prolonga el exón 1 hasta la posición 115333 del clon AL732423, a pesar de la drástica disminución en similitud de secuencia, tanto con la proteína de ratón, como con *MAP3K5*.

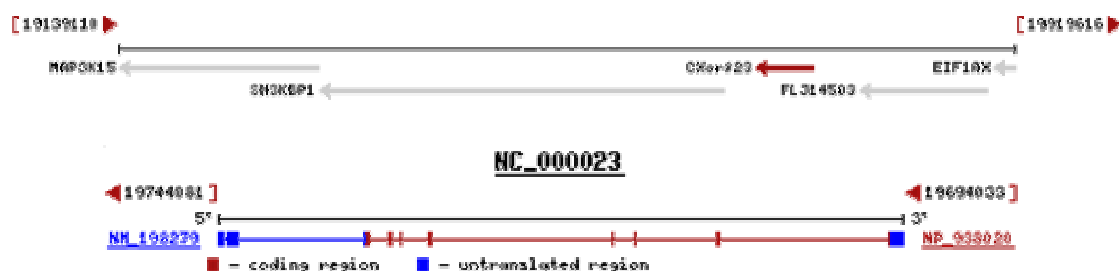
La secuencia de referencia actual para *MAP3K15* consta de 4695 pb y su pauta de lectura daría lugar a una proteína de 788 aminoácidos, situándose el codón de inicio en la posición 1636. No obstante, sustituyendo los dos primeros exones de la secuencia de la base de datos por los dos ahora descritos, y eliminando también los exones 10 y 13, se generaría un transcrito de 4335 pb, con el codón de inicio en la posición 103 y que codificaría una proteína de 1179 aminoácidos.

En el análisis de mutaciones, realizado mediante secuenciación, se han incluido tanto los dos nuevos exones identificados por similitud de secuencia, como el exón que rompe la pauta de lectura, para así minimizar la posibilidad de pasar por alto algún fragmento codificante. El exón de secuencia idéntica a un elemento Alu no se ha considerado en este análisis.

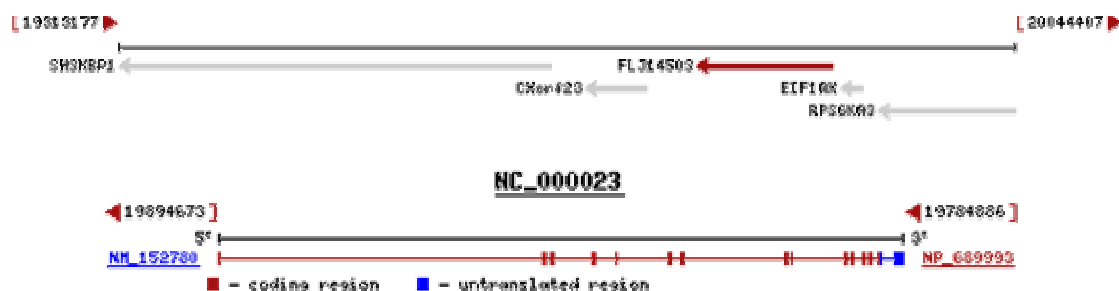
SH3KBP1(*SH3-domain kinase binding protein 1*): también llamado *CIN85*. La proteína codificada por este gen interactúa con c-Cbl, la equivalente celular a la codificada por el protooncogen *v-Cbl* (Take *et al.*, 2000) y con BLNK, así como con otra serie de factores relacionados con las vías de c-Cbl y Sos1 (Watanabe *et al.*, 2000). Presenta tres dominios SH3 y se trata de una proteína adaptadora que forma diversos complejos de señalización. Interviene en procesos de endocitosis, regulando el tráfico de receptores EGFR (revisado en Kowanetz *et al.*, 2004). Los exones de este gen se han secuenciado en todos los pacientes.



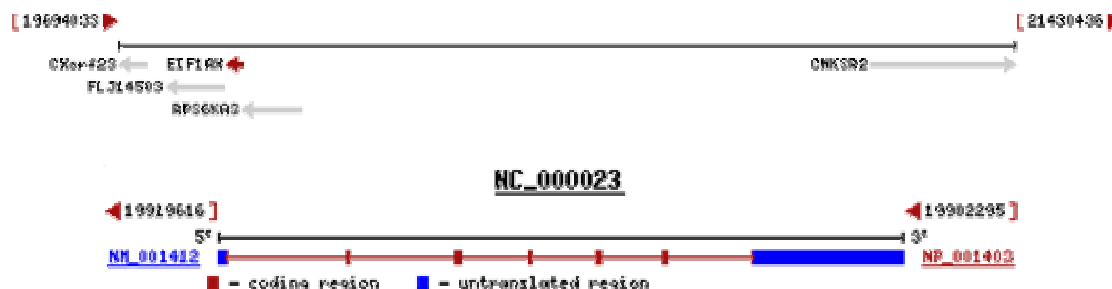
CXorf23: gen predicho en Xp22, avalado por tres clones de cDNA que contienen la pauta abierta de lectura en su totalidad: NT2RP7014178, DKFZp4516098 y BRAMY2021040, con una escasa similitud de secuencia con el RNA mensajero del componente TRAP150 del complejo proteico asociado al receptor de la hormona tiroidea. El análisis de este gen se ha llevado a cabo mediante secuenciación de sus exones.



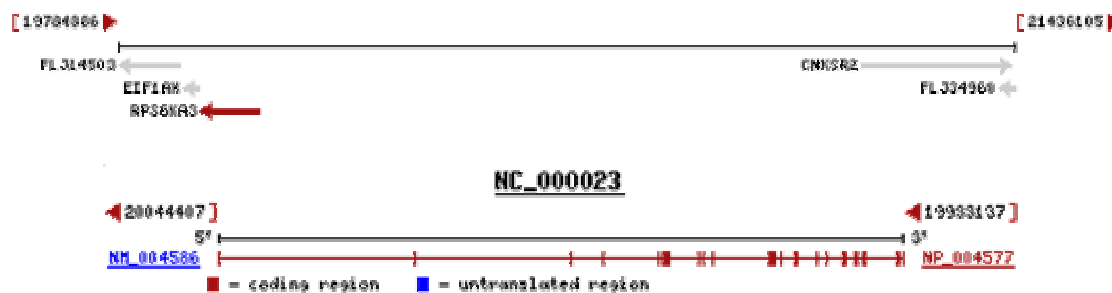
FLJ14503: gen predicho en Xp22, avalado por tres clones de cDNA que contienen la pauta abierta de lectura en su totalidad: NT2RM1000252, CBR04408 y BRAWH3034743. La proteína potencialmente codificada por este gen presenta homología a MAP-7 (*microtubule-associated protein 7*). Esta predicción se ha confirmado durante la realización de este trabajo, ya que se ha podido amplificar la región codificante completa a partir de cDNA obtenido por retrotranscripción de RNA poli(A⁺) de cerebro fetal (ver I.1.4). Respecto a la secuencia del GenBank, en este trabajo se ha analizado un exón adicional, identificado a través de la base de datos Aceview. Este exón se sitúa físicamente entre los exones 4 y 5 de la secuencia de referencia NM_152780.2. Los exones de este gen se han secuenciado en todos los pacientes.



EIF1AX (*eukaryotic translation initiation factor 1A*): codifica el factor 1A de inicio de la traducción en eucariotas (Benne *et al.*, 1978; Dever *et al.*, 1994). Su función parece ser la de catalizar la transferencia del complejo ternario tRNA_f-eIF2-GTP a la subunidad ribosómica 40S (Chaudhuri *et al.*, 1997). El análisis de este gen se ha llevado a cabo mediante secuenciación de sus exones.



RPS6KA3 (*Ribosomal Protein S6 Kinase polypeptide 3*): como ya se ha comentado en la introducción, este gen codifica una serin-treonin quinasa responsable del síndrome de Coffin-Lowry y de algunas formas de MRX. Su análisis era, por tanto, imprescindible antes de comenzar a estudiar el resto de la región. Dicho análisis se realizó amplificando y secuenciando los exones en los pacientes, salvo en las dos familias cedidas por el Dr. Schwartz (ver también el apartado II).



En resumen, de los 19 genes contenidos en la región candidata Xp22, 13 han sido analizados en este trabajo, uno está en proyecto y 5 han podido ser descartados por su implicación en otras enfermedades o por presentar un patrón de expresión demasiado específico. En la siguiente figura se muestra la totalidad de la zona analizada, que comprende 2,82 Mb, así como los genes que contiene.

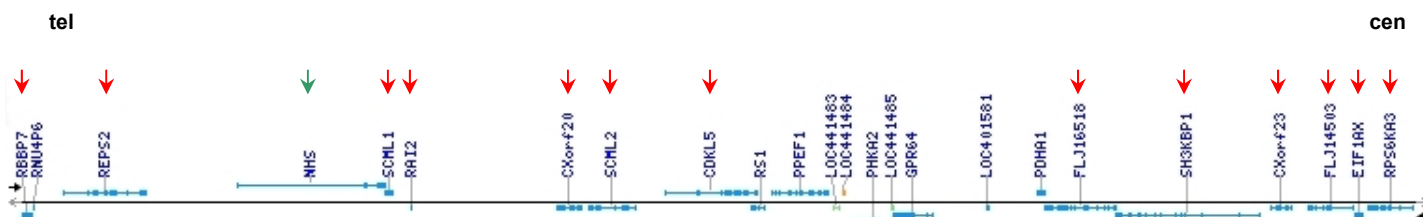


Fig. R3: Mapa de genes de la región analizada en Xp22.2.

Este mapa se ha obtenido con el programa MapViewer. Los genes aparecen a un lado u otro de la línea central, que representa el cromosoma X, según se transcriban en dirección Xpter.→Xqter. o viceversa. Las flechas rojas señalan aquellos genes que han sido analizados en este trabajo, y la verde indica qué gen se prevé analizar en un futuro.

Aparte de los genes que acabamos de describir, se incluyen en la zona 4 predicciones de posibles genes, efectuadas por programas bioinformáticos: *LOC441483*, *LOC441484*, *LOC441485* y *LOC401581*. Dado que hasta el momento no han sido confirmadas tales predicciones, además de no haberse descrito ningún EST para dichas secuencias, no hemos llevado a cabo su análisis en el presente trabajo.

I.1.3 Búsqueda de mutaciones

Los resultados de la búsqueda de mutaciones en los genes descritos en el apartado anterior se presentan en forma de tabla (Tabla R1) para una mayor claridad. Las posiciones de los cambios se indican siempre respecto al codón de inicio de la secuencia de referencia, considerando la A del ATG como posición +1. Dado que el análisis de mutaciones se llevó a cabo sobre DNA genómico de los pacientes, se han incluido también en la tabla los cambios identificados en las secuencias intrónicas flanqueantes.

Como puede observarse, en la mayoría de casos las variantes identificadas aparecen en las bases de datos, bien como polimorfismos en dbSNP, o bien al realizar un análisis con el programa BLAST, pudiéndose descartar, por tanto, como mutaciones patológicas. De los 5 cambios no compartidos por ninguna secuencia de las bases de datos, sólo uno se localiza en la región codificante del gen: se trata de la variante c.1734G>T (Lys578Asn) en el gen *FLJ14503*. La presencia de este cambio fue analizada mediante SSCPs en 178 muestras procedentes de individuos no afectados de retraso mental, no pudiendo ser identificada en ninguno de ellos. Se llevó a cabo, por tanto, un estudio detallado de este gen, cuyos resultados se recogen en el apartado siguiente (I.1.4).

Respecto a los 4 cambios restantes, identificados en regiones no codificantes, pero ausentes en las secuencias de las bases de datos, los dos hallados en la región 5' no traducida de *RBBP7* pueden descartarse como patológicos. Esto es debido a que aparecen en la familia MRX73, que en este caso puede considerarse como control, puesto que el gen en cuestión se localiza fuera de su región de ligamiento. El cambio c.1139-34G>A en el gen *SH3KBP1* fue identificado en un individuo control, pudiéndose descartar así también.

Quedaría, por tanto, un cambio que sólo está presente en uno de los pacientes analizados. Está localizado en la posición -86 respecto al sitio aceptor correspondiente, pero de nuevo puede descartarse por afectar a un gen localizado fuera de la zona de ligamiento del paciente que lo presenta. Se trata del cambio c.963-86_-87insG, en *REPS2*.

En el caso del gen *MAP3K15*, hay que destacar que los cambios están referidos a la secuencia de referencia de la base de datos que, como se ha comentado en el punto anterior, incluye un exón que rompe una posible pauta de lectura, haciendo que el codón de inicio de la traducción se sitúe en el exón 11, además de un exón cuya secuencia corresponde a un fragmento de elemento *Alu*. El cambio c.-381G>A no supone, por tanto, un cambio aminoacídico, cosa que sí ocurriría si se considera que el exón 10 no corresponde a la pauta de lectura, o que puedan existir transcritos alternativos que no lo contengan, como el sugerido en el punto anterior. En concreto, respecto a la secuencia sugerida en I.1.2, este cambio provocaría la sustitución de un residuo de glicina por uno de serina en la posición 337 de la proteína de 1179 aminoácidos ya comentada. Asimismo, el cambio c.802C>T (p.Leu268Phe) afectaría a la posición 659.

Gen	Cambios	Familias	Presencia en bases de datos o muestras control
<i>RBBP7</i> (NM_002893.2)	c.-84A>C	MRX73, fELX17, fELX18, fELX20, MRX59, K8944	/
	c.-87G>A	MRX73, fELX17, fELX18, fELX20, MRX59, K8944	/
	c.308-8C>T	MRX59, K8944	dbSNP RS# cluster id: rs4828536
<i>REPS2</i> (NM_004726.1)	c.698-69G>A	fELX18, fELX20	dbSNP RS# cluster id: rs713355
	c.963-86_-87insG	MRX73	/
	c.1497+64T>A	fELX18, fELX20, MRX59, K8944	dbSNP RS# cluster id: rs1946395
<i>SCML1</i> (NM_006746.3)	---	---	---
<i>RAI2</i> (NM_021785.2)	c.-33delT	MRX73, fELX17, fELX18, fELX20, MRX59, K8944	presente en Z93242.2 (clon RP3-389A20)
	c.1002C>A (p.Pro334)	K8944	presente en CD246042, clon IMAGE:30377067
<i>CXorf20</i> (NM_153346.2)	c.363G>A (p.Thr121)	fELX17, fELX20	presente en AK128155.1 (clon de cDNA: TESTI4029743)
	c.376+19_+24dupTAAAAA	fELX17, fELX20	presente en AC005913.2 (clon GSHB-484017)
	c.462T>G (p.Phe154Leu)	fELX17, fELX20	dbSNP RS# cluster id: rs17274127
	c.1034C>G (p.Ala345Gly)	MRX73, fELX17, fELX18, fELX20, MRX59, K8944	presente en AL096763.14 (clon RP5-1129A6)
	c.1889T>A (p.Val630Glu)	MRX73, fELX17, fELX18, fELX20, MRX59, K8944	presente en AL096763.14 (clon RP5-1129A6) y AK128155.1 (clon de cDNA: TESTI4029743)
<i>SCML2</i> (NM_006089.1)	c.433C>T (p.Leu145Phe)	fELX17, fELX20, K8944	presente en BQ420311.1 (clon IMAGE:6016037), BM475781.1 y BC064617.1 (clon IMAGE:5575894)

Tabla R1: Resultados del análisis de mutaciones llevado a cabo en los genes de la región Xp22 en seis pacientes afectados de retraso mental.

Gen	Cambios	Familias	Presencia en bases de datos o muestras control
<i>CDKL5</i> (NM_003159.1)	c.2376+118T>A	fELX18, MRX59	dbSNP RS# cluster id: rs3752484
<i>MAP3K15</i> (NM_001001671.1)	c.-381G>A	MRX73, fELX17, fELX18, fELX20, MRX59, K8944	presente en AL732423.12 (clon RP11-345L8)
	c.802C>T (p.Leu268Phe)	MRX73, fELX17, fELX18, fELX20, MRX59, K8944	presente en AL732326.4 (clon RP-723P2), AK131412.1 (clon de cDNA NT2RI3007443) y BQ895929.1 (clon IMAGE:6380136)
	c.1359-4T>A	MRX73, fELX17, fELX18, fELX20, MRX59, K8944	presente en AL732326.4 (clon RP-723P2)
	c.+115G>T	MRX73, fELX17, fELX18, fELX20, MRX59, K8944	presente en AL732326.4 (clon RP-723P2)
<i>SH3KBP1</i> (NM_031892.1)	c.1139-34G>A	MRX59	presente en una muestra control
<i>CXorf23</i> (NM_198279)	---	---	---
<i>FLJ14503</i> (NM_152780.2)	c.545A>G (p.Asn182Ser)	fELX17	presente en BC052256.1 (IMAGE:6299940), BC089400.1 (IMAGE:3063898), BC037165.2 (IMAGE:5087118), ...
	c.1267G>C (p.Val423Leu)	MRX73, fELX17, fELX18, fELX20, MRX59, K8944	presente en BC052256.1 (IMAGE:6299940), AK127056.1 (clon de cDNA BRAWH3034743), BC089400.1 (IMAGE:3063898), ...
	c.1669C>T (p.Pro537Ser)	MRX73, fELX17, fELX18, fELX20, MRX59, K8944	presente en BC052256.1 (IMAGE:6299940), AK127056.1 (clon de cDNA BRAWH3034743), AK098768.1 (clon de cDNA CBR4408), ...
	c.1734G>T (p.Lys578Asn)	fELX20	/

Tabla R1 (continuación): Resultados del análisis de mutaciones llevado a cabo en los genes de la región Xp22 en seis pacientes afectados de retraso mental.

Gen	Cambios	Familias	Presencia en bases de datos o muestras control
<i>EIF1A</i> (NM_001214)	---	---	---
<i>RPS6KA3</i> (NM_004586)	---	---	---

Tabla R1 (continuación): Resultados del análisis de mutaciones llevado a cabo en los genes de la región Xp22 en seis pacientes afectados de retraso mental.

I.1.4 Caracterización del gen *FLJ14503*

Como puede verse en la tabla R1, en el gen *FLJ14503* se identificó un cambio en el exón 13 que no ha podido ser catalogado como polimorfismo tras el análisis por SSCPs a partir de 178 muestras de controles no afectados de retraso mental. Se trata del cambio 1734G>T, que provoca la sustitución de la lisina 578 por un residuo de asparagina (K578N). Este cambio segrega con la enfermedad en la familia fELX20, como muestra la figura R4.

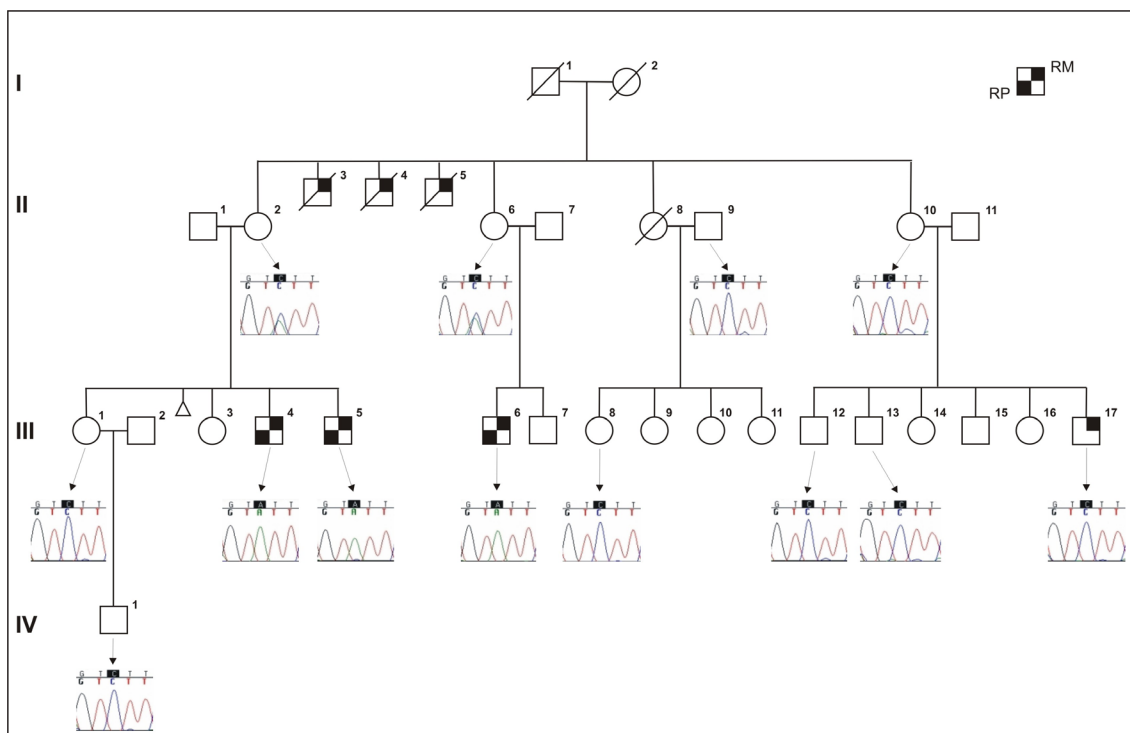


Fig. R4: Segregación del cambio 1734G>T en la familia fELX-20.

El exón 13 fue amplificado por PCR, purificado y secuenciado en aquellos miembros de la familia para los que se disponía de muestra. La secuencia obtenida corresponde a la cadena complementaria, por lo que el cambio que se observa es 1734C>A. Las mujeres II-2 y II-6 son heterocigotas para el cambio, como demuestra el doble pico que aparece en esa posición en el cromatograma. Los pacientes III-4, III-5 y III-6 presentan la variante A (T), y el resto de individuos analizados son homo- o hemizigotos para la variante C (G). Este cambio cosegrega con el haplotipo de riesgo de la enfermedad, ya que el estudio de ligamiento previo permitió descartar que el paciente III.17 comparta la mutación del resto de pacientes de la familia.

Se decidió, por tanto, investigar dicho gen más en detalle, comenzando por una búsqueda de posibles proteínas homólogas en otros organismos, para ver qué grado de conservación presenta el aminoácido lisina de la posición 578. La búsqueda se hizo por medio del programa BLASTP, empleando la proteína humana como secuencia de partida. Pudieron identificarse 8 secuencias aminoacídicas con una elevada similitud de secuencia en 7 organismos (para *Pan troglodytes* se obtuvieron dos secuencias parciales). En la siguiente figura (fig. R5) se presenta un alineamiento de todas estas proteínas. Hay que destacar que en todos los casos se trata de predicciones y que la proteína predicha en *Gallus gallus* tiene una longitud muy superior al resto de proteínas, por lo que por razones prácticas no se presenta en su totalidad en dicha figura. En el alineamiento se ha incluido la proteína humana MAP7 (*microtubule-associated protein 7*), por ser la proteína ya caracterizada que muestra una mayor similitud con FLJ14503.

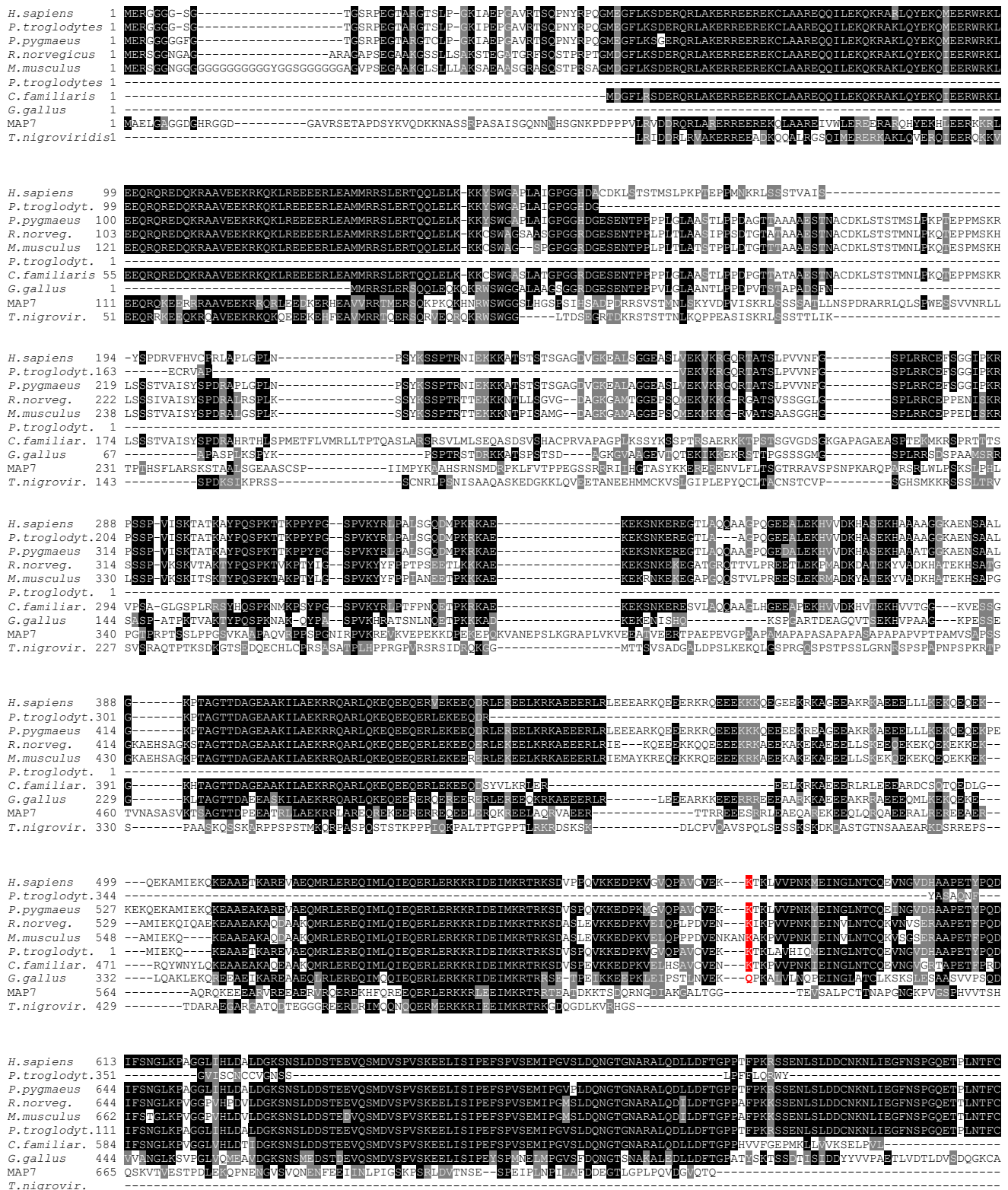


Fig. R5: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas similares a la predicción proteica FLJ14503 en diferentes organismos.

Las secuencias de las diferentes proteínas se obtuvieron de la base de datos del NCBI, tras realizar un análisis BLASTP con la secuencia predicha para la proteína humana. El alineamiento proporcionado por el programa CLUSTALW se introdujo después en el programa Boxshade, que sombrea en negro los aminoácidos idénticos en todas las secuencias y en gris aquellos que, sin ser iguales, presentan características bioquímicas similares. Se ha marcado en rojo la posición de la lisina 578, que se encuentra conservada en todas las secuencias de mamíferos, pero no así en la de *Gallus gallus*. Tanto la proteína de *Tetraodon nigroviridis*, como la proteína MAP7 carecen de una secuencia con elevado grado de similitud en esa posición.

Como se observa en la figura anterior, la lisina 578 se encuentra conservada en primates (*Pongo pygmaeus* y *Pan troglodytes*) y mamíferos (*Canis familiaris*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*), mientras que en *Gallus gallus* ha sido sustituida por un residuo de glutamina. En esta posición de la proteína hay dos residuos de lisina consecutivos y, curiosamente, la lisina 577 de la proteína humana no está conservada en *M.musculus*, *R.norvegicus* y *C.familiaris*, apareciendo en su lugar una asparagina. Esta sustitución de lisina por asparagina es justo la que se ha producido en la familia fELX20, pero en la posición siguiente.

Dado que se desconoce la función de la proteína codificada por este gen, no fue posible llevar a cabo análisis más o menos directos que permitieran comprobar si el cambio K578N tiene algún efecto sobre su función. No obstante, conocemos que FLJ14503 muestra una cierta similitud de secuencia con la proteína MAP7. Dado que ésta se asocia a microtúbulos (Masson y Kreis, 1993), y que en *FLJ14503* se predice un motivo E-MAP-115 entre las bases 1129 y 1704 (aminoácidos 377 a 568), se decidió analizar la localización subcelular de FLJ14503 y ver si ésta difería en la variante K578N. Este tipo de análisis proporcionaría, en cualquier caso, nueva información sobre la proteína FLJ14503 y, en caso de verse diferencias en la localización, permitiría catalogar el cambio identificado en fELX20 como la mutación responsable del RM en dicha familia.

La estrategia empleada para estudiar la localización subcelular de FLJ14503 consistió en generar fusiones de su pauta de lectura con la que codifica la proteína verde fluorescente (GFP). Cuando estas construcciones son transfectadas en células eucarióticas, la maquinaria celular transcribe y traduce estas secuencias, generando una proteína unida a la GFP. Iluminando después las células con luz de la longitud de onda adecuada, se puede observar fluorescencia verde allí donde esté localizada la proteína de fusión. En este tipo de estudios conviene generar fusiones en ambos extremos de la proteína a analizar, por si la presencia de la GFP pudiera alterar su localización subcelular, por ejemplo, enmascarando un péptido señal en su extremo N-terminal. En el apartado Discusión se profundizará más en este tema.

Para generar estas fusiones, se amplificó la pauta de lectura completa de *FLJ14503* a partir de cDNA obtenido por retrotranscripción de RNA poli(A⁺) de cerebro fetal y, tras clonar el resultado de esta PCR en el vector pCR2.1, se analizaron diversos clones. Esto permitió comprobar que en las reacciones de amplificación se habían generado diferentes transcritos, cuyas características se recogen en la tabla R2, y en la figura R6 de la página siguiente.

Transcrito	Cambios respecto a NM_152780.2		
	pos. 130 ¹	pos. 484	pos. 595
NM_152780.2	---	---	---
SIH - A	---	inserción de 66 pb, provenientes de un exón alternativo, presente, entre otros, en el clon AK098768	---
SIH - B	---	inserción de 99 pb, provenientes del mismo exón que en SIH - A, pero con el uso de un sitio aceptor alternativo	delección de 24 pb en el extremo 5' del exón 6 por el uso de un sitio aceptor alternativo
SIH - C	---	inserción de las mismas 66 pb que en SIH - A	delección de 24 pb como en SIH - B
SIH - D	<i>skipping</i> del exón 2	inserción de las mismas 66 pb que en SIH - A	delección de 24 pb como en SIH - B

Tabla R2: Características de los transcritos de *FLJ14503* amplificados a partir de cDNA obtenido por retrotranscripción de RNApoliA⁺ de cerebro fetal.

¹ Las posiciones se han calculado tomando la A del codón de inicio de la secuencia NM_152780.2 como posición +1.

En todos los casos, los diferentes transcritos presentan la inserción o delección de aminoácidos en pauta con el resto de la proteína, es decir, se añaden o eliminan bloques que no afectan a la identidad de los aminoácidos circundantes. De esta forma, frente a los 732 aminoácidos predichos para NM_152780.2, SIH - A codificaría 754, SIH - B tendría 757, SIH - C tendría 746 y SIH - D codificaría 720. También hay que destacar que todas las variantes afectan al extremo N-terminal de la proteína, pero no al posible dominio E-MAP-115 que, como se ha indicado anteriormente, estaría codificado por las bases 1129 a 1704.

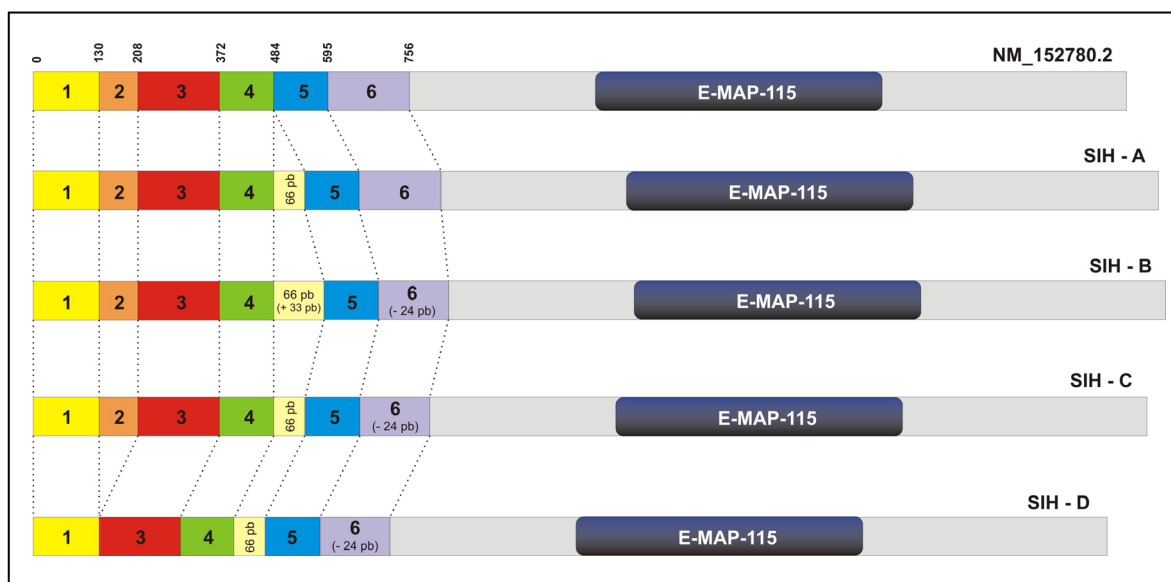


Fig. R6: Estructura de los diferentes transcritos identificados para *FLJ14503*.

Se han dibujado a escala los diferentes transcritos obtenidos tras amplificar la pauta de lectura de *FLJ14503* sobre cDNA obtenido por retrotranscripción de RNAPoliA+ de cerebro fetal. Cada barra horizontal corresponde a uno de los transcritos, desde el codón de inicio al de parada, y se han especificado los exones 1 a 6, representándolos además en colores distintos, ya que comprenden la región en la que se han hallado las variantes. En el resto del transcrito sólo se ha señalado la posición del dominio E-MAP-115, según lo predicho por los programas BLAST CD-Search y Prosite.

Dado que ninguno de los productos amplificados correspondía a la secuencia de referencia de GenBank para *FLJ14503*, se decidió seguir adelante con el transcrito SIH - A, ya que todas las secuencias analizadas contenían esas 66 bases adicionales, que además también se identificaron en clones de cDNA. El transcrito correspondiente a SIH - A, clonado en el vector pCR2.1, se denominó pSIH1, y difiere de NM152780.2, además de por las 66 bases adicionales, por tres sustituciones puntuales:

- c.545A>G : presente, entre otros, en los clones IMAGE:6299940, 6283418, 6283744, 6270655, 6286982, 6286801, 6271753 y 6270954.
- c.1267G>C: presente en los clones IMAGE:6299940, 3063898 y 5087118, y en el clon BRAWH3034743.
- c.1669C>T: presente en los clones IMAGE:1020370 y EST41618.

La existencia, en cada caso, de más de un clon de cDNA con el mismo cambio nos permitió asumir que se trataba de variantes de secuencia presentes en la población, y no introducidas artificialmente por la polimerasa durante el proceso de amplificación de la pauta de lectura.

pSIH1 se empleó como paso intermedio para transferirlo posteriormente al vector pEGFP-C1, generando la construcción pSIH2. pSIH1 se usó además como molde para amplificar la pauta de lectura de *FLJ14503* con nuevos cebadores, que permitieron, por una parte, su clonación en pEGFP-N3 (pSIH4), y por otra, generar mediante *Megaprime mutagenesis* el transcrito con el cambio K578N (ver punto VIII.5.2 de Material y Métodos) y clonarlo en pCR2.1 (pSIH5), pEGFP-C1 (pSIH6) y pEGFP-N3 (pSIH7) (ver figura M2 del punto VIII.5 de Material y Métodos).

Se generaron, por tanto, cuatro construcciones de fusión a la GFP para su transfección en células eucarióticas: dos con la pauta de lectura sin cambios, y otras dos con el transcrito G1734T, que representa el cambio identificado en los pacientes de la familia fELX20. En la figura R7 pueden verse dichas construcciones.

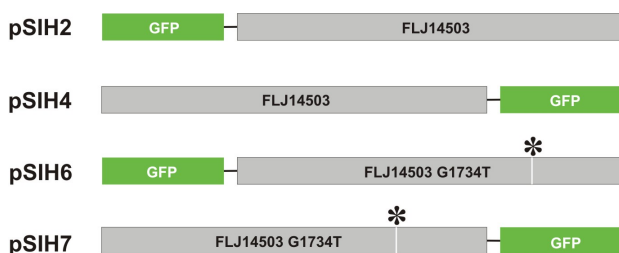


Fig. R7: Construcciones de fusión de FLJ14503 con la GFP, generadas para la transfección en células eucarióticas.

Las cajas verdes corresponden a la GFP y las grises a FLJ14503. Se ha marcado con un asterisco la posición del cambio G1734T.

La primera construcción que se generó, como ya se ha señalado, fue pSIH2. Con ella se transfectaron células de la línea CHO-K1, que es una línea celular de origen fibroblástico, procedente de ovario de hámster chino. Como control para la transfección se usó el vector pEGFP-C1 sin inserto, del que se espera que provoque la síntesis de GFP aislada, que muestra un patrón de localización subcelular homogéneo en núcleo y citoplasma. A continuación se muestran, en la figura R8, las imágenes obtenidas con un microscopio de fluorescencia.

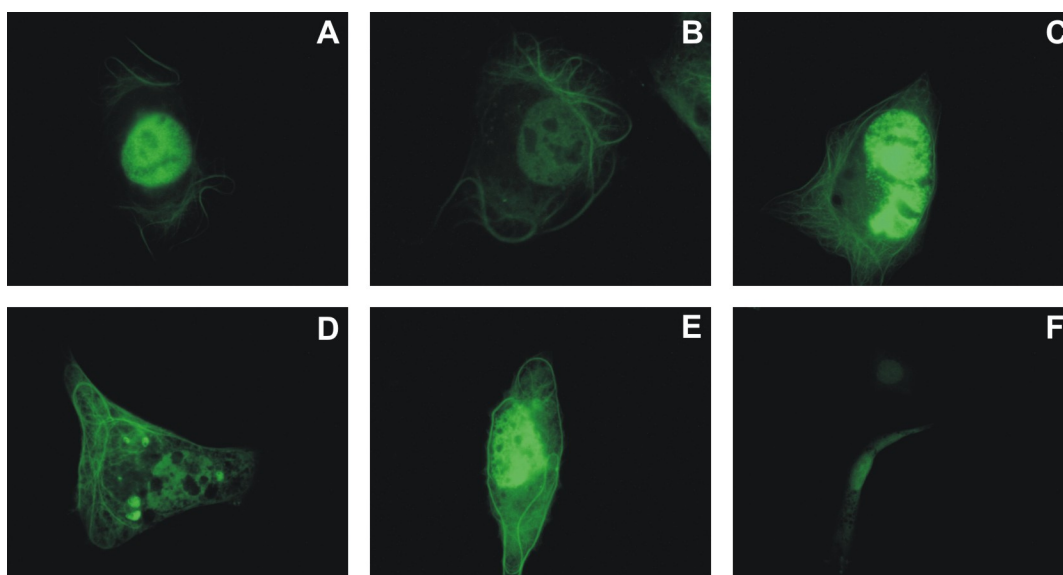


Fig. R8: GFP-FLJ14503 se localiza en el núcleo y en estructuras filiformes en el citoplasma de células CHO-K1.

Las células A - E fueron transfectadas con pSIH2 y fijadas a las 24 horas con paraformaldehído al 4%. En todas ellas aparece señal en el núcleo, así como en unas estructuras filiformes en el citoplasma. Los nucleolos no están marcados. En la célula D se aprecian también algunos agregados, y en la E aparece además una señal uniforme en el citoplasma. La célula F sufrió el mismo tratamiento que las A - E, pero fue transfectada con pEGFP-C1. Muestra el patrón típico de la GFP: señal uniforme en núcleo y citoplasma.

Como puede apreciarse en dicha figura, las células transfectadas con pSIH2 muestran señal en el núcleo, pero no en los nucleolos, que aparecen como sombras más oscuras en su interior. Cabe destacar que la intensidad de señal en el núcleo varía enormemente de unas células a otras, siendo, sin embargo, el resto de señales de una intensidad mucho más parecida. El citoplasma muestra una cierta señal, que varía también en intensidad de unas células a otras. Por otra parte, destaca el patrón de estructuras filiformes en el citoplasma que no corresponde, en principio, al patrón que cabría esperar de algún elemento celular. Sin

embargo, parece obvio que deba tratarse de algún tipo de filamento de los que forman el citoesqueleto en las células y, teniendo en cuenta la similitud de secuencia del FLJ14503 con la proteína MAP7, así como la predicción de un dominio E-MAP-115 entre sus aminoácidos 377 y 568, se decidió investigar si las estructuras observadas en el citoplasma correspondían a microtúbulos.

Los microtúbulos son polímeros cilíndricos, formados por 13 protofilamentos, compuestos de dímeros de α - y β -tubulina. Son estructuras polares, ya que todos los dímeros de tubulina presentan la misma orientación: la β -tubulina está orientada hacia el extremo positivo, y la α -tubulina hacia el negativo. El extremo positivo, con las subunidades β expuestas, crece a un ritmo mayor que el negativo. Los microtúbulos presentan un comportamiento dinámico, ya que continuamente están siendo añadidos y eliminados dímeros de tubulina, y la proporción entre estas dos acciones determina la longitud del microtúbulo en cada momento.

Para poner de manifiesto estas estructuras en las células transfectadas con pSIH2, se empleó un anticuerpo monoclonal anti α -tubulina (clon DM1A). Así, transcurridas unas 24 horas desde la transfección, se llevó a cabo una tinción inmunocitoquímica, tal y como se describe en el apartado VIII.5.5 de Material y Métodos. Como anticuerpo secundario se utilizó *Alexa Fluor 546*, que está conjugado a un fluoróforo que al ser excitado emite en el espectro del rojo. De esta forma, se verá en verde la localización de la proteína de fusión con la GFP, mientras que los microtúbulos aparecerán teñidos de rojo. Al superponer las imágenes de los canales verde y rojo, un pseudocolor amarillo anaranjado pondrá de manifiesto las regiones donde coincida la localización de GFP-FLJ14503 con la de α -tubulina, como se ve en la figura R9.

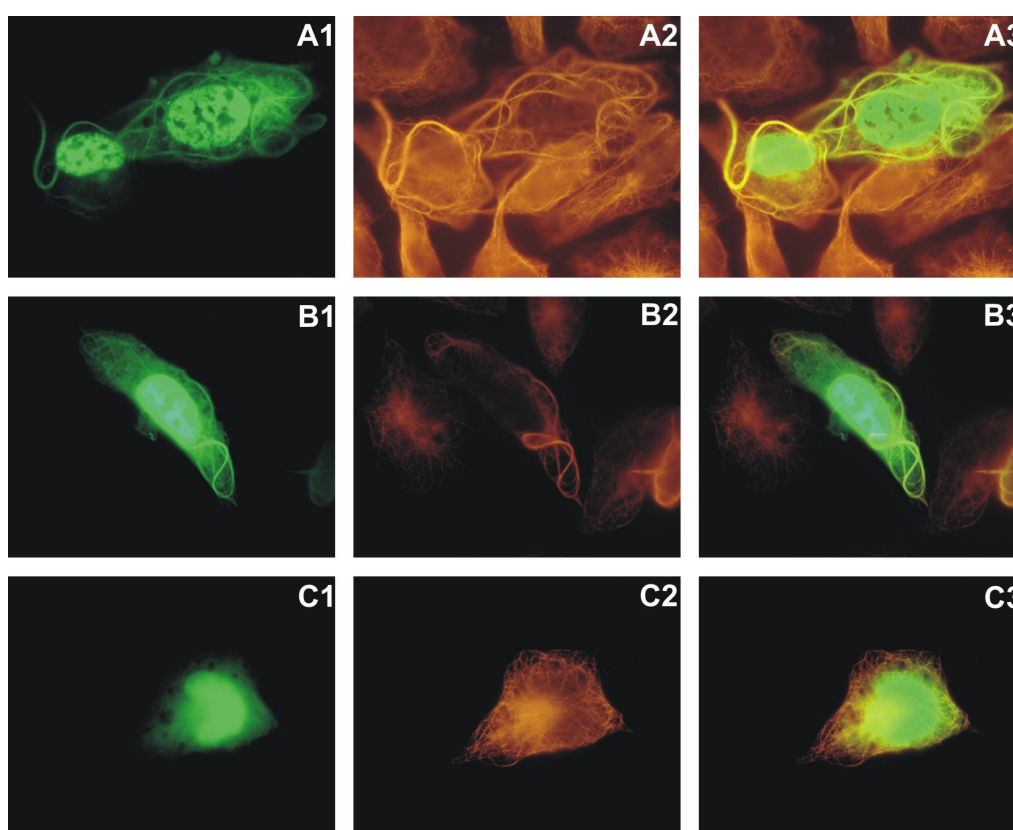


Fig. R9: FLJ14503 colocaliza en las estructuras filiformes del citoplasma con α -tubulina.

Células CHO-K1 fueron transfectadas con pSIH2 (A, B) o con plásmido sin inserto (C). En las células transfectadas con pSIH2 se aprecian de nuevo las estructuras filiformes en el citoplasma (A1, B1). Las mismas estructuras aparecen tras la tinción con anticuerpos anti α -tubulina (A2, B2). Al superponer ambas imágenes (A3, B3), se observa la colocalización de FLJ14503 y α -tubulina. Nótese la ausencia de un patrón normal de microtúbulos en estas células, presente, sin embargo, en las células vecinas no transfectadas. En la célula transfectada con plásmido sin inserto (C1-C3), los microtúbulos no están alterados.

Como muestran las imágenes, las estructuras filiformes que aparecen en el citoplasma de las células transfectadas con pSIH2 contienen también α -tubulina. Dado que en estas células no se aprecia un patrón normal de microtúbulos, es lógico pensar que la sobreexpresión de FLJ14503 en células CHO-K1 altera su patrón de distribución. Hay que destacar que cuando se lleva a cabo una transfección, siempre se está provocando la sobreexpresión de la proteína analizada, puesto que a la producción endógena por parte de las células en cultivo, se añade la sintetizada a partir de la construcción introducida artificialmente.

Para descartar que esta alteración se debiera a la localización de la GFP en el extremo N-terminal de FLJ14503, se realizaron transfecciones con la construcción pSIH4, seguidas de análisis inmunocitoquímicos, de nuevo con anticuerpo anti- α -tubulina. La figura R10 recoge los resultados de estos experimentos.

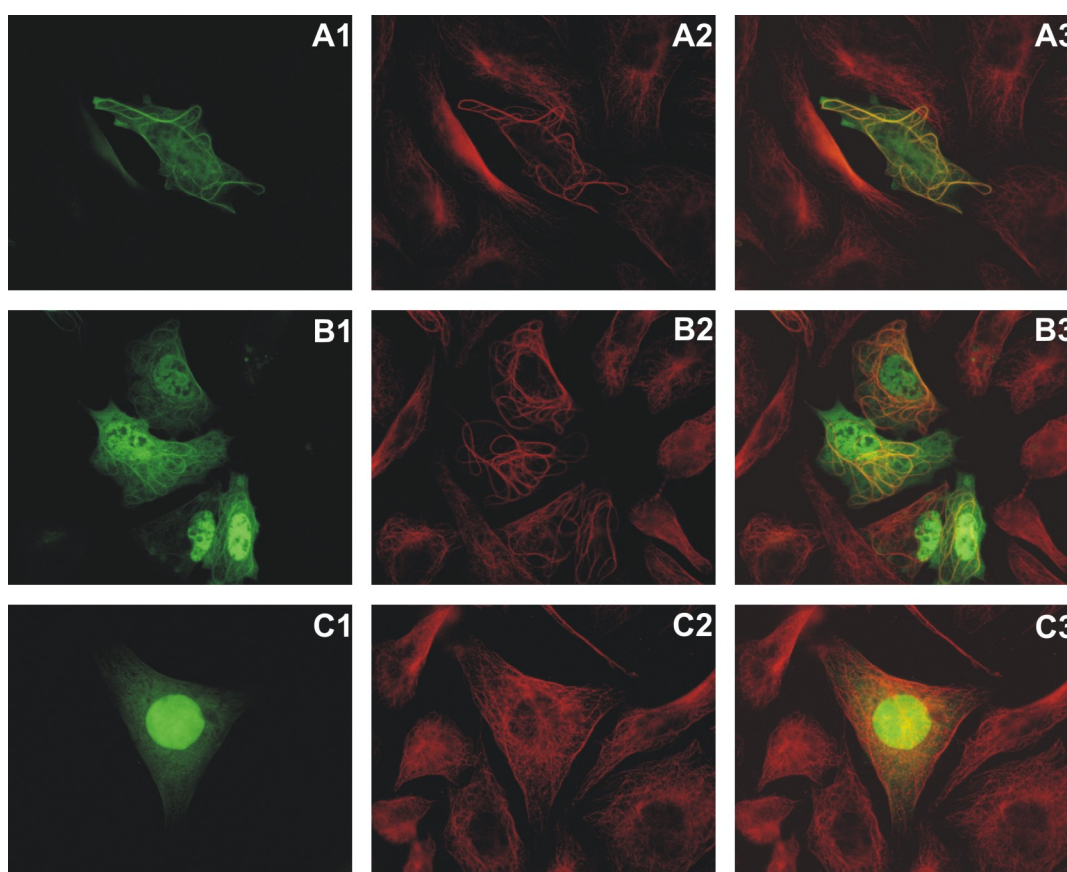


Fig. R10: Localización de FLJ14503-GFP en células CHO-K1.

Células CHO-K1 fueron transfectadas con pSIH4 (A, B) o con pEGFP-N3 (C), fijadas e hibridadas con anticuerpo anti α -tubulina. Los patrones que se observan, tanto para FLJ14503-GFP (A1, B1), como en el caso de los microtúbulos (A2, B2), son completamente equivalentes a los observados en células transfectadas con pSIH2. FLJ14503 se localiza en el núcleo, con intensidad variable, y en estructuras filiformes en el citoplasma, y los microtúbulos muestran un patrón alterado, que coincide con las estructuras vistas para GFP-FLJ14503. La superposición de las imágenes demuestra, una vez más, la colocalización de FLJ14503 con los microtúbulos (A3, B3). La célula transfectada con el plásmido control (C) presenta una señal uniforme en núcleo y citoplasma (C1), y microtúbulos normales (C2).

Comparando las figuras R9 y R10 se puede comprobar que las células CHO-K1 presentan un patrón idéntico en cuanto a distribución de FLJ14503 y alteración de los microtúbulos, tanto si la proteína de fusión lleva la GFP en su extremo N-terminal, como si la lleva en el C-terminal. El siguiente paso consistió en averiguar si la variante G1734T, que contiene el cambio identificado en la familia fELX20, provocaba una reordenación similar en los microtúbulos y se localizaba en las mismas estructuras al ser introducida en la misma línea celular. En la figura R11, en la página siguiente, se pueden ver los resultados de estas transfecciones.

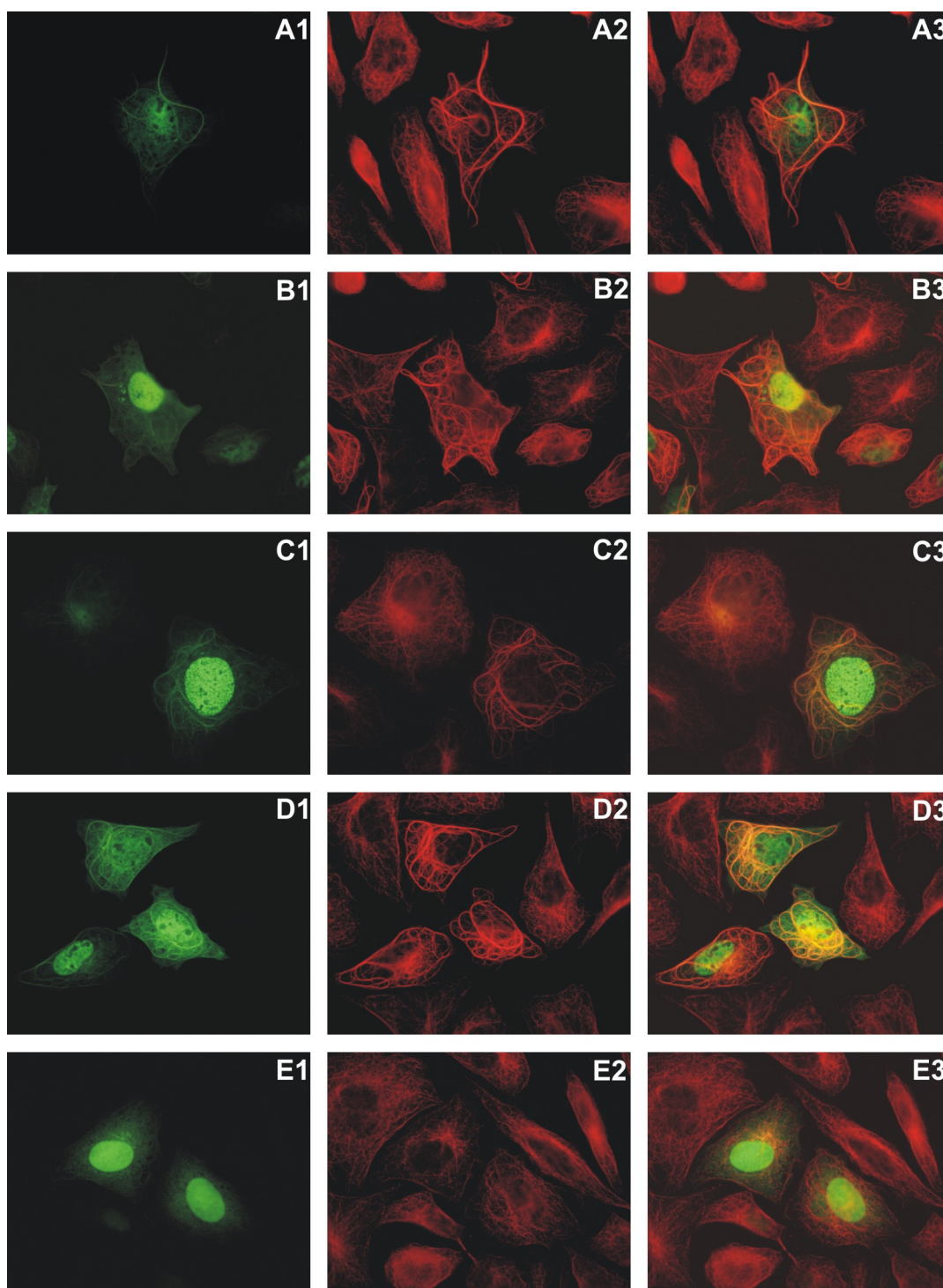


Fig. R11: Localización de las variantes G1743T de FLJ14503 en células CHO-K1.

Células CHO-K1 fueron transfectadas con pSIH6 (A, B), pSIH7 (C, D) o pEGFP-N3 (E), fijadas e hibridadas con anticuerpo anti α -tubulina. De nuevo se observa un patrón de localización nuclear para ambas construcciones, así como estructuras filiformes en el citoplasma (A1, B1, C1, D1). Los microtúbulos muestran el patrón alterado (A2, B2, C2, D2) y la superposición de imágenes demuestra la colocalización de las variantes G1743T con la α -tubulina de los microtúbulos (A3, B3, C3, D3). No se aprecian diferencias entre estas células y las transfectadas con la proteína normal. De nuevo, las células transfectadas con plásmido sin inserto muestran el patrón normal de microtúbulos (E2).

Tal y como puede apreciarse en la figura R11, el cambio hallado en los pacientes de la familia fELX20 no parece alterar la localización subcelular de la proteína FLJ14503, ni su efecto sobre la distribución de los microtúbulos en la célula, al menos en el presente modelo experimental. Por tanto, a pesar de que el cambio segregaba en la familia con los individuos enfermos y de que no ha sido encontrado en 178 muestras de controles (que representan, con seguridad, más de 250 cromosomas X), hasta el momento no hemos encontrado evidencias funcionales que indiquen que pueda tratarse de una mutación patológica.

Respecto a la alteración en los microtúbulos producida por la sobreexpresión de FLJ14503 en células CHO-K1, cabe destacar que no parece que ésta impida la división celular. Cuando una célula se divide, se forma en su interior el huso acromático, constituido por microtúbulos, que es el responsable de la separación de las cromátidas hermanas hacia los polos opuestos de la célula. Si los microtúbulos están alterados, podría ocurrir que la división celular se viera comprometida. En los experimentos de transfección realizados no se ha apreciado una diferencia significativa en cuanto al número de células entre aquellas transfectadas con alguna de las construcciones de FLJ14503 y las transfectadas con plásmidos control. Asimismo, se han podido observar células mitóticas, como muestra la figura R12.

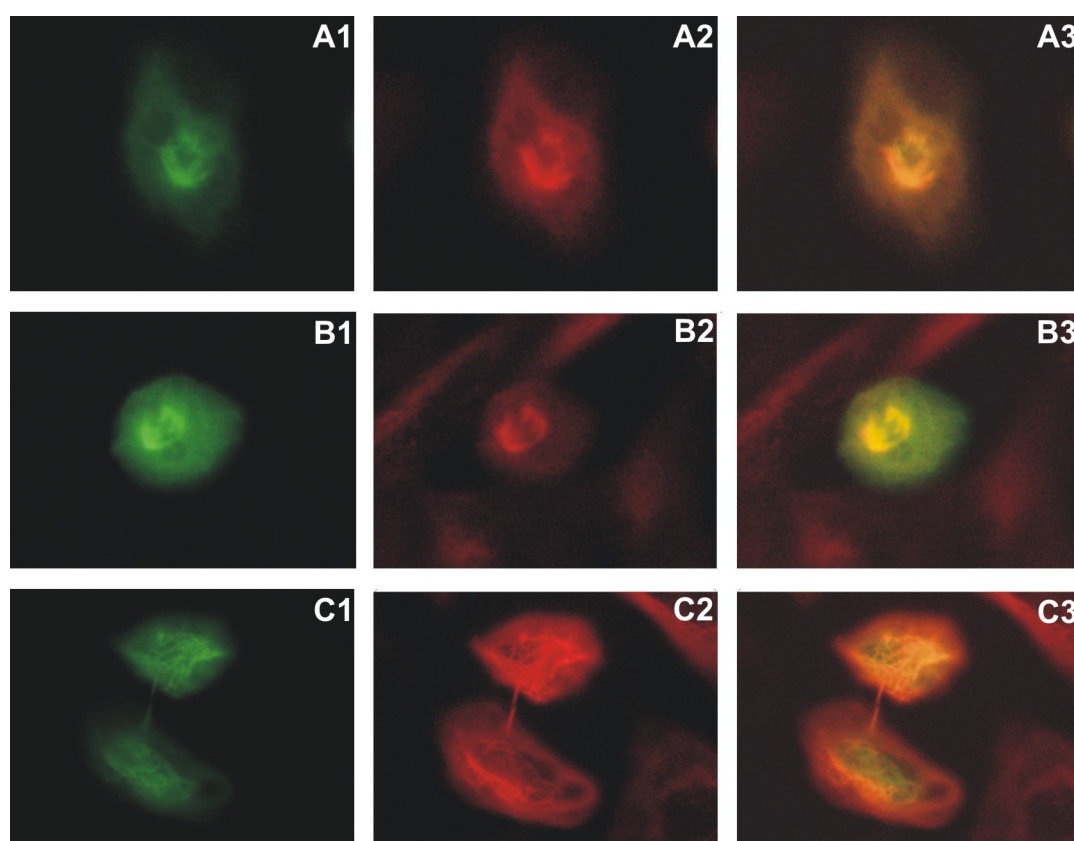


Fig. R12: Localización de pSIH4 y pSIH7 en células CHO-K1 en división.

Células CHO-K1 fueron transfectadas con pSIH4 (A, B) o pSIH7 (C), fijadas e hibridadas con anticuerpo anti α -tubulina. En células metafásicas se observa localización de FLJ14503 en el huso acromático y de forma dispersa en el citoplasma (A1, B1). El huso acromático muestra un aspecto bastante normal (A2, B2); hay que considerar que estas células son muy redondeadas, por lo que es difícil enfocarlas. Las células de la fila C ya han completado la división, y permanecen unidas por un puente citoplasmático denominado *midbody*. De nuevo se observa la colocalización de FLJ14503 con los microtúbulos (C3).

Como muestran las imágenes, las células transfectadas con las diferentes variantes de FLJ14503 entran en mitosis y parece que logran completarla. En cualquier caso, serían necesarios más estudios para comprobar el efecto de la sobreexpresión de FLJ14503 sobre la división celular, puesto que una célula metafásica puede no completar la mitosis, dando lugar a una célula binucleada, que tendrá problemas cuando vuelva a entrar en división. Lo que sí

puede afirmarse es que la sobreexpresión de las diferentes variantes de FLJ14503 no impide la transición G2/M. Además, el hecho de que en muchas ocasiones las células transfectadas aparezcan en grupo hace pensar que, al menos en algunos casos, pueda tratarse de células hijas provenientes de una célula transfectada originalmente, lo que apoyaría también esta hipótesis.

Por último, cabría destacar la presencia de agregados de proteína de fusión en zonas de la periferia celular, que generalmente no muestran colocalización con α -tubulina, y que no necesariamente aparecen en las células con un mayor nivel de expresión de la proteína exógena, tal y como se aprecia en la figura R13.

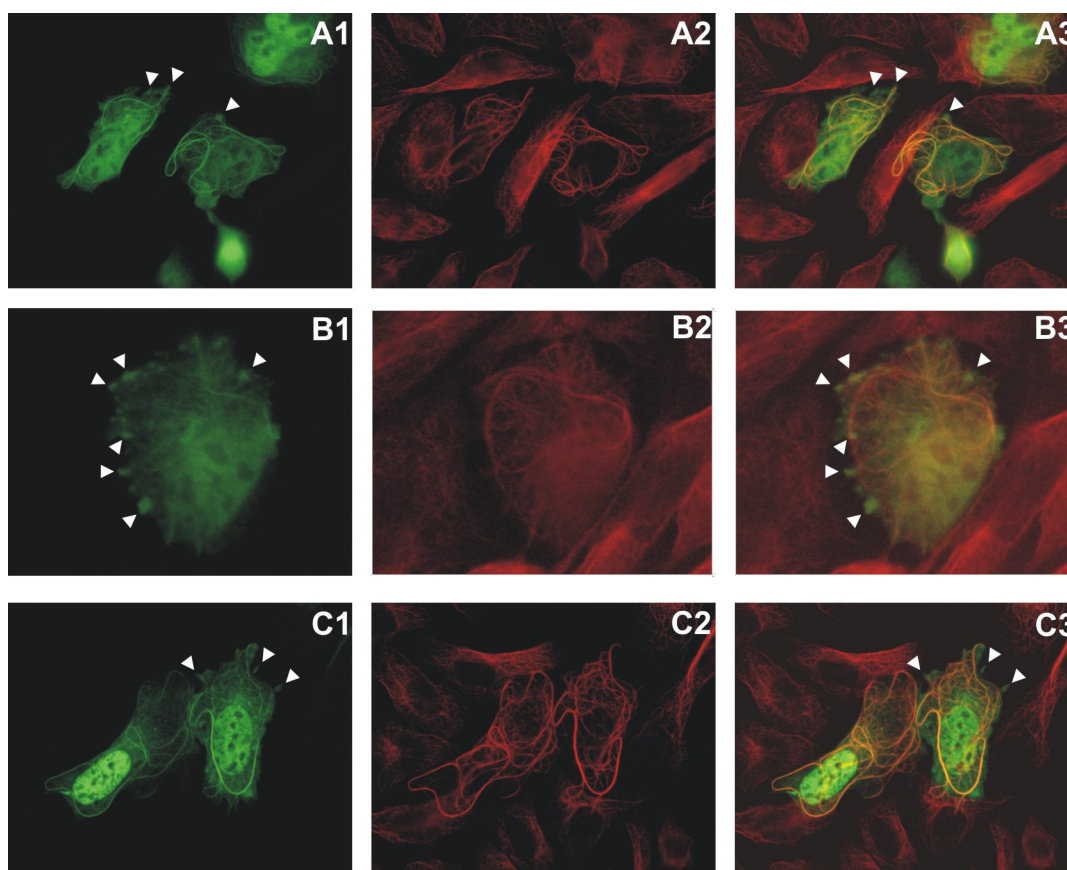


Fig. R13: Presencia de agregados de la proteína de fusión en la periferia celular.

Células CHO-K1 fueron transfectadas con pSIH4 (A), pSIH6 (B) o pSIH7 (C), fijadas e hibridadas con anticuerpo anti α -tubulina. Aparte del patrón ya descrito de señal nuclear, citoplásmica y en los microtúbulos, se aprecian agregados en la periferia celular, marcados con flechas blancas en A1, B1 y C1. Dichos agregados no contienen α -tubulina, como demuestran las imágenes de superposición A3, B3 y C3. Nótese en C1 cómo, a pesar de que la intensidad de señal en citoplasma es similar en ambas células, sólo una de ellas presenta estos agregados.

En resumen, el análisis de la proteína FLJ14503 parece confirmar que se trata de una proteína asociada a microtúbulos, tal y como podía sospecharse por su homología con MAP7 y por la predicción de un dominio E-MAP-115 en su secuencia. El cambio G1743T, identificado en los pacientes de la familia fELX20, y que supone la sustitución del residuo de lisina de la posición 578 por uno de asparagina, no afecta a la localización subcelular de la proteína ni al efecto que su sobreexpresión en células CHO-K1 provoca sobre la distribución normal de los microtúbulos. Algunos aspectos de la localización subcelular de FLJ14503, como la diferente intensidad en núcleo y citoplasma en diferentes células, o la presencia de agregados de proteína de fusión en la periferia celular, serán tratados más en profundidad en la Discusión, así como su efecto sobre la distribución de los microtúbulos.

I.2 Región Xq24-q25

I.2.1 Definición de la región de ligamiento en la familia fELX101.

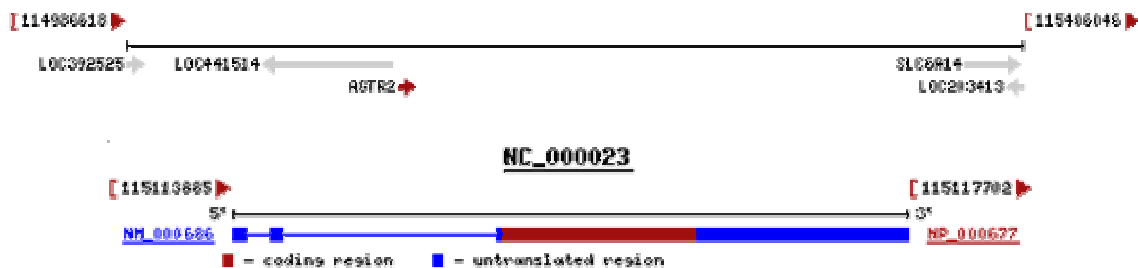
La familia fELX101 ha sido estudiada en la Unidad de Genética del Hospital La Fe de Valencia, donde se ha realizado el análisis de ligamiento. Inicialmente, la región candidata quedaba definida por los marcadores DXS8055 y DXS1047, abarcando 14,3 Mb. En dicha región se localiza el gen *AGTR2*, descrito como responsable de retraso mental inespecífico en varias familias por Vervoort y colaboradores en 2002 (ver Introducción). Esto hizo que se llevara a cabo el análisis de mutaciones de dicho gen, que, sin embargo, quedaría excluido posteriormente tras el hallazgo de un nuevo marcador recombinante proximal, DXS6805, distal a *AGTR2*. La región de ligamiento definitiva quedó delimitada por los marcadores DXS6805 y DXS7346 (Martínez *et al.*, 2004), entre los que median 7,6 Mb. En esta zona hay descritos 42 genes confirmados y 16 predicciones, de los que sólo uno, *GRIA3*, ha sido relacionado, de momento, con fenotipos de retraso mental.

El gen *GRIA3* codifica la subunidad 3 del receptor del glutamato. En una paciente con desorden afectivo bipolar y retraso mental, dicho gen está interrumpido entre los exones 5 y 6 por una translocación cromosómica (Gécz *et al.*, 1999). A pesar de que no se puede excluir la presencia de una proteína alterada con un efecto dominante como consecuencia de la translocación y de que no se han encontrado mutaciones en dicho gen en otros pacientes con retraso, se consideró necesario el análisis de este gen en la familia fELX101 antes de considerar la existencia de un nuevo locus MRX definido por esta familia. Dicho análisis se llevó a cabo, al igual que en el caso del gen *AGTR2*, por amplificación y secuenciación de los exones codificantes. Dado que no se encontraron mutaciones en ninguno de estos genes, la familia fELX101 fue publicada como MRX82 (Martínez *et al.*, 2004).

I.2.2 Búsqueda de mutaciones

I.2.2.1 *AGTR2*

El gen *AGTR2* está formado por 3 exones, de los que únicamente el tercero es codificante, formando los dos primeros la región 5' no traducida. Para el análisis de mutaciones del exón 3 se emplearon, en su amplificación, los cebadores descritos por Vervoort y colaboradores (2002). Su secuenciación, dado el elevado tamaño del fragmento, se realizó utilizando cuatro oligonucleótidos: los dos ya nombrados y dos internos, diseñados para tal fin (ver tabla M47).

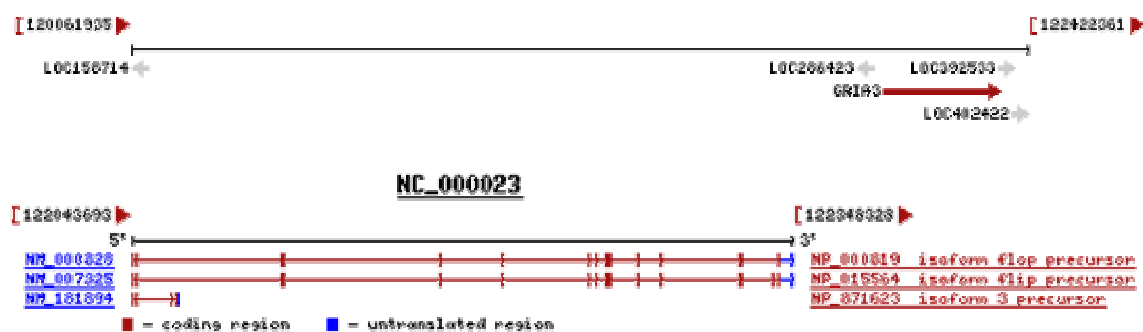


Es importante resaltar que el análisis de mutaciones de *AGTR2* se llevó a cabo, además, en un paciente de la familia fELX18, que como se ha descrito en la sección Material y Métodos, presenta un posible ligamiento de la enfermedad en dos regiones del cromosoma X: Xp22 y Xq22.2-Xq24. Dentro de esta última queda incluido *AGTR2*, lo que hizo que se considerara la búsqueda de mutaciones en dicho paciente.

Como era de esperar por los resultados posteriores del análisis de ligamiento en fELX101, no se encontró ningún cambio en la pauta de lectura del gen en el paciente EX553 respecto a la secuencia de referencia de la base de datos (NM_000686). El mismo resultado se obtuvo con el paciente EX129, de la familia fELX18.

I.2.2.2 GRIA3

Este gen está formado por 17 exones, que fueron amplificados y secuenciados empleando los cebadores descritos por Gécz *et al.* (1999). Existen tres variantes de la proteína, dos de ellas denominadas “flip” y “flop” respectivamente, que se diferencian en el exón que ocupa la posición número 14, puesto que en ambas la pauta de lectura contiene 16 exones. En la variante “flip” aparece el exón numerado como 15 en Gécz *et al.* (1999), y en la variante “flop” el numerado como 14. La tercera variante es mucho más corta y está formada únicamente por 4 exones (ver esquema inferior).



En este caso el análisis se realizó únicamente en un paciente de la familia fELX101, dado que *GRIA3* es distal a la región de ligamiento de fELX18 en Xq22.2-Xq14. Se identificaron dos cambios respecto a las secuencias de referencia NM_000828 (flop) y NM_007325 (flip):

- c.1200T>C (p.Asn400): este cambio ya ha sido descrito como polimorfismo y aparece en la base de datos dbSNP con la referencia rs502434.
- c.2323G>A (p.Gly775Arg): también se trata de un polimorfismo, dado que aparece en el clon genómico RP5-1171F9 (AL356213).

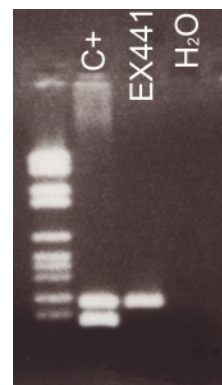
II. Síndrome de Coffin-Lowry: Identificación de una mutación patológica en el gen *RPS6KA3* en el paciente EX441.

Una muestra del paciente EX441 fue remitida a la Unidad de Genética del Hospital La Fe de Valencia por sospecha clínica de Síndrome de Coffin-Lowry, con el objetivo de confirmar molecularmente dicho diagnóstico. El análisis se llevó a cabo amplificando y secuenciando cada uno de los 22 exones que componen el gen *RPS6KA3*, responsable de esta patología, a partir de DNA genómico del paciente.

Todos los exones pudieron ser amplificados y secuenciados en el paciente excepto el exón 4, para el que fue imposible generar un producto con los cebadores descritos en la tabla M22. Dado que con esos mismos oligonucleótidos sí se había podido amplificar este exón, tanto en muestras de controles como de pacientes afectados de MRX, se descartó que el problema residiera en los cebadores y se comenzó un análisis más detallado en el paciente. La figura R14 muestra el resultado de una PCR múltiple, realizada simultáneamente con los cebadores de los exones 3 y 4, en el paciente EX441 y en una muestra control.

Fig. R14: Gel de agarosa con los productos de una PCR múltiple para amplificar los exones 3 y 4 del gen *RPS6KA3* en el paciente EX441 y en una muestra control.

En este gel de agarosa al 1.5% se han cargado los productos de una PCR múltiple realizada con los cebadores de los exones 3 y 4 del gen *RPS6KA3* sobre DNA genómico de un individuo control y del paciente EX441. Para el exón 3 se espera un producto de 285 pb y para el exón 4 uno de 210 pb. En el individuo control se han amplificado ambos exones, como demuestran las dos bandas en el gel, mientras que en EX441 únicamente aparece la banda correspondiente al exón 3. Como marcador de peso molecular se ha empleado el marcador VI (Roche) y como control negativo para la PCR se usó H₂O.



La imposibilidad de amplificar el exón 4 en el paciente EX441 planteaba tres alternativas: (i) podía haberse producido una deleción que abarcara el exón 4 y las regiones adyacentes, de forma que la zona a amplificar no estuviera ya presente en el cromosoma, (ii) podía haberse producido otro tipo de reordenamiento (inversión o inserción) que impidiera la amplificación, o (iii) podía estar alterado el sitio de unión de alguno de los dos cebadores, imposibilitando así la amplificación. Teniendo en cuenta estas opciones, se decidió comprobar si el paciente había sufrido algún tipo de reordenamiento en su DNA que afectara al exón 4 del gen *RPS6KA3*. Para ello se llevó a cabo un análisis por *Southern blot*, empleando como sonda un amplificado del exón 4 obtenido de un individuo control. Los resultados de dicho análisis se muestran en la figura R15.

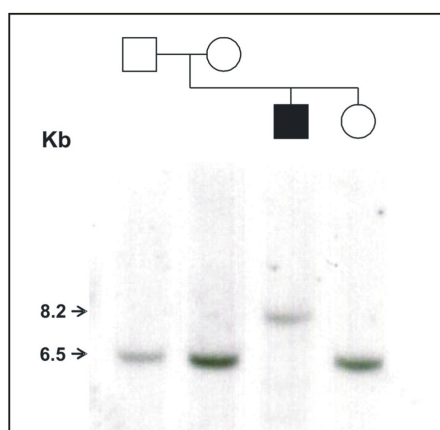


Fig. R15: *Southern blot* de la familia fELX72 hibridado con la sonda del exón 4 del gen *RPSKA3*.

El DNA genómico fue digerido con *EcoRI*, cargado en un gel de agarosa y transferido a una membrana de nylon. Ésta se hibridó con la sonda del exón 4 del gen *RPS6KA3*. Tanto los padres del paciente como su hermana sana muestran una banda de 6,5 kb, mientras que el paciente EX441 presenta una banda de mayor tamaño (8,2 kb). La mayor intensidad de las bandas de la madre y la hermana se debe a la presencia en su genoma de 2 copias del cromosoma X.

Como puede observarse, el paciente EX441 mostraba una banda de 8,2 kb en lugar de la banda normal de 6,5 kb, que presentaban tanto sus padres como su hermana sana. Esto indicaba la presencia de algún tipo de anomalía a nivel genómico, pero además, confirmaba que el exón 4, o al menos parte de él, sí se hallaba presente en el paciente EX441, puesto que si se hubiera tratado de una delección completa, la sonda no habría podido hibridar y no se habría obtenido banda alguna en la carrera correspondiente. Se consideró, por tanto, la posibilidad de que una inserción, situada en la región comprendida entre ambos cebadores, estuviera incrementando el tamaño del producto de PCR, de manera que el tiempo de elongación del programa RSK (10'') no sería suficiente para que la polimerasa lo amplificara.

Para comprobar esta hipótesis se llevó a cabo una amplificación por PCR, con los mismos cebadores que en un principio no habían generado producto alguno, pero aumentando los tiempos de desnaturalización y asociación a 1 minuto y el de elongación a 3 minutos. Con estas nuevas condiciones se obtuvo una banda de 3,1 kb en lugar del producto normal de 210 bp, como se presenta en la figura R16.

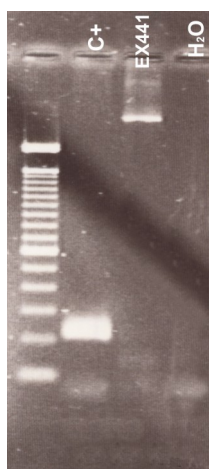


Fig. R16: Gel de agarosa con los productos de una PCR con un tiempo de elongación mayor (3') para intentar amplificar el exón 4 del gen *RPS6KA3* en el paciente EX441 y en una muestra control.

En este gel de agarosa al 1.5% se han cargado los productos de una PCR con mayores tiempos de desnaturalización, asociación y elongación para intentar amplificar el exón 4 del gen *RPS6KA3* en el paciente EX441. Bajo estas condiciones, en la muestra control se obtiene la banda de 210 bp, correspondiente al amplificado del exón 4, mientras que en el paciente EX441 se obtiene una banda mucho mayor, de más de 2 kb. El marcador empleado ha sido el 100 bp Ladder de Invitrogen y como control negativo para la PCR se usó H₂O.

Esta banda fue secuenciada para comprobar dónde se había producido la inserción en el paciente, así como la naturaleza de la misma. Dado que la secuenciación directa del amplificado de PCR no dio resultado, la banda fue clonada en el vector pCR2.1 mediante el sistema TOPO, obteniéndose una única colonia con el inserto correcto. Esta baja eficiencia en la clonación se explica por el elevado tamaño del fragmento a clonar y el tiempo transcurrido entre la realización de la PCR y la clonación, periodo durante el cual puede producirse una cierta degradación del producto, siendo especialmente crítica la pérdida de las adeninas de los extremos del producto de PCR (ver punto VIII.2.5 de Material y Métodos). Una vez obtenido un clon recombinante, pudo llevarse a cabo la secuenciación, que en un principio se realizó a partir de productos obtenidos por PCRs de la colonia y posteriormente sobre preparaciones de DNA del clon. La técnica empleada fue el *primer walking*, consistente en ir diseñando nuevos cebadores sobre la secuencia a medida que se fue disponiendo de ella. Es importante indicar que todos los intentos de secuenciar con el cebador directo fueron fallidos, pudiéndose leer sólo unas 70 pb, de manera que la secuencia de la inserción se fue obteniendo desde su extremo 3', comenzando con el cebador reverso. La zona 5' de la inserción fue finalmente imposible de secuenciar, debido a las características de la propia secuencia, como se comentará más adelante.

El análisis de la secuencia obtenida indicó que la inserción estaba causada por un elemento LINE-1 incompleto, ocurrida en la posición -8 del intrón 3, muy próxima, por tanto, al sitio aceptor del procesado. Al realizar un análisis BLASTN con la secuencia de la inserción, se obtuvo una similitud de secuencia del 99% con el elemento repetitivo LINE1 (L1.3). Dicha similitud abarca la totalidad de la inserción, pero se reparte en dos fragmentos dentro del elemento LINE:

Elementos	Posiciones	
Inserción ²	1 - 848	848 - 2651
LINE1 (L1.3)	5872 - 5025	3142 - 4949
bases idénticas / total bases:	843 / 848	1796 / 1808

Estos datos indican que durante el proceso de transposición se ha producido un reordenamiento en el elemento LINE1. La zona 5' de la inserción no pudo ser secuenciada debido a que corresponde a la cola poliA del elemento, como se muestra en la figura R17, en la que se puede apreciar la estructura de la inserción respecto a un elemento LINE1 consenso, así como la posición exacta en la que se ha producido la inserción.

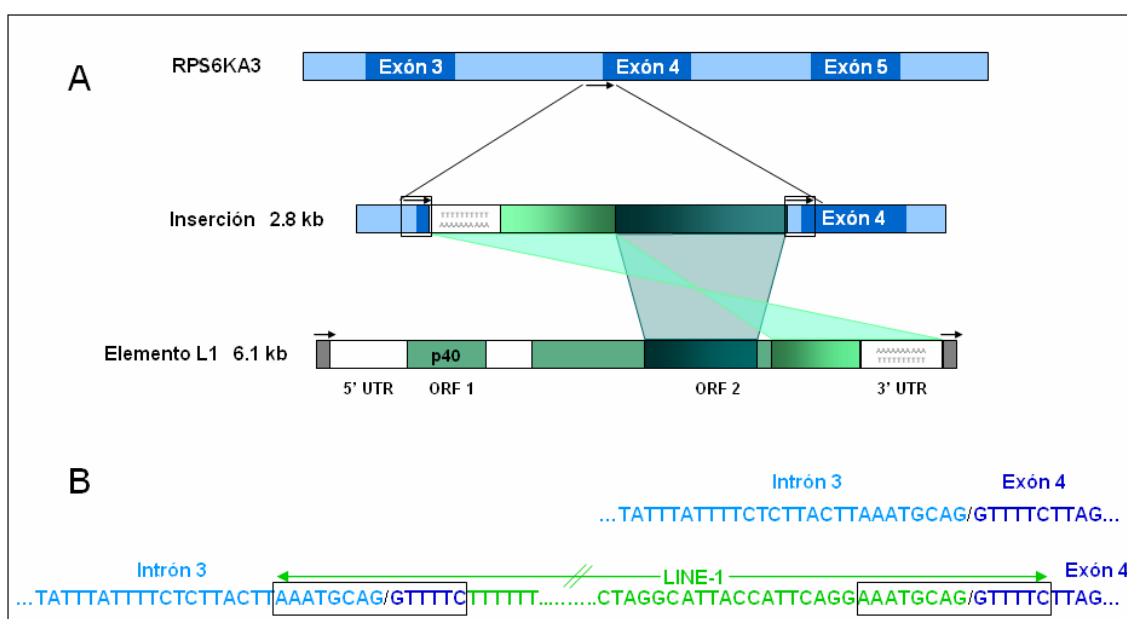


Fig. R17: Esquema de la inserción de un elemento LINE1 defectivo en el gen *RPS6KA3* en el paciente EX441.

A. Los exones aparecen como cajas azul oscuro y las flechas indican las repeticiones directas que ha generado la inserción. El elemento LINE-1 se ha insertado en el intrón 3, muy cerca del sitio aceptor de procesamiento del exón 4. Como puede observarse, la inserción no corresponde a un elemento L1 en su totalidad, sino que se compone de dos fragmentos de la ORF2, de los que uno de ellos contiene además la cola poliA. Este último fragmento se ha insertado en posición inversa, como indica el sombreado. B. Secuencia nucleotídica del lugar de inserción. La secuencia superior corresponde a la situación normal en el genoma, y en la inferior se puede apreciar el punto exacto de inserción, a 8 bases del exón 4, así como la secuencia de las repeticiones directas generadas, que incluyen las 6 primeras bases del exón.

Para averiguar los posibles efectos de esta inserción sobre la transcripción y procesamiento del gen *RPS6KA3*, se decidió amplificar un fragmento que contuviera el exón 4 a partir de cDNA del paciente. Dado que este gen pertenece a una familia génica con 6 miembros, y que éstos presentan una homología considerable entre sí, se realizó previamente un alineamiento múltiple con las secuencias de los diferentes genes RSK (*RPS6KA1*, *RPS6KA2*, *RPS6KA3*, *RPS6KA4*, *RPS6KA5* y *RPS6KA6*), de manera que se pudieran diseñar cebadores que amplificaran específicamente la secuencia de interés del gen *RPS6KA3*. Con estos cebadores, situados en los exones 2 y 5, se procedió a amplificar sobre cDNA del paciente EX441, obteniéndose un producto de unas 200 bases, en lugar de las 270 esperadas. La

² Esta numeración corresponde a la secuencia inversa complementaria a la obtenida de forma experimental.

secuenciación del fragmento confirmó que la diferencia de tamaño se debía a la ausencia del exón 4 en el cDNA de EX441, debida sin duda a un fenómeno de *exon skipping*, puesto que el exón 4 está presente en su totalidad en el genoma del paciente. La desaparición del exón 4 a nivel de RNA mensajero provoca un cambio en la pauta de lectura del gen, generándose un codón de parada prematuro en el exón 5. La proteína queda, por tanto, truncada en el paciente, siendo responsable de la patología que éste presenta (Martínez-Garay *et al*, 2003). En la figura R18 se recogen estos resultados.

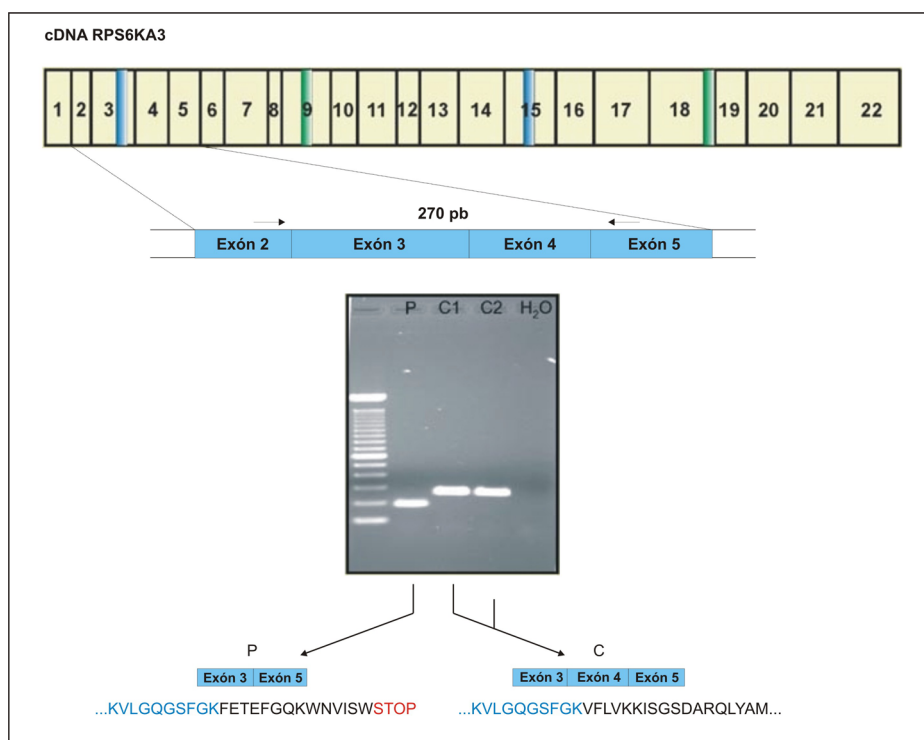


Fig. R18: Gel de agarosa con los productos generados por PCR sobre cDNA del paciente EX441 y de individuos control.

En la parte superior se muestra un esquema del gen *RPS6KA3*. Las barras verticales azules representan los dos dominios de unión a ATP y las verdes los dominios APE. En el gel de agarosa al 1.5% se han cargado los productos de una PCR realizada con cebadores diseñados sobre la pauta de lectura del gen *RPS6KA3*, en concreto en los exones 2 y 5. En ambos controles se observa la banda esperada de 270 pb, mientras que en la carrera correspondiente a EX441, la banda es más pequeña, de alrededor de 200 pb. El marcador empleado fue el 100 bp Ladder de Invitrogen y como control negativo para la PCR se usó H₂O. En la parte inferior se ve la composición de las bandas, obtenida tras la purificación y secuenciación de los productos de PCR. La banda en EX441 es más pequeña debido a la ausencia del exón 4, que sí está presente en los controles. Como consecuencia, la pauta de lectura del gen se ve alterada, apareciendo un codón de parada prematuro en EX441. Los aminoácidos derivados de las bases del exón 3, comunes al paciente y a los controles, aparecen en color azul.

Se pudo confirmar, por tanto, a nivel molecular, el diagnóstico clínico de Síndrome de Coffin-Lowry en el paciente EX441. La mutación que está provocando este fenotipo se ha producido *de novo* en el paciente, ya que el *Southern blot* indica que no estaba presente en ninguno de los cromosomas X de su madre.

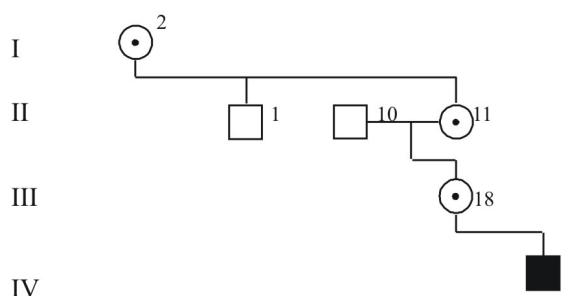
III. Síndromes de Prieto y Lenz: Región Xp11.4

III.1 Redefinición de la región de ligamiento en las familias fELX7 y fELX91

III.1.1 Familia fELX7

La región estudiada en Xp11.4 se ha determinado como resultado del análisis de ligamiento llevado a cabo en la familia fELX7, afectada por el síndrome de Prieto. Como ya se ha comentado en Material y Métodos, esta familia fue descrita en 1987 en la Unidad de Genética del Hospital La Fe de Valencia. En 1991 se publicó un estudio de ligamiento que situaba la región candidata a albergar el gen responsable de esta enfermedad entre los marcadores DXS255 en Xp11.22 y DXS84 en Xp21.1 (Watty *et al.*, 1991). A finales de 1999, cuando se comenzó este trabajo, nuevos marcadores analizados en la Unidad de Genética de La Fe habían permitido acotar la región candidata a un intervalo de 3,1 Mb entre los marcadores DXS8015, en Xp11.4 y DXS6810, en Xp11.3. Los marcadores DXS8012 y DXS993 aparecían ligados a la enfermedad en esta familia.

Para intentar acotar todavía más la zona a estudiar era necesario identificar nuevos marcadores polimórficos. Es importante destacar que en aquel momento todavía no se había publicado el primer borrador de la secuencia del genoma humano, y la información disponible, en cuanto a secuencia genómica, provenía de clones aislados que no siempre solapaban entre ellos y cuya secuencia generalmente era incompleta. Mediante búsquedas en bases de datos se pudo establecer un mapa de los clones secuenciados en la región y buscar repeticiones de di-, tri- o tetranucleótidos que permitieran su uso como marcadores microsatélites, seleccionando aquellas con un mayor número de repeticiones puras. En total se diseñaron los cebadores para 6 nuevas secuencias de tipo microsatélite (ver tabla M49), que fueron posteriormente analizados, junto a nuevos marcadores DXS en la familia fELX7. Su posición relativa respecto al resto de marcadores de la región, así como los resultados más relevantes de su análisis en la familia, pueden verse en la figura R19.



Distancia al telómero (Mb)	Marcador	I.2	II.1	II.10	III.18	IV.1
39,35	<i>Contig 1</i>	2,2	2	1	2,1	1
39,35	<i>Contig 2</i>	1,2	2	1	1,1	1
39,54	DXS8015	2,2	2	1	2,1	1
39,60	DXS8042	1,2	2	3	1,3	3
39,61	DXS1056	2,1	1	1	2,1	1
40,02	DXS1368	1,2	2	2	1,2	1
	<i>50A</i>	1,2	2	2	1,2	1
41,08	DXS8012	1,2	2	2	1,2	1
41,40	<i>BAC1</i>	1,2	2	3	1,3	1
42,01	<i>735</i>	1,3	1	2	1,2	1
	(DXS1201)					
	<i>308</i>	2,1	2	1	2,1	2
42,67	DXS6810	1,2	1	1	1,1	1

Fig. R19: Haplotipos empleados para acotar la región candidata en miembros clave de la familia fELX-7.

Se han señalado en rojo aquellos alelos con los que se evidencian las recombinaciones que han permitido delimitar el *locus* de la enfermedad. En el primer caso porque el paciente IV.1 ha heredado el haplotipo de su abuelo materno (II.10) y en el segundo caso porque un varón sano (II.1) presenta el haplotipo asociado a la enfermedad. Las distancias al telómero se han obtenido mediante NCBI Map Viewer, Build 35.1.

Estos datos permitieron, por tanto, situar la región candidata entre los marcadores DXS1056 y DXS1201, ambos en Xp11.4, reduciendo el tamaño de la zona a estudiar de 3,1 a 2,4 Mb.

III.1.2 Familia fELX91

En este caso el análisis de ligamiento también fue llevado a cabo en la Unidad de Genética del Hospital La Fe de Valencia, en la familia fELX91, con diagnóstico clínico de síndrome de Lenz. Se analizaron un total de 27 marcadores microsátelites, de los que posteriormente se seleccionaron los 22 que resultaron informativos para realizar el análisis de ligamiento multipuntual. A pesar de que el valor *lod* máximo, que fue obtenido para el marcador DXS993, apenas alcanzaba un valor de 1.0, pudo excluirse cualquier intervalo fuera de la región pericentromérica, dado que los valores *lod* eran inferiores a -2. La región candidata a albergar el gen mutado en esta familia quedó finalmente establecida entre los marcadores DXS8042, en Xp11.4 y DXS1275 en Xq13. Es importante destacar aquí que el individuo II.4, tío materno de los dos afectados, presentaba el haplotipo de riesgo y, sin embargo, no manifestaba ninguno de los síntomas de la enfermedad. Esto, además de contribuir significativamente al bajo valor *lod* para la zona de ligamiento, planteaba una serie de alternativas: (i) mosaicismo germinal en I.2 (abuela materna), como consecuencia de una mutación *de novo*, (ii) penetrancia incompleta de la mutación o (iii) herencia autosómica recesiva de la enfermedad. Se decidió asumir las hipótesis (i) y/o (ii) y centrarse en la región candidata obtenida para el cromosoma X.

Esta región, que abarca unas 28,7 Mb, solapaba en parte con la localización descrita por Ng y colaboradores (2002) en otra familia con síndrome de Lenz, en la que el análisis de ligamiento situaba como marcadores recombinantes, distal y proximal, a DXS985 y DXS6810, respectivamente. En la figura R20 se muestran las regiones candidatas definidas en las familias fELX7, fELX91 y la descrita por Ng *et al.* (2002), así como el solapamiento entre todas ellas.

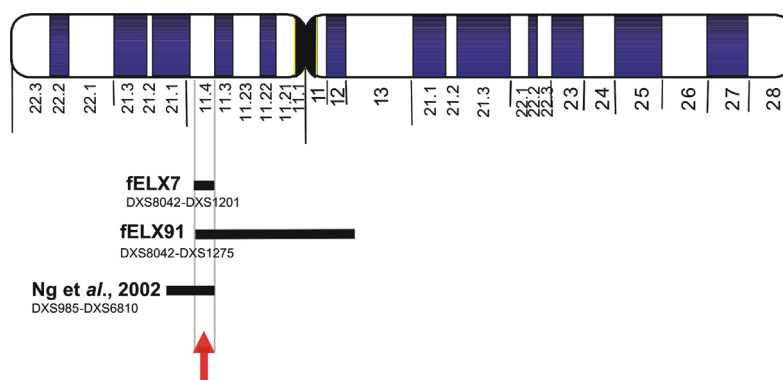


Fig. R20: Regiones de ligamiento de las familias fELX7, fELX91 y la descrita por Ng *et al.* en 2002.

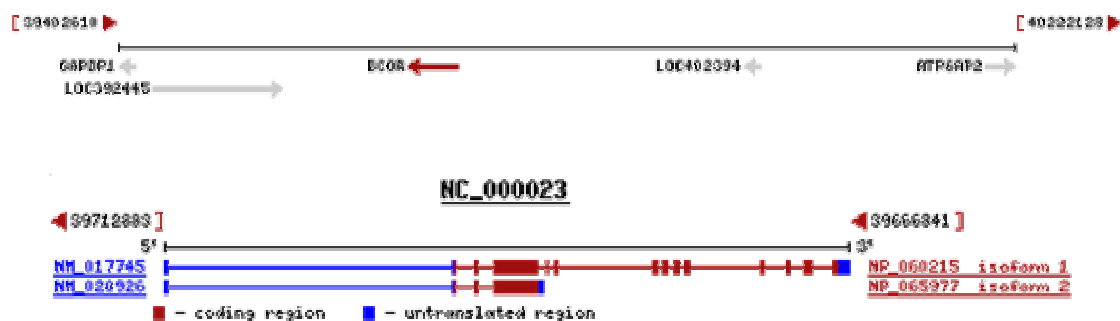
Las regiones candidatas para las diferentes familias aparecen como líneas horizontales gruesas en negro. La zona de solapamiento de las dos familias afectadas por el síndrome de Lenz (fELX91 y la descrita por Ng y colaboradores) coincide con la región de ligamiento en la familia afectada por el síndrome de Prieto, como indica la flecha roja.

Dado que la zona de solapamiento en ambas familias con síndrome de Lenz coincidía exactamente con la región a estudiar en la familia fELX7, se decidió incluir a los pacientes de la familia fELX91 en el análisis de mutaciones de los genes contenidos en la región, puesto que la coincidencia de dos familias con diagnóstico de Síndrome de Lenz en la misma zona hacía más probable la localización del gen responsable. El estudio de la familia fELX91 se inició, por tanto, en una región de 2,4 Mb en Xp11.4.

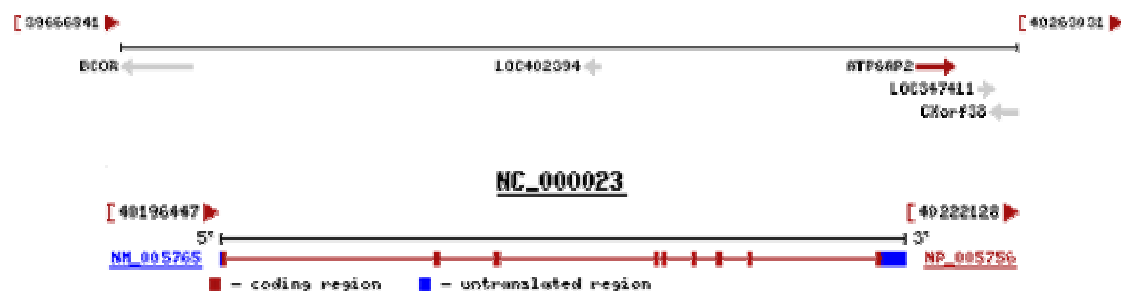
III.2 Identificación de los genes comprendidos en el intervalo DXS1056 - DXS1201

Al igual que en el estudio de las familias con retraso mental inespecífico en la región Xp22, también en este caso se realizaron búsquedas en bases de datos para identificar los genes contenidos en el intervalo DXS1056 - DXS1201. Además, en este caso contamos con la colaboración del grupo del Dr. Alfons Meindl, de la Universidad de Munich, que estaba elaborando un mapa de transcritos de la zona. El esquema que se seguirá a continuación para detallar los genes identificados en la zona es idéntico al empleado en el punto I.1.2: los genes aparecen en orden Xpter.→Xqter. y se indican las características principales de cada uno, así como las razones para su análisis o su exclusión del estudio. También se incluyen los esquemas del entorno cromosómico del gen y de su estructura genómica. Todos aquellos que han sido elegidos como candidatos se han analizado por secuenciación.

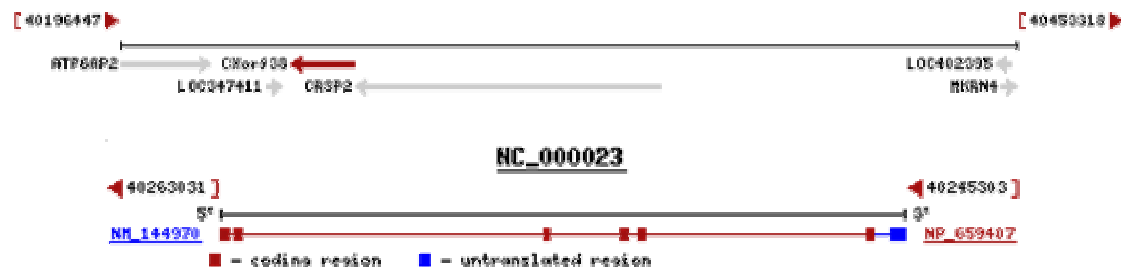
BCOR (*BCL-6 interacting corepressor*): este gen codifica un corepresor transcripcional que interacciona con el dominio POZ del represor BCL-6 (Huynh *et al.*, 2000). Esta proteína también puede asociarse a complejos proteicos con actividad histona deacetilasa (HDACs), tanto de clase I, como de clase II (Huynh *et al.*, 2000), lo que implica que la deacetilación de histonas podría ser el mecanismo que medie la represión transcripcional por parte de BCOR. Algunas isoformas de BCOR interaccionan, además, con la proteína AF9, que actúa como activador transcripcional en ensayos *in vitro* y que aparece fusionada frecuentemente al producto del gen *MLL* en las leucemias mieloides agudas (Srinivasan *et al.*, 2003). Recientemente, se ha descrito que las mutaciones en *BCOR* provocan el síndrome OFCD, una rara enfermedad dominante ligada al cromosoma X, con letalidad masculina y caracterizada por anomalías Oculares, Faciales, Cardíacas y Dentales (Ng *et al.*, 2004). Asimismo, estos autores identificaron el cambio P85L, que segrega en la familia, afectada por el síndrome de Lenz, descrita en 2002 (Ng *et al.*, 2002).



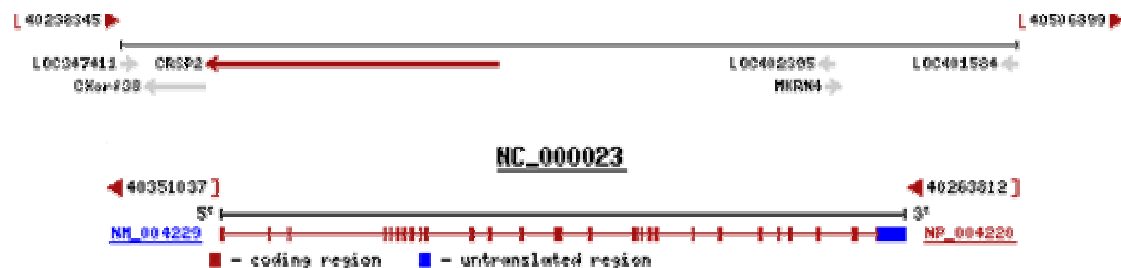
ATP6AP2 (*ATPase, H⁺ transporting, lysosomal accessory protein 2*): este gen fue publicado de forma independiente por dos grupos, apareciendo como proteína asociada M8-9 del sector de membrana de la ATPasa protónica vacuolar (Demirci *et al.*, 2001) y como receptor de la renina (Nguyen *et al.*, 2002), que es una proteína que no actúa únicamente como enzima, sino también como ligando. El sistema renina-angiotensina ejerce diferentes funciones en el cerebro y parece que juega un papel en la memoria. Además, recientemente ha sido publicado un cambio sinónimo en este gen (c.321C>T, p.D107D) que altera un sitio activador del procesado (*exonic splicing enhancer*), provocando la aparición de un transcrito adicional que carece del exón 4. Este cambio es el responsable del fenotipo de la familia K8355, afectada por retraso mental y epilepsia (Ramser *et al.*, 2005).



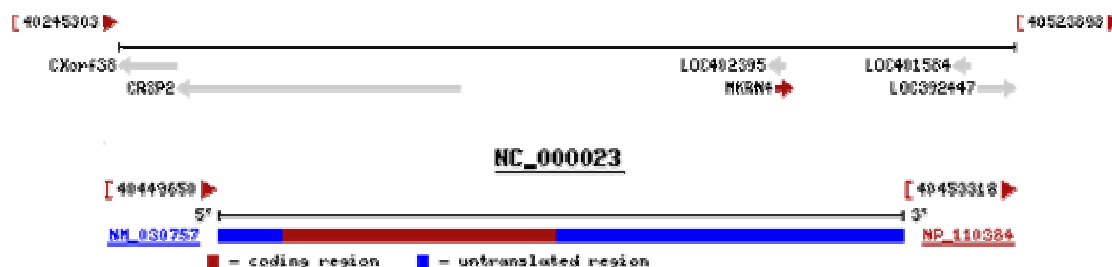
CXorf38: también llamado *MGC39350*. Codifica una proteína de 319 aminoácidos de función desconocida, pero presente en otros organismos como chimpancé, ratón y rata. No presenta dominios funcionales conocidos, ni homologías a otras proteínas humanas ya descritas.



CRSP2 (*cofactor required for SP1 transcriptional activation, subunit 2*): también llamado *EXLM1*, *DRIP150*, *TRAP170* y *hRGR1*. Este gen, que escapa a la inactivación del cromosoma X (Yoshikawa *et al.*, 1998), codifica una proteína que forma parte de numerosos complejos multiproteicos implicados en la regulación de la transcripción. En concreto, se ha encontrado como componente de: (i) el complejo DRIP-TRAP, que se une de forma dependiente de ligando a las regiones AF-2 de los receptores de vitamina D (Rachez *et al.*, 1998 y 1999) y hormona tiroidea (Fondell *et al.*, 1996), (ii) el complejo NAT, que está implicado en represión transcripcional (Sun *et al.*, 1998), (iii) el complejo coactivador ARC, necesario para la transactivación por parte de otros factores transcripcionales (Näär *et al.*, 1998 y 1999), (iv) el complejo CRSP, necesario para la activación por parte de Sp-1 (Ryu *et al.*, 1999) y (v) el complejo SMCC (Gu *et al.*, 1999). Además esta proteína también interacciona con el receptor de glucocorticoides, potenciando su transactivación (Hittelman *et al.*, 1999).



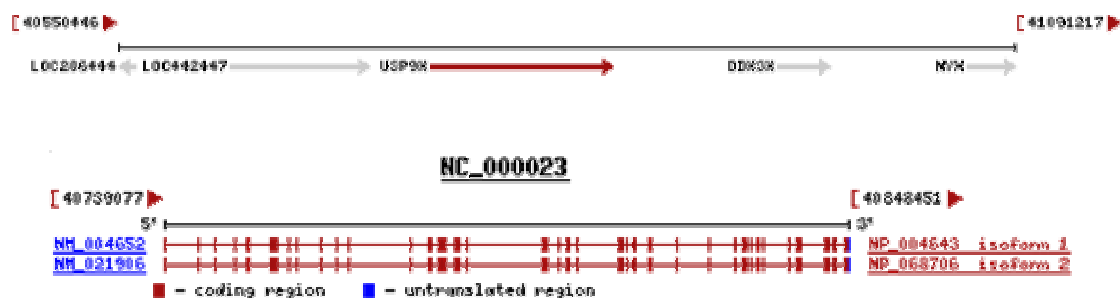
MKRN4 (*Makorin ring finger protein 4*): está considerado actualmente como un pseudogen derivado de *MKRN1* y que forma parte de una familia génica que codifica proteínas con dedos de zinc (Gray *et al.*, 2000). A pesar de que la secuencia de este pseudogen presenta una pauta abierta de lectura que podría codificar una proteína de 485 aminoácidos (frente a los 482 de *MKRN1*), no existe ningún EST en las bases de datos que presente una homología del 100% con esta secuencia. Sin embargo, dado su potencial codificante, ha sido analizado por secuenciación en los pacientes.



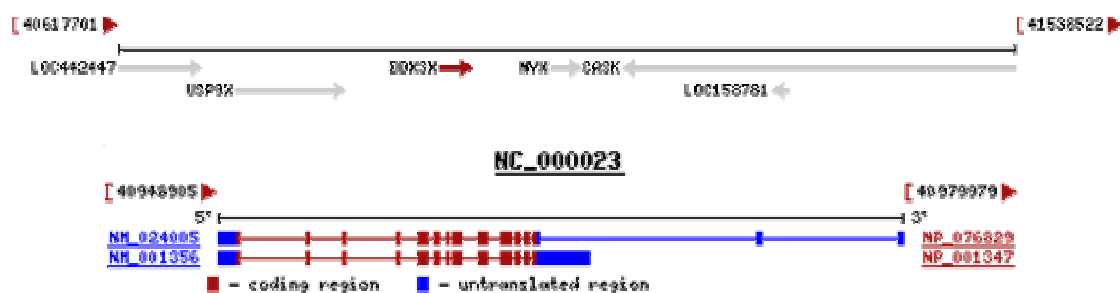
LOC401584: se trata muy probablemente de un pseudogen derivado del gen *SDCBP*, localizado en 8q12 y que codifica la proteína sintenina (syndecan binding protein). Hay dos razones que apoyan esta hipótesis: *SDCBP* está formado por 9 exones y codifica una proteína de 298 aminoácidos que presenta dos dominios PDZ (Grootjans *et al.*, 1997). Sin embargo, *LOC401584* sólo tiene 2 exones, agrupando las primeras 1000 bases en uno de ellos. Además, su pauta de lectura queda interrumpida con respecto a la de *SDCBP* por un codón de parada que interrumpe el primer dominio PDZ, dejando una proteína de 112 aminoácidos. Por último, ningún EST de las bases de datos muestra una similitud de secuencia del 100% con la secuencia de *LOC401584*. Por tales razones, este pseudogen no ha sido analizado en los pacientes.



USP9X (*ubiquitin specific protease 9, X-linked*): también llamado *DFFRX*. La proteína codificada por este gen es una ubiquitin-proteasa específica de sustrato (Huang *et al.*, 1995), identificada por primera vez en *Drosophila melanogaster* (Fischer-Vize *et al.*, 1992). Como sustratos se han descrito: (i) el producto del gen *liquid facets* (Cadavid *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002), homólogo de la proteína epsina de vertebrados y que relacionaría a *USP9X* con la vía endocítica, y (ii) las proteínas AF-6, β -catenina (Taya *et al.*, 1998 y 1999) y E-cadherina (Murray *et al.*, 2004), que la relacionarían con fenómenos de adhesión celular y tráfico de proteínas. Recientemente se ha descubierto que *USP9X* interacciona también con la proteína doblecortina (Friocourt *et al.*, 2005), que es una proteína asociada a microtúbulos y que actúa en la migración neuronal, provocando lisencefalia ligada al cromosoma X y heterotopia subcortical laminar (SCLH) cuando está mutada. Existen dos transcritos alternativos para este gen, que se diferencian por una delección en pauta de 48 nucleótidos en el exón 42.



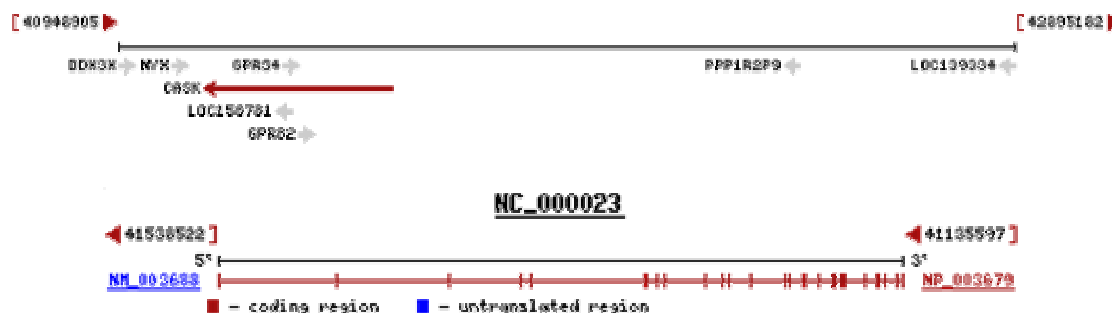
DDX3X (*DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked*): este gen codifica una RNA helicasa que forma parte de la familia de proteínas con caja DEAD (Lahn y Page, 1997; Park *et al.*, 1998). Este gen escapa a la inactivación del cromosoma X y presenta un homólogo funcional en el cromosoma Y (Lahn y Page, 1997). La proteína DDX3 interacciona con la proteína core del virus de la hepatitis C (Owsianka y Patel, 1999) y recientemente se ha comprobado que participa en la exportación de transcritos no procesados del virus HIV desde el núcleo al citoplasma (Yedavalli *et al.*, 2004). Su papel en las células no infectadas no está claro todavía, pero se ha identificado a DDX3 como componente de un gránulo, cuya función parece ser la de transportar RNA en dendritas. Las proteínas KIF5 (una kinesina) y dineína serían las encargadas del movimiento del gránulo (Kanai *et al.*, 2004).



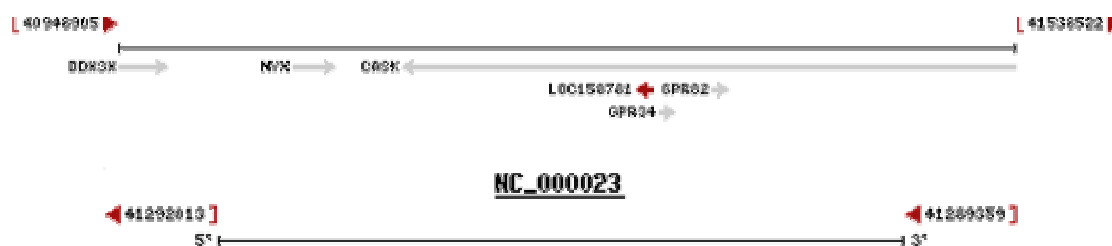
NYX (*nyctalopin on X chromosome*): este gen codifica la nictalopina, una proteína de 481 aminoácidos perteneciente a la familia SLRP (small leucine-rich proteoglycan), que provoca ceguera nocturna estacionaria congénita (CSNB1) cuando está mutada (Bech-Hansen *et al.*, 2000; Pusch *et al.*, 2000). Se trata de una proteína de superficie, que se mantiene unida a la membrana celular a través de un anclaje tipo GPI (Zeitz *et al.*, 2003). Dado el amplio espectro de mutaciones identificadas en pacientes con CSNB1 y teniendo en cuenta que la ceguera nocturna no es uno de los síntomas de los síndromes de Prieto y de Lenz, no se ha considerado como gen candidato en este trabajo.



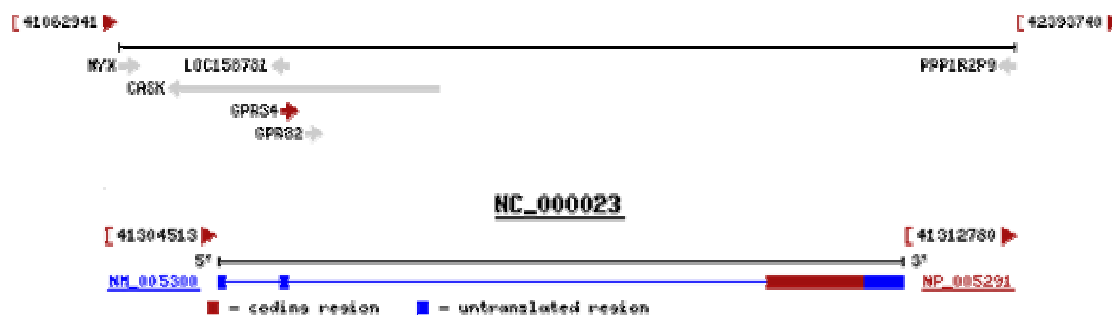
CASK (*calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase -MAGUK family*): la proteína codificada por este gen fue identificada por su capacidad de interactuar con el dominio intracelular de las β -neurexinas (Hata *et al.*, 1996). Se trata de una proteína de andamiaje, con dominios CamKII, L27, PDZ, SH3, HOOK y GUK, que se expresa principalmente en cerebro y que es capaz de interactuar con numerosas proteínas, formando macrocomplejos proteicos. Además de con las neurexinas, CASK interactúa con Syndecan 2 y 3 (Hsueh *et al.*, 1998; Hsueh y Sheng, 1999), con la proteína 4.1 (Cohen *et al.*, 1998), con la subunidad α_{1B} del canal de calcio presináptico de tipo N (Maximov *et al.*, 1999), y forma un complejo tripartito muy conservado evolutivamente con las proteínas Mint1 y Velis (Butz *et al.*, 1998). También interactúa con rafilina3a (Zhang *et al.*, 2001), con Parkina (Fallon *et al.*, 2002), con Caskina (Tabuchi *et al.*, 2002) y con SAP97 (Lee *et al.*, 2002). Muchas de estas interacciones tienen lugar en los terminales presinápticos, donde la proteína CASK jugaría un papel importante como organizador y conector de proteínas implicadas en diversos procesos: despolarización de la membrana, exocitosis de vesículas sinápticas, etc. Además, CASK interactúa con el factor de transcripción Tbr-1, implicado en el desarrollo del prosencéfalo (Hsueh *et al.*, 2000), y esta interacción provoca que sea traslocado al núcleo, donde actúa como coactivador de Tbr-1. En esta función interviene también la proteína CINAP, que actúa en el ensamblaje de nucleosomas (Wang *et al.*, 2004). Todas estas características hacen de CASK un buen candidato para los síndromes de Prieto y/o de Lenz, y este gen fue analizado en ambas familias.



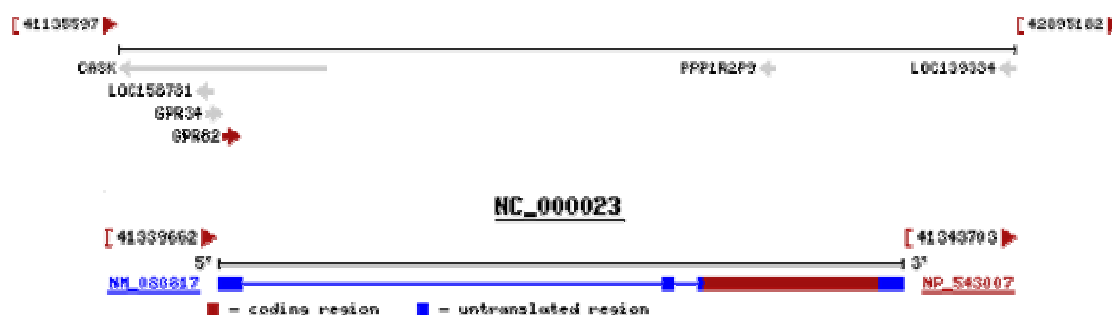
LOC158781 (*tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta pseudogene*): a pesar de que en la base de datos aparece como pseudogen y de que no se encuentran ESTs con un 100% de homología de secuencia, en el "22. Treffen Norddeutscher Humangenetiker" del 10 de mayo de 2003, un grupo de la Universidad de Rostock presentó evidencias de su expresión en placenta, hígado, cerebro y riñón. Además, la secuencia de este gen, sin intrones, conserva el potencial de codificar una proteína de 245 aminoácidos, que es el tamaño de la proteína 14-3-3-zeta. Estas proteínas contribuyen a la regulación de procesos celulares cruciales, tales como metabolismo, transducción de señales, control del ciclo celular, apoptosis, tráfico de proteínas, transcripción, respuestas al estrés y transformación tumoral (revisado en Dougherty y Morrison, 2004). Por estas razones ha sido considerado candidato en este trabajo.



GPR34 (*G protein-coupled receptor 34*): codifica un receptor acoplado a proteína G, para el que se desconoce el ligando (Marchese *et al.*, 1999; Schöneberg *et al.*, 1999). Los receptores acoplados a proteína G están formados por 7 segmentos transmembrana, unidos por 3 lazos extracelulares y 3 intracelulares, y pueden ser activados por un gran número de ligandos. La unión del ligando al receptor induce un cambio conformacional, y el receptor activa a una proteína G que interaccionará con más efectores. Este gen ha sido analizado por secuenciación en los pacientes.



GPR82 (*G protein-coupled receptor 82*): este gen codifica también un receptor acoplado a proteína G para el que se desconoce el ligando (Lee *et al.*, 2001) y ha sido secuenciado en los pacientes.



Además de los genes descritos, presentes todos ellos en la base de datos EntrezGene del NCBI, se han analizado otros dos posibles transcritos, identificados combinando la información del buscador genómico UCSC y la de la base de datos Aceview (perteneciente también al NCBI) que, como se ha descrito en Material y Métodos, ofrece una visión integrada de los genes humanos, reconstruyéndolos por alineamiento de todas las secuencias de mRNAs y ESTs disponibles públicamente. Se trata de los genes *LAVA* y *TNRC38*.

LAVA: este posible gen abarca 3,31 kb a nivel genómico y contiene un intrón. Se le predice un mRNA de 903 pb, pero los resultados obtenidos mediante *Northern blot* muestran un transcrito de tamaño mucho menor (ver III.6). Su secuencia se basa en la de 12 clones de cDNA y como aspecto más relevante cabe destacar que solapa a lo largo de 205 pb con el gen *CRSP2* en cadenas complementarias. Esta disposición en el genoma queda reflejada en la figura R21. En los pacientes se han secuenciado ambos exones y gran parte de la región 3' no traducida.

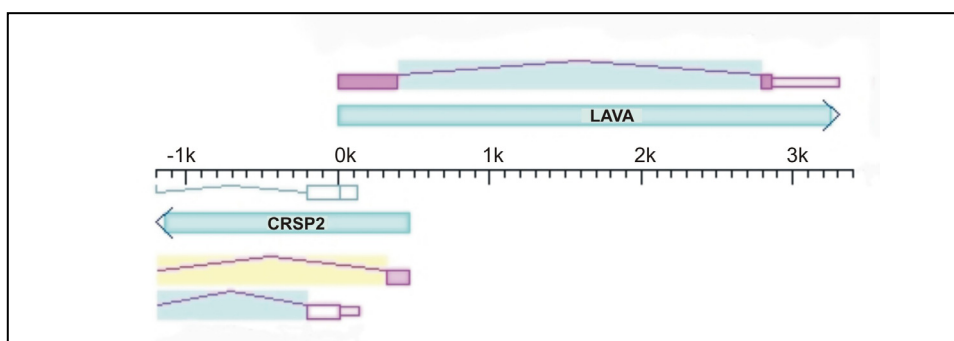


Fig. R21: Esquema de la posición relativa de los genes *LAVA* y *CRSP2*.

Este esquema se ha generado modificando una figura obtenida de la base de datos Aceview. Las flechas azules indican los genes, aunque *CRSP2* no se muestra en su totalidad. Para el gen *LAVA*, los exones aparecen como cajas moradas y las regiones no traducidas como cajas más estrechas. En el caso de *CRSP2*, las cajas blancas de la parte superior (delineadas en azul) indican el transcrito anotado en EntrezGene, la línea intermedia sombreada en amarillo corresponde a un transcrito alternativo, y la inferior (cajas blancas delineadas en morado) al transcrito más largo anotado en la base de datos Aceview, que coincide en este caso con el del NCBI. Nótese que para el gen *LAVA* no aparece el símbolo correspondiente a un transcrito anotado en EntrezGene.

TNRC8 (*trinucleotide repeat containing 8*): en este caso, el posible gen carece de intrones y abarca 3,75 kb a nivel genómico. En la base de datos Aceview, se le denomina actualmente *hura* y, aunque se le puede encontrar en EntrezGene como *TNRC8*, no existe ninguna secuencia de referencia para él, ni aparece en la región Xp11.4 cuando se usa el programa MapViewer (como puede comprobarse en la figura R23). A pesar de que se le predice una pauta abierta de lectura de sólo 183 bp, su secuencia se basa en la de 50 clones de cDNA. Como característica más importante, posee una repetición CTG en su extremo 5', que fue identificada por Margolis y colaboradores en 1997. Además, determinadas regiones presentan un alto grado de conservación entre especies, como puede apreciarse en la figura R22. En los pacientes se ha analizado la zona de la repetición, así como la posible pauta de lectura.

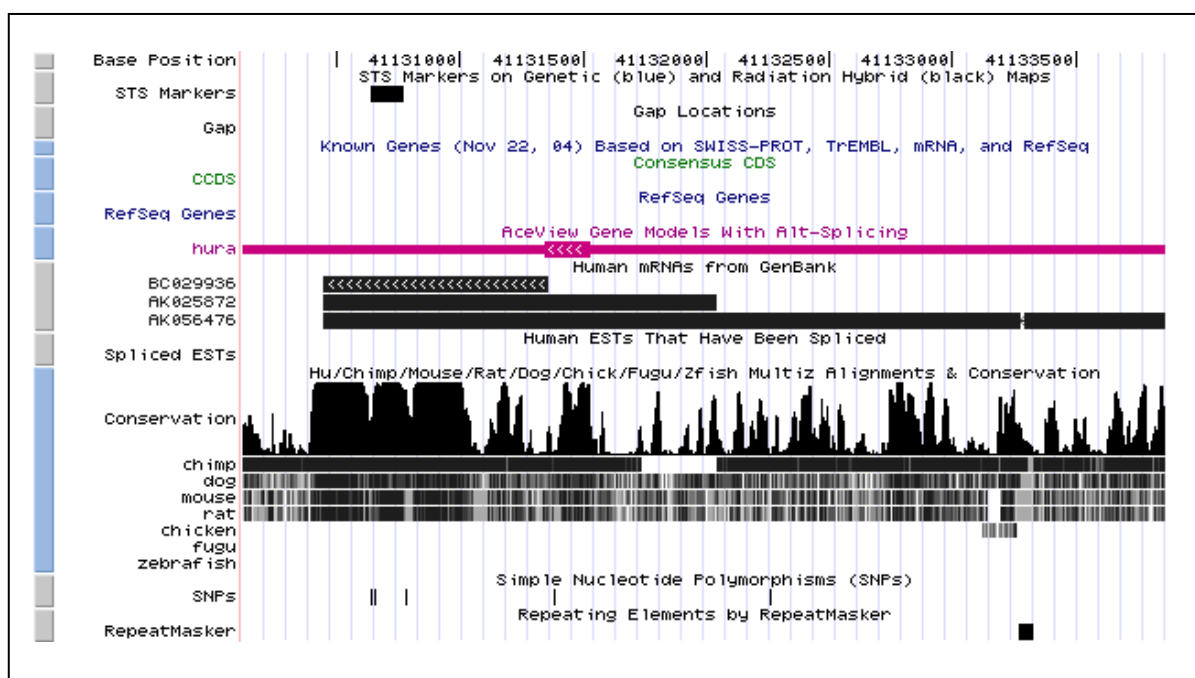


Fig. R22: Información contenida en el buscador genómico UCSC para el gen *TNRC8* (*hura*).

Esta figura corresponde a la ventana que se obtiene en el buscador UCSC al acceder desde la página de información de Aceview sobre *hura*. El gen, con su posible pauta de lectura, aparece en morado en la parte central de la ventana. Justo debajo se ven tres de los clones de cDNA que avalan la secuencia de este posible gen y a continuación se puede observar el grado de conservación a nivel nucleotídico en diversos organismos. Es evidente que, sobre todo en su parte 5', la secuencia está muy conservada en aquellos organismos para los que se dispone de datos.

En resumen, se han analizado en Xp11.4 un total de 9 genes, dos secuencias catalogadas como pseudogenes y dos transcritos adicionales obtenidos de la base de datos Aceview. Se ha descartado el gen *NYX* por su implicación en la ceguera nocturna estacionaria congénita y el gen *LOC401584*, para el que todos los indicios apuntan a que se trata de un pseudogen. Quedan en esta región, además, 6 predicciones de posibles genes: *LOC402394*, *LOC347411*, *LOC402395*, *LOC392447*, *LOC286444*, *LOC442447*. Dado que dichas predicciones no han sido confirmadas hasta el momento, en el presente trabajo no se ha abordado su análisis. La figura R23 muestra la totalidad de la zona analizada, así como los genes que contiene. Al haberse obtenido con el programa MapViewer, los dos transcritos identificados en Aceview no quedan reflejados.

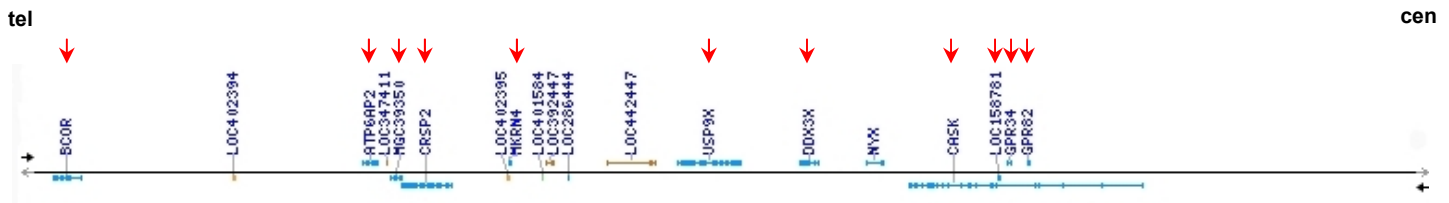


Fig. R23: Mapa de la región analizada en Xp11.4.

Este mapa se ha obtenido con el programa MapViewer. Los genes aparecen a un lado u otro de la línea central, que representa el cromosoma X, según se transcriban en dirección Xpter.→Xqter. o viceversa. Las flechas rojas señalan aquellos genes que han sido analizados en este trabajo.

III.3 Análisis de mutaciones de los genes candidatos

Los resultados del análisis de mutaciones en los genes descritos en el apartado anterior se presentan nuevamente en forma de tabla para una mayor claridad. Las posiciones de los cambios se indican siempre respecto al codón de inicio de la secuencia de referencia, considerando la A del ATG como posición +1. En este caso sólo se indican los cambios identificados en las regiones codificantes y regiones 5' y 3' no traducidas de los genes, ya que siempre que fue posible se realizó el análisis sobre cDNA.

Al igual que en el caso de los genes analizados en Xp22, casi todos los cambios identificados aquí estaban también presentes en la base de datos dbSNP o bien aparecían en otras secuencias al realizar un análisis con el programa BLAST. Únicamente la variante c.2048G>A (p.Arg683His), identificada en el exón 16 del gen *CRSP2* en un paciente con síndrome de Prieto, no pudo hallarse en ninguna secuencia de las bases de datos. Por tanto, se analizaron, mediante SSCPs, más de 200 cromosomas X procedentes de individuos control, sin que ninguno de ellos presentara el cambio. Sin embargo, se descartó que se tratase de una mutación patológica, ya que no segrega con la enfermedad en la familia fELX7, como muestra la siguiente figura.

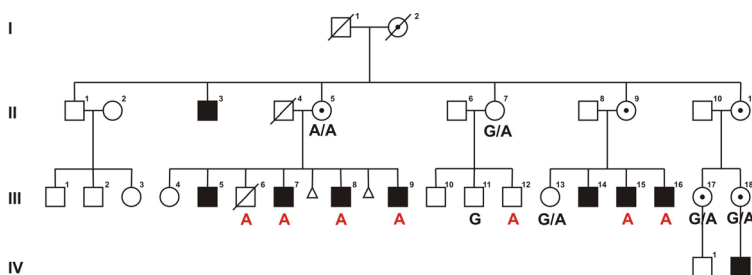


Fig. R24: El cambio c.2048G>A en el gen *CRSP2* no segrega con la enfermedad en la familia fELX7.

Tres personas sanas de la familia fELX7 presentan el cambio c.2048G>A en hemi- u homocigosis: la mujer II-5 y los individuos III-6 y III-12, pudiéndose descartar, por tanto, como mutación patológica.

Gen	Cambios	Familias	Presencia en bases de datos o muestras control
<i>BCOR</i> (NM_017745.4)	c.-223G>C	fELX7	presente en AL591802.28 (clon RP11-330L22), AL699019.1 (clon de cDNA DKFZp686K09111), AL698729.1 (clon de cDNA DKFZp686C0410)
	c.1692A>G (p.Ala564)	fELX7	dbSNP RS# cluster id: rs6520618, comprobado por digestión en 20 controles con <i>Sau96I</i>
<i>ATP6AP2</i> (NM_005765.2)	c.268C>G (p.Pro90Ala)	fELX7	dbSNP RS# cluster id: rs9014
<i>CXorf38</i> (NM_144970.1)	---	---	---
<i>CRSP2</i> (NM_004229.2)	c.525T>C (p.Asp175)	fELX7, fELX91	presente en BP312958.1 (clon de cDNA OFR01638), BP312937.1 (clon de cDNA OFR01539), BF515574.1 (IMAGE:3083227), ...
	c.2048G>A (p.Arg683His)	fELX7	no aparece en ningún clon, pero NO segrega con la enfermedad en la familia
<i>MKRN4</i> (NG_004713.1)	---	---	---
<i>USP9X</i> (NM_004652.2)	c.74T>A (p.Leu25Gln)	fELX7, fELX91	presente en CR744120.1 (clon IMAGE:1755832), BX956755.1 (clon de cDNA DKFZp781M2290), CN287334.1, ...
	c.440_441insTATTATTAACAATACTCATCG	fELX7, fELX91	presente en CN287334.1, BX956755.1 (clon de cDNA DKFZp781M2290), CA446388.1, BE079462.1, ...
	c.1382C>T (p.Pro461Leu)	fELX7, fELX91	presente en AA261797.1 (clon IMAGE:685373) y AA248344.1
	c.1405C>T (p.Arg469Trp)	fELX7, fELX91	presente en AL391259.15 (clon RP11-469E19), AC006121.1 (clon hCIT.200_L_4), AA261797.1 (clon IMAGE:685373), ...
	c.1496G>A (p.Arg499Lys)	fELX7, fELX91	dbSNP RS# cluster id: rs1050164

Tabla R3: Resultados del análisis de mutaciones llevado a cabo en los genes candidatos de la región Xp11.4 en las familias fELX7 y fELX91.

Gen	Cambios	Familias	Presencia en bases de datos o muestras control
<i>USP9X</i> (NM_004652.2) (continuación)	c.1841T>C (p.Val614Ala)	fELX7, fELX91	presente en CD657533.1 (clon IMAGE:30422528), BE925875.1, BE925861.1, AW996853.1, ...
	c.4177T>C (p.Phe1393Leu)	fELX7, fELX91	dbSNP RS# cluster id: rs1050165, comprobado por digestión con <i>Asp700I</i> en 9 controles
	c.5831C>T (p.Pro1944Leu)	fELX7, fELX91	presente en AL109797.18 (clon RP5-1172N10), AU128750.3 (clon de cDNA NT2RP2004114), CV570321.1 (clon de cDNA od15g07), ...
	c.6967C>A (p.Pro2323Thr)	fELX7, fELX91	presente en BC046205.1 (clon IMAGE:6175281), BC063645.1 (clon IMAGE:4538919), CR614660.1 (clon de cDNA CSODF029YB05), ...
<i>DDX3X</i> (NM_001356.2)	c.149G>A (p.Arg50Lys)	fELX7, fELX91	secuenciado en un control, presente en AL391647.16 (clon RP13-13A3), BC011819.2 (clon IMAGE:3617040), ...
	c.852A>G (p.Glu284)	fELX7, fELX91	presente en AB208983.1, BC011819.2 (clon IMAGE:3617040) y AF061337.1
	c.+82T>C	fELX7, fELX91	presente en AL391647.16 (clon RP13-13A3), BC011819.2 (clon IMAGE:3617040) y AF061337.1
<i>CASK</i> (NM_003688.1)	c.1016_1035delGCTTCTAGCAGCAGAAAG	fELX7, fELX91	presente en BP264716.1, BP240363.1, CN261640.1, ...
	c.1436G>A (p.Gly479Asp)	fELX7, fELX91	dbSNP RS# cluster id: rs1141273
	c.2023T>C (p.Ser675Pro)	fELX7, fELX91	presente en dos muestras control y en CD655342.1 (clon IMAGE:30425985), BQ879446.1 (clon IMAGE:6186100), ...
	c.2155_2156insTGTTTGATCAATTAG	fELX7, fELX91	presente en BC035990 (clon IMAGE:4334367), BG499598.1 (clon IMAGE:4669285), CN261639.1, ...
	c.2324G>A (p.Arg775Lys)	fELX7, fELX91	presente en BC035990.1 (clon IMAGE: 4334367), BG697584.1 (clon IMAGE:4803989), BG499598.1 (clon IMAGE:4669285), ...
<i>LOC158781</i> (NG_001562.1)	---	---	---

Tabla R3 (continuación): Resultados del análisis de mutaciones llevado a cabo en los genes candidatos de la región Xp11.4 en las familias fELX7 y fELX91.

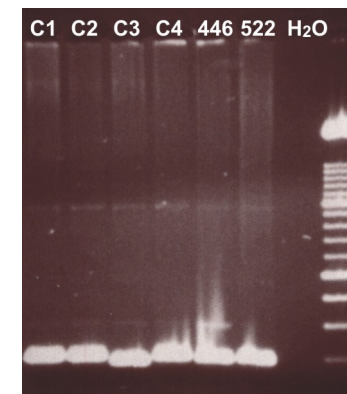
Gen	Cambios	Familias	Presencia en bases de datos o muestras control
<i>GPR34</i> (NM_005300.2)	---	---	---
<i>GPR82</i> (NM_080817.2)	---	---	---
<i>LAVA</i> (BC039399)	608C>T	fELX7, fELX91	presente en AC092474.3 (clon RP11-169L17)
<i>TNRC8</i> (AM sequence hura (3488bp) de Aceview)	---	---	---

Tabla R3 (continuación): Resultados del análisis de mutaciones llevado a cabo en los genes candidatos de la región Xp11.4 en las familias fELX7 y fELX91.

Para el gen *TNRC8* se comprobó también si la zona de la repetición GAC, presente en su extremo 5', había sufrido alguna expansión en los pacientes. Como se aprecia en la siguiente figura (figura R25), se obtienen amplificados de tamaño muy similar tanto en muestras de controles, como de pacientes, descartándose la posibilidad de una mutación dinámica.

Fig. R25: Gel de agarosa con los productos de una PCR con cebadores flanqueantes a la repetición [CAG]_n en *TNRC8*.

Se llevó a cabo una PCR con cebadores que flanqueaban la repetición [CAG]_n en *TNRC8*. Los controles 1 y 2 son mujeres, los 3 y 4 varones. Todas las bandas presentan un tamaño similar, de unas 200 pb, a excepción del control 3, en el que la banda tiene un tamaño ligeramente inferior, lo que sugiere que existe una cierta variabilidad en el número de repeticiones.



Es importante resaltar también que, durante el análisis del gen *CASK*, se puso de manifiesto la existencia de múltiples transcritos alternativos, ya que al realizar amplificaciones con los cebadores *CASK-3F* y *CASK-3R*, aparecían siempre varias bandas en el gel de comprobación del producto. Se procedió, por ello, a clonar dichos amplificados para así poder obtener las secuencias de los diferentes transcritos por separado. Los resultados obtenidos se recogen en la figura R26.

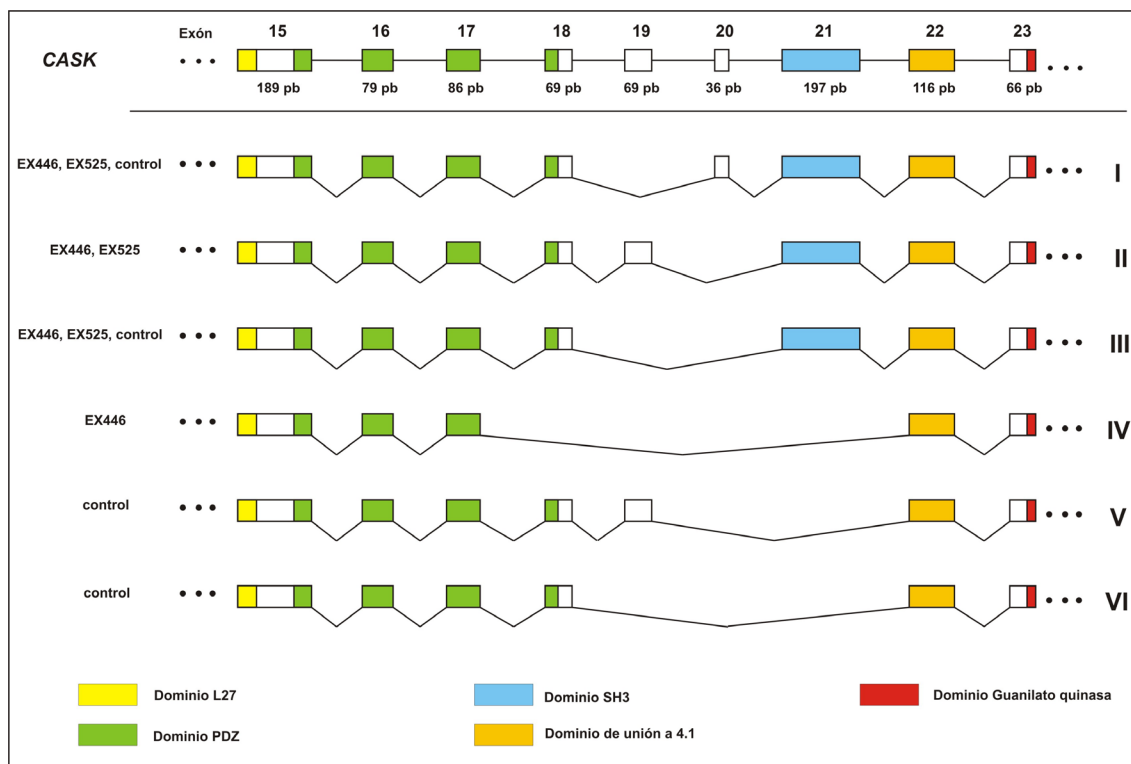


Fig. R26: Transcritos alternativos identificados para el gen *CASK*.

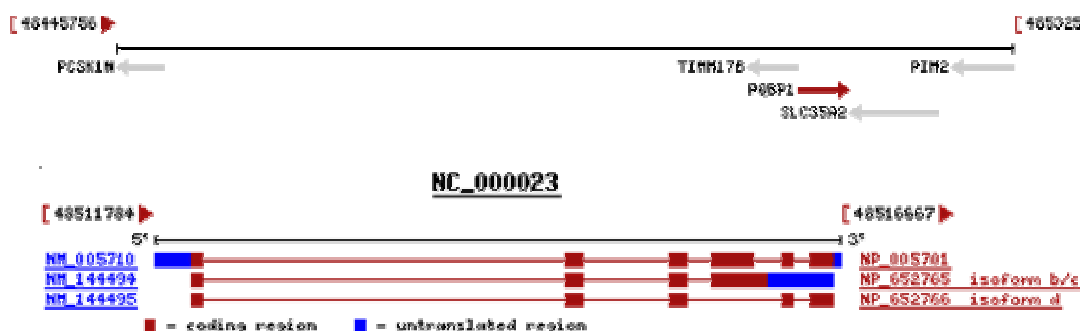
De los 27 exones del gen *CASK*, se han representado como cajas los exones 15 a 22, marcando en colores los diferentes dominios que codifican en la proteína los aminoácidos derivados de cada uno de ellos. A la izquierda de cada transcrito se indica la procedencia de la muestra de la que proviene el transcrito: EX446 pertenece a la familia fELX7 y EX525 a la familia fELX91.

Como puede observarse, los exones 19 y 20, que son los que suelen desaparecer en los transcritos alternativos, no suponen un desplazamiento de la pauta de lectura ni la pérdida de algún dominio funcional a nivel proteico. La ausencia del exón 19 (variante I) supone la desaparición de 23 aminoácidos, la del exón 20 (variante II) genera una proteína con 12 residuos menos, y en el caso de que ambos estén ausentes (variante III) se pierden 35 aminoácidos. Estas tres variantes son las que se han detectado con mayor frecuencia, mientras que las tres restantes (variantes de la IV a la VI) se identificaron en una única ocasión. Estas últimas sí provocan un cambio en la pauta de lectura del gen, dando como resultado proteínas de menor tamaño, con un nuevo extremo C-terminal. La variante IV generaría una proteína idéntica a *CASK* en sus primeros 556 aminoácidos, añadiéndose a continuación un fragmento de 30 residuos nuevos. Cuando desaparecen los exones 19 a 21 (variante VI), la proteína resultante es igual a *CASK* hasta el aminoácido 579, tras el cual aparecerían los mismos 30 aminoácidos nuevos que en el caso anterior. Y por último, en la variante V, el resultado es una proteína idéntica a *CASK* hasta la posición 602, seguida de nuevo de los 30 residuos nuevos que ya aparecían en los dos transcritos anteriores. Hay que destacar que, tanto en los pacientes como en los controles, no se identificó ningún transcrito que contuviera todos los exones.

III.4 Análisis del gen *PQBP1* en la familia fELX91, afectada por el síndrome de Lenz

Como se ha comentado en el punto III.1.2, el análisis en la familia fELX91 se inició en la región DXS1056-DXS1201, que abarca 2,4 Mb en Xp11.4, debido al solapamiento entre las regiones candidatas para esta enfermedad en esta familia y en la descrita por Ng y colaboradores (2000). El análisis de mutaciones de todos los genes descritos hasta el momento en el intervalo citado, incluido *BCOR* -asociado recientemente al síndrome de Lenz (Ng *et al.*, 2004)-, no permitió identificar ningún cambio patológico en los pacientes de la familia fELX91.

Se decidió, por tanto, considerar el análisis de otros genes, más allá de la región de solapamiento ya descrita (ver figura R20). La región candidata en fELX91 se extiende en dirección centromérica, abarcando incluso parte del brazo largo del cromosoma. Un buen candidato parecía el gen *PQBP1* (*polyglutamine binding protein 1*), situado en Xp11.23. Este gen, también llamado *Npw38*, está formado por 6 exones y codifica una proteína de localización predominantemente nuclear. Ésta contiene varios dominios funcionales, entre ellos (i) un dominio WW, capaz de interactuar con motivos ricos en prolina presentes en otras proteínas, (ii) un dominio rico en aminoácidos polares que interactúa con trectos de poliglutamina, y (iii) un dominio C2, que media la interacción con la proteína U15-15kD (Waragai *et al.*, 1999; 2000). No obstante, lo que hacía de este gen un buen candidato es que se han descrito mutaciones en su pauta de lectura que provocan retraso mental inespecífico (Kalscheuer *et al.*, 2003), síndromes de Sutherland-Haan y de Hamel (Kalscheuer *et al.*, 2003) y síndrome de Renpenning (Lenski *et al.*, 2004). Aparte del retraso mental, otros síntomas descritos en pacientes con mutaciones en *PQBP1* aparecen también en los individuos afectados de la familia fELX91: talla corta, microcefalia y diplegia espástica. Por ello, se abordó el análisis de mutaciones por secuenciación de los 6 exones en el paciente EX522.



Dada la existencia de transcritos alternativos que incluyen parte del intrón 4 en la pauta de lectura, la estrategia empleada en el análisis consistió en amplificar a partir de DNA genómico los exones 1, 2 y 3 de forma independiente y los exones 4 a 6 en un único producto. Todos estos amplificados fueron purificados y secuenciados a continuación, pudiéndose identificar una delección de 2 pb, en concreto c.461_462delAG, en el paciente EX522. Esta delección afecta a una secuencia de 6 dinucleótidos AG, situada en el exón 4 del gen, y provoca un desplazamiento de la pauta de lectura a partir del aminoácido 153. Desde este punto, se incorporan a la proteína 11 nuevos aminoácidos antes de la aparición de un codón de parada prematuro:

	<u>1</u> <u>2</u> <u>3</u> <u>4</u> <u>5</u> <u>6</u>	
NM_005710	...gtagac agagagagagag cgagacagggacgggatcgggaccgc...tga	265aa
	V D R E R E R D R E R D R D R	
	<u>1</u> <u>2</u> <u>3</u> <u>4</u> <u>5</u>	
EX522	...gtagac agagagagag cgagacagggacgggatcgggaccgcggtatga	164aa
	V D R E R A R Q G T G S G P R V *	

La proteína queda interrumpida a mitad del dominio rico en aminoácidos polares, faltándole 112 aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína normal.

El paso siguiente fue analizar si esta mutación segregaba con la enfermedad en la familia fELX91 y comprobar el genotipo del individuo II.4 que, como se ha comentado en el punto III.1.2, presentaba el haplotipo de riesgo a pesar de ser normal fenotípicamente. Para ello, la zona en cuestión fue amplificada y secuenciada en todos los miembros de las generaciones II y III, excepto en los individuos II.1, II.6 y II.8. En la figura R27 se resume el resultado de este análisis.

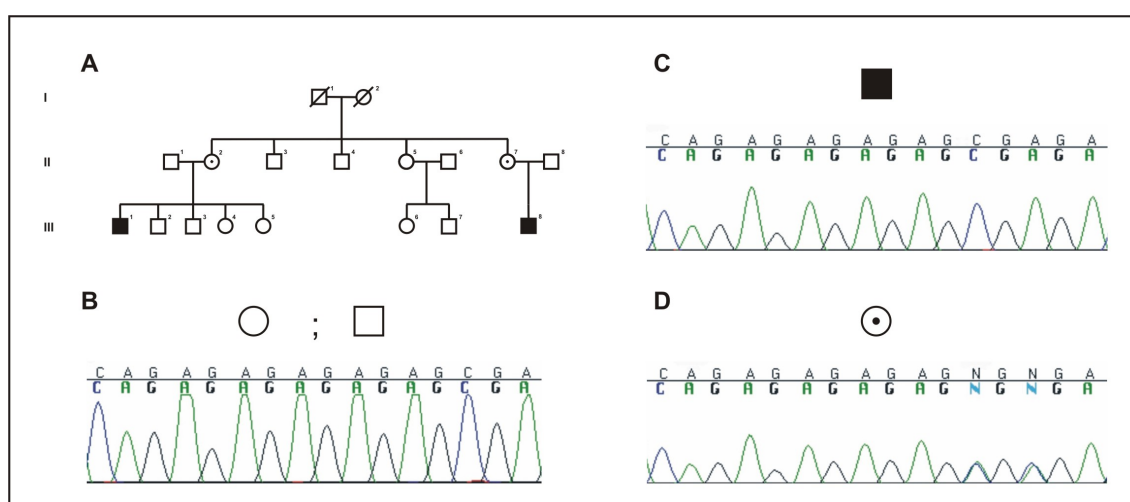


Fig. R27: Segregación del cambio c.461_462delAG en la familia fELX91.

A. Árbol de la familia fELX91. B, C, D. Fragmentos de los cromatogramas obtenidos al secuenciar el exón 4 de *PQBP1*. Aunque se muestre únicamente un cromatograma, éste es representativo de lo obtenido para los individuos que se mencionan en cada caso. B. Secuencia obtenida para todos los individuos de la familia no afectados por el síndrome de Lenz, incluido el tío materno (II.4) de los dos pacientes. Pueden verse las 6 repeticiones AG de la secuencia normal. C. El cromatograma muestra la secuencia obtenida en los dos pacientes con síndrome de Lenz (III.1 y III.8). En ambos se aprecia la delección de un dinucleótido AG. D. Secuencia de las dos mujeres portadoras (II.2 y II.7), madres respectivas de los dos enfermos. La presencia de secuencia doble a partir de la quinta repetición AG demuestra que son heterocigotas para esta mutación.

Como muestra la figura R25, se pudo comprobar que la mutación c.461_462delAG segregaba en la familia fELX91, siendo la responsable del fenotipo clínico de síndrome de Lenz en los dos individuos afectados.

Hay un aspecto que se debe destacar de la familia fELX91. Cuando se realizó el análisis de ligamiento, además de los dos afectados y sus respectivas madres, otras dos personas de la familia mostraban el haplotipo de riesgo: II.4 lo presenta en hemizigosis, pero sin manifestar síntoma alguno de la enfermedad, y II.5 es heterocigota. Sin embargo, el cambio c.461_462delAG sólo se ha identificado en los pacientes y en sus madres, no estando presente ni en II.4, ni en II.5. Queda así explicada la ausencia de síntomas en II.4, que podía hacer dudar de que se tratara realmente de una patología ligada al cromosoma X, y se descarta también un posible caso de penetrancia incompleta. La explicación más plausible para la situación que presenta esta familia es un fenómeno de mosaicismo germinal: la mutación debió surgir *de novo* en la abuela materna, I.2, bien en una célula de la línea germinal que continuó dividiéndose, o bien en algún momento muy temprano del desarrollo previo al establecimiento de la línea germinal. De esta forma, algunos óvulos la contenían y otros no, a pesar de compartir el resto del haplotipo en esa región.

III.5 Análisis cuantitativo de la expresión de los genes candidatos para el síndrome de Prieto

Tradicionalmente, la búsqueda de mutaciones en genes candidatos se ha centrado en las regiones codificantes, por ser las mejor caracterizadas y porque, caso de identificarse algún cambio, puede resultar hasta cierto punto más fácil predecir sus consecuencias. Sin embargo, existen otras regiones importantes para el buen funcionamiento de los genes, como aquellas que regulan sus niveles de expresión espacio-temporal o su correcto procesado, entre otras. Las mutaciones en estas secuencias pueden dar lugar, también, a enfermedades, pero su estudio se plantea una vez analizada la región codificante de los genes.

Una aproximación indirecta para comprobar si existe alguna alteración que afecte a las secuencias reguladoras de los genes, principalmente a los promotores, es la cuantificación de sus niveles de expresión. Resulta obvio que esta aproximación presenta una serie de limitaciones, ya que el análisis se lleva a cabo normalmente con muestras procedentes de un único tejido (sangre periférica), obtenida en un momento concreto de la vida del individuo. Generalmente, y en este caso en particular del retraso mental, no es la muestra más adecuada, pero sí la más fácil de obtener y con la que contamos la mayoría de los investigadores que trabajamos en las enfermedades genéticas. No obstante, podría darse una variación significativa de la expresión de un gen en este tejido, y es una posibilidad que nos encontramos obligados a no ignorar.

Las técnicas de análisis cuantitativo han sufrido un desarrollo importante en los últimos años, de forma que actualmente se pueden llevar a cabo de forma más o menos rápida y eficaz. Dado que no se identificaron cambios patológicos en las secuencias codificantes de los genes candidatos del intervalo DXS1056-DXS1201, se decidió realizar un análisis cuantitativo de la expresión de dichos genes en la familia fELX7, por si fuera así posible detectar diferencias significativas en los niveles de expresión de alguno de ellos. Para abordar este análisis, se decidió emplear la tecnología de sondas Taqman[®], como se ha descrito en el apartado VIII.3 de Material y Métodos. Se eligieron únicamente aquellas sondas que estuvieran localizadas en la unión entre dos exones, para evitar así posibles resultados erróneos debidos a DNA genómico residual en las muestras de cDNA (en la tabla M52 se recogen todas las sondas empleadas). En total se analizaron 8 de los genes de la región: *BCOR*, *ATP6AP2*, *MGC39350*, *CRSP2*, *USP9X*, *DDX3X*, *CASK* y *GPR34*, aunque uno de ellos, (*GPR34*), no se pudieron obtener datos fiables, dado su bajo nivel de expresión.

Como ya se ha comentado en la sección correspondiente de Material y Métodos, al explicar la forma en que son analizados los resultados de esta técnica, es necesario comprobar que la eficiencia de la amplificación del gen a analizar y del gen de referencia (en este caso *GAPDH*) sean equivalentes para distintas concentraciones de cDNA. Por lo tanto, se llevó a cabo dicha comprobación, obteniéndose resultados satisfactorios para todas las sondas, excepto para el gen *CASK*. A continuación se muestran, los resultados del análisis cuantitativo de los distintos genes mediante tablas (tablas R4 - R10) y gráficas (R29 - R35). Las columnas de las tablas deben interpretarse como sigue:

- C_T media [gen] : media de los valores C_T obtenidos en las tres réplicas realizadas para ese gen diana con el cDNA correspondiente.
- C_T media [*GAPDH*] : media de los valores C_T obtenidos en las tres réplicas realizadas para *GAPDH* con el cDNA correspondiente.
- ΔC_T : valor obtenido al restar los valores de las dos columnas anteriores. La nueva desviación estándar es la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de las desviaciones de las dos columnas anteriores.
- $\Delta\Delta C_T$: valor obtenido al restarle a ΔC_T el valor de ΔC_T del control tomado arbitrariamente como referencia (calibrador), en este caso CNA6.
- $2^{-\Delta\Delta C_T}$: cantidad de diana, normalizada respecto a una referencia endógena y relativa al calibrador.

III.5.1 Gen *BCOR*

Para este gen se dispuso de dos sondas, situadas en regiones diferentes del mismo, por lo que se muestran dos tablas y dos gráficas. La tabla R4 y la figura R28 recogen los datos obtenidos y los cálculos realizados para la PCR cuantitativa llevada a cabo con la sonda Hs 00372369_m1, localizada entre los exones 2 y 3 de este gen, en la posición 338 de las secuencias de referencia NM_017745 y NM_020926.

Individuo	C_T media <i>BCoR1</i>	C_T media <i>GAPDH</i>	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
CNA6	27.487 ± 0.039	22.363 ± 0.171	5.124 ± 0.175	0 ± 0.175	1 (0.88 - 1.13)
CNA12	28.49 ± 0.18	22.94 ± 0.175	5.55 ± 0.25	0.426 ± 0.25	0.74 (0.63 - 0.89)
CNA13	29.063 ± 0.047	23.617 ± 0.064	5.446 ± 0.079	0.322 ± 0.079	0.8 (0.76 - 0.84)
CNA14	28.893 ± 0.118	23.583 ± 0.082	5.31 ± 0.144	0.186 ± 0.144	0.88 (0.79 - 0.97)
CNA15	28.76 ± 0.036	24.09 ± 0.068	4.67 ± 0.077	-0.454 ± 0.077	1.37 (1.30 - 1.44)
EX446	28.01 ± 0.061	22.063 ± 0.078	5.947 ± 0.099	0.823 ± 0.099	0.56 (0.53 - 0.6)
EX656	27.247 ± 0.126	21.53 ± 0.126	5.717 ± 0.178	0.593 ± 0.178	0.66 (0.59 - 0.75)

Tabla R4: Resultados y cálculos de la PCR cuantitativa con la sonda Hs 00372369_m1.

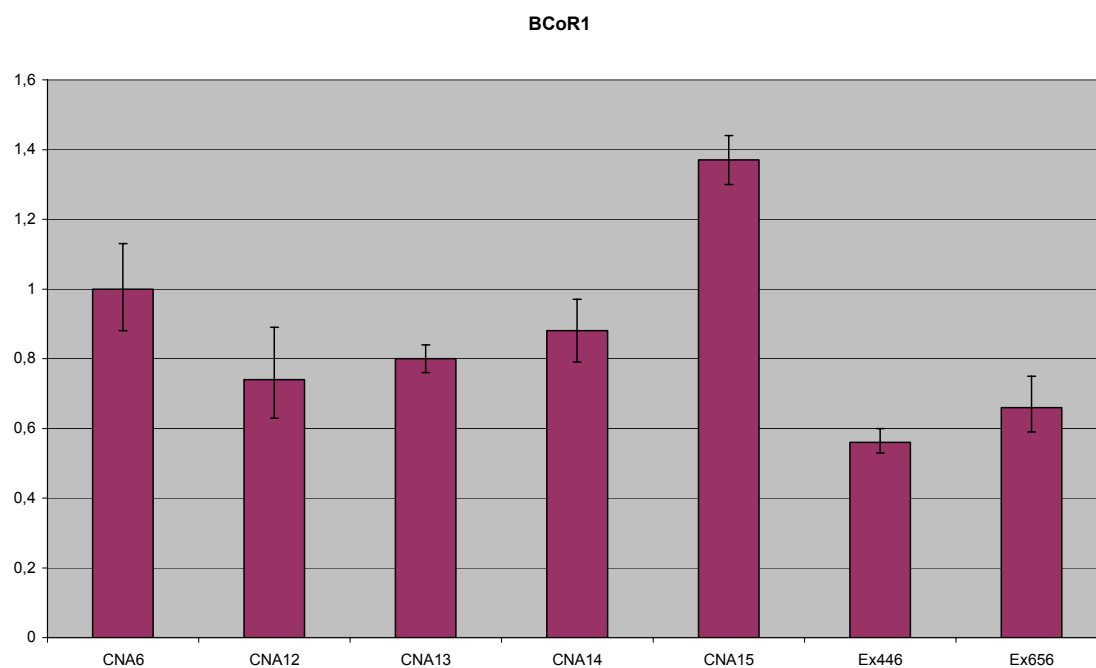


Fig. R28: Expresión relativa del gen *BCOR* en 5 controles y 2 pacientes con síndrome de Prieto, según los datos obtenidos con la sonda Hs 00372369_m1.

Los histogramas representan los valores $2^{-\Delta\Delta C_T}$ de la tabla R4.

La tabla R5 y la gráfica R29 muestran los resultados obtenidos para la sonda Hs 00372378_m1, situada entre los exones 11 y 12 del gen, en la posición 4743 de la secuencia de referencia NM_017745. Con esta sonda no se amplifica el transcrito correspondiente a NM_020926, dado que éste es más corto y termina en el exón 4.

Individuo	C_T media <i>BCoR2</i>	C_T media <i>GAPDH</i>	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
CNA6	26.23 ± 0.08	22.363 ± 0.171	3.867 ± 0.189	0 ± 0.189	1 (0.88 - 1.14)
CNA12	27.387 ± 0.118	22.94 ± 0.175	4.447 ± 0.211	0.58 ± 0.211	0.67 (0.58 - 0.77)
CNA13	27.687 ± 0.076	23.617 ± 0.064	4.07 ± 0.099	0.203 ± 0.099	0.87 (0.81 - 0.93)
CNA14	27.56 ± 0.262	23.583 ± 0.082	3.977 ± 0.274	0.11 ± 0.274	0.93 (0.77 - 1.12)
CNA15	27.85 ± 0.164	24.09 ± 0.068	3.76 ± 0.177	-0.107 ± 0.177	1.08 (0.95 - 1.22)
EX446	26.673 ± 0.102	22.063 ± 0.078	4.61 ± 0.128	0.743 ± 0.128	0.60 (0.55 - 0.65)
EX656	26.223 ± 0.043	21.53 ± 0.126	4.693 ± 0.133	0.826 ± 0.133	0.56 (0.51 - 0.62)

Tabla R5: Resultados y cálculos de la PCR cuantitativa con la sonda Hs 00372378_m1.

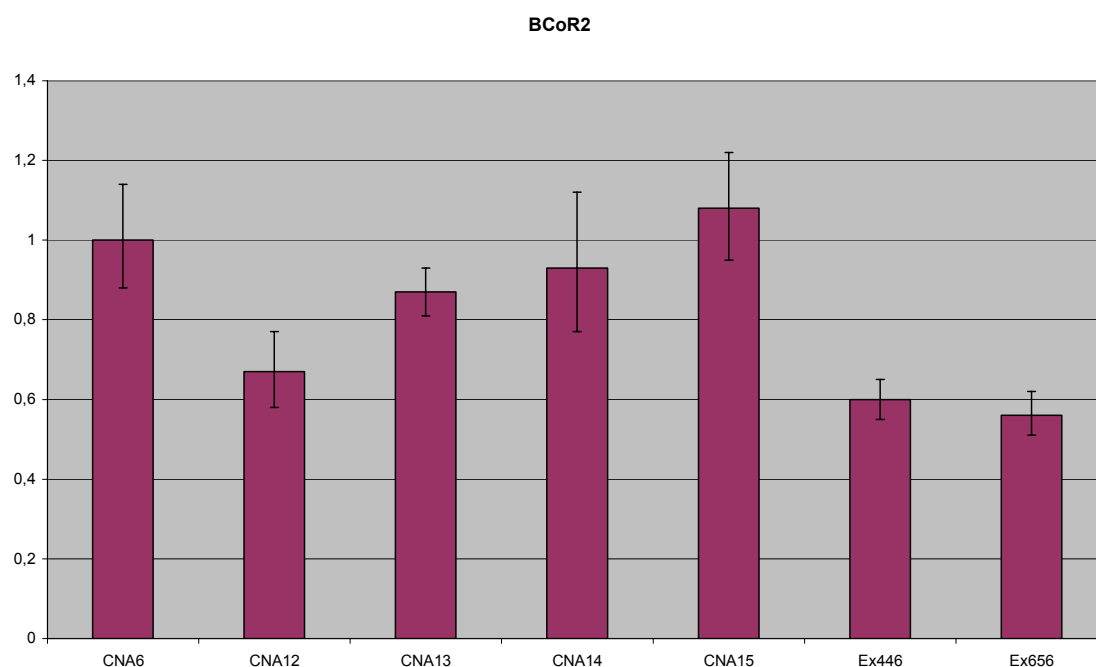


Fig. R29: Expresión relativa del gen *BCOR* en 5 controles y 2 pacientes con síndrome de Prieto, según los datos obtenidos con la sonda Hs 00372378_m1.

Los histogramas representan los valores $2^{-\Delta\Delta C_T}$ de la tabla R5.

III.5.2 Gen *ATP6AP2*

La sonda con la que se realizó este análisis fue Hs 00366626_m1, localizada entre los exones 1 y 2 de *ATP6AP2*, en la posición 137 respecto a la secuencia de referencia NM_005765.

Individuo	C_T media <i>ATP6AP2</i>	C_T media <i>GAPDH</i>	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
CNA6	26.043 ± 0.141	22.363 ± 0.171	3.68 ± 0.222	0 ± 0.222	1 (0.86 - 1.16)
CNA12	27.35 ± 0.04	22.94 ± 0.175	4.41 ± 0.179	0.73 ± 0.179	0.60 (0.53 - 0.68)
CNA13	27.60 ± 0.231	23.617 ± 0.064	3.983 ± 0.240	0.303 ± 0.240	0.81 (0.69 - 0.96)
CNA14	27.63 ± 0.192	23.583 ± 0.082	4.047 ± 0.209	0.367 ± 0.209	0.77 (0.67 - 0.90)
CNA15	28.07 ± 0.284	24.09 ± 0.068	3.98 ± 0.292	0.30 ± 0.292	0.81 (0.66 - 0.99)
EX446	25.55 ± 0.068	22.063 ± 0.078	3.487 ± 0.103	-0.193 ± 0.103	1.14 (1.06 - 1.23)
EX656	25.42 ± 0.104	21.53 ± 0.126	3.89 ± 0.163	0.21 ± 0.163	0.86 (0.77 - 0.97)

Tabla R6: Resultados y cálculos de la PCR cuantitativa con la sonda Hs 00366626_m1.

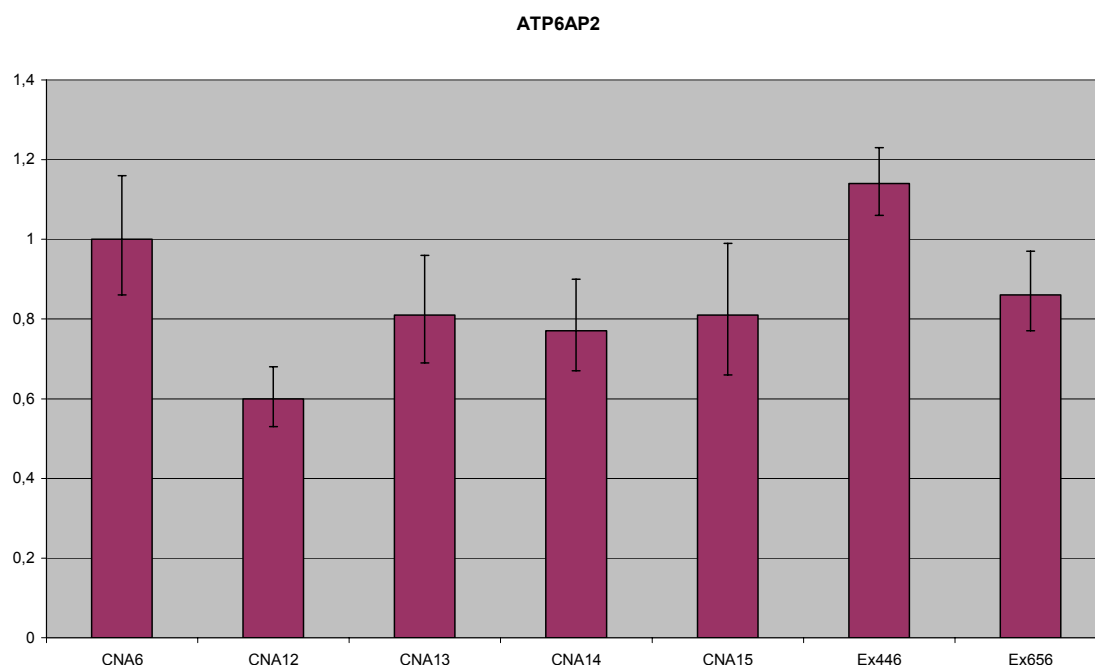


Fig. R30: Expresión relativa del gen *ATP6AP2* en 5 controles y 2 pacientes con síndrome de Prieto, según los datos obtenidos con la sonda Hs 00366626_m1.

Los histogramas representan los valores $2^{-\Delta\Delta C_T}$ de la tabla R6.

III.5.3 Gen *MGC39350*

Para el análisis cuantitativo de este gen se empleó la sonda Hs 00376487_m1, que está situada entre los exones 5 y 6 del gen, en la posición 804 de NM_144970.

Individuo	C_T media <i>MGC39350</i>	C_T media <i>GAPDH</i>	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
CNA6	28.047 ± 0.155	22.363 ± 0.171	5.684 ± 0.231	0 ± 0.231	1 (0.85 - 1.17)
CNA12	30.023 ± 0.063	22.94 ± 0.175	7.083 ± 0.186	1.399 ± 0.186	0.38 (0.33 - 0.43)
CNA13	30.697 ± 0.316	23.617 ± 0.064	7.08 ± 0.322	1.396 ± 0.322	0.38 (0.30 - 0.47)
CNA14	30.307 ± 0.117	23.583 ± 0.082	6.724 ± 0.143	1.04 ± 0.143	0.49 (0.44 - 0.54)
CNA15	30.143 ± 0.241	24.09 ± 0.068	6.053 ± 0.250	0.369 ± 0.250	0.77 (0.65 - 0.92)
EX446	27.993 ± 0.171	22.063 ± 0.078	5.93 ± 0.188	0.246 ± 0.188	0.84 (0.74 - 0.96)
EX656	27.793 ± 0.192	21.53 ± 0.126	6.263 ± 0.230	0.579 ± 0.230	0.67 (0.57 - 0.78)

Tabla R7: Resultados y cálculos de la PCR cuantitativa con la sonda Hs 00376487_m1.

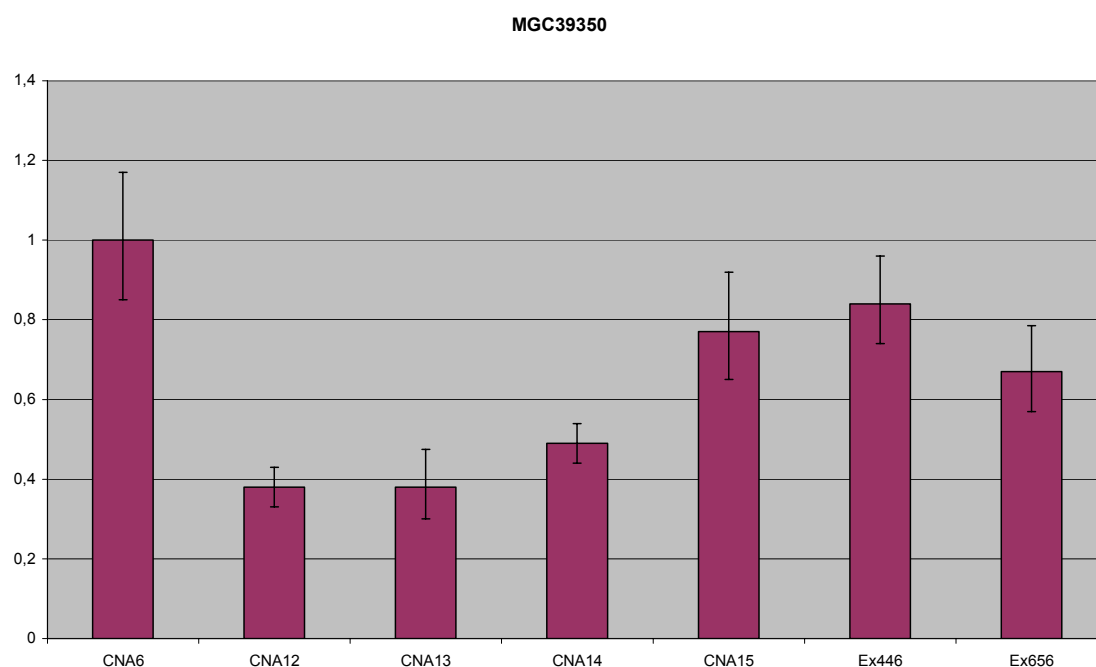


Fig. R31: Expresión relativa del gen *MGC39350* en 5 controles y 2 pacientes con síndrome de Prieto, según los datos obtenidos con la sonda Hs 00376487_m1.

Los histogramas representan los valores $2^{-\Delta\Delta C_T}$ de la tabla R7.

III.5.4 Gen *CRSP2*

La sonda empleada en esta PCR cuantitativa fue Hs 00188481, que se localiza entre los exones 11 y 12 del gen, en la posición 1534 de la secuencia de referencia NM_004229.

Individuo	C_T media <i>CRSP2</i>	C_T media <i>GAPDH</i>	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
CNA6	28.17 ± 0.03	22.363 ± 0.171	5.807 ± 0.174	0 ± 0.174	1 (0.89 - 1.13)
CNA12	29.277 ± 0.076	22.94 ± 0.175	6.337 ± 0.191	0.53 ± 0.191	0.69 (0.61 - 0.79)
CNA13	29.56 ± 0.106	23.617 ± 0.064	5.943 ± 0.124	0.137 ± 0.124	0.91 (0.83 - 0.99)
CNA14	29.60 ± 0.175	23.583 ± 0.082	6.017 ± 0.193	0.21 ± 0.193	0.86 (0.76 - 0.99)
CNA15	29.77 ± 0.125	24.09 ± 0.068	5.68 ± 0.142	-0.127 ± 0.142	1.09 (0.99 - 1.20)
EX446	28.323 ± 0.134	22.063 ± 0.078	6.26 ± 0.155	0.453 ± 0.155	0.73 (0.66 - 0.81)
EX656	28.12 ± 0.095	21.53 ± 0.126	6.59 ± 0.156	0.783 ± 0.156	0.58 (0.52 - 0.65)

Tabla R8: Resultados y cálculos de la PCR cuantitativa con la sonda Hs 00188481_m1.

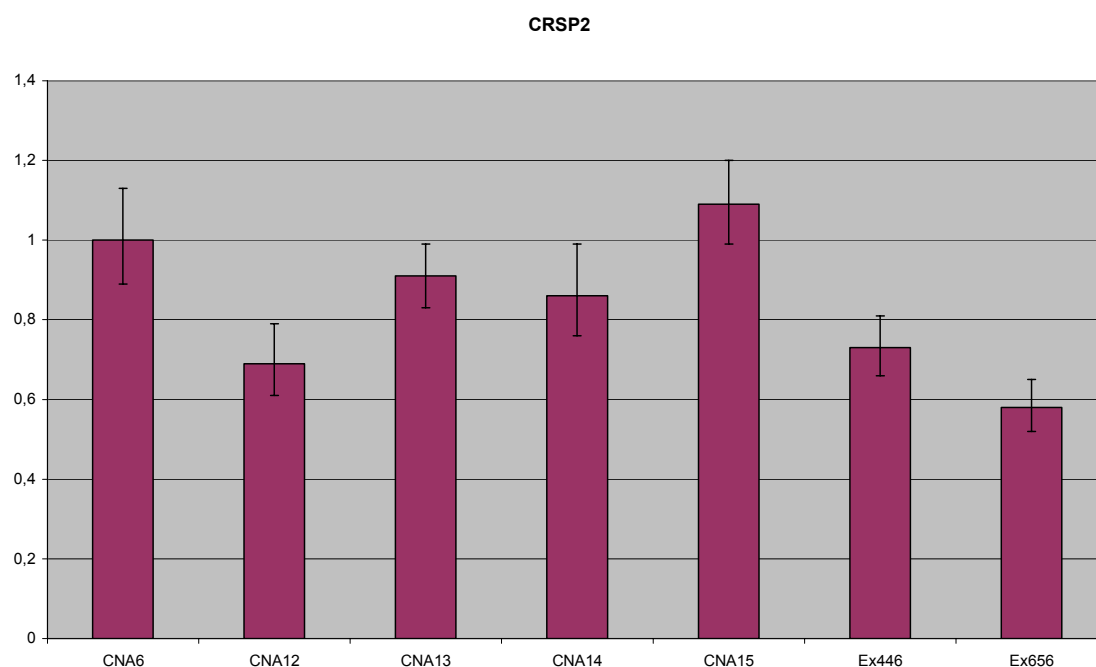


Fig. R32: Expresión relativa del gen *CRSP2* en 5 controles y 2 pacientes con síndrome de Prieto, según los datos obtenidos con la sonda Hs 00188481_m1.

Los histogramas representan los valores $2^{-\Delta\Delta C_T}$ de la tabla R8.

III.5.5 Gen *USP9X*

En este caso se empleó la sonda Hs 00245009 para el análisis cuantitativo del gen *USP9X*. Dicha sonda está situada entre los exones 1 y 2 del mismo, en la posición 152 respecto a NM_004652 y NM_021906.

Individuo	C_T media <i>USP9X</i>	C_T media <i>GAPDH</i>	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
CNA6	29.40 ± 0.332	22.363 ± 0.171	7.037 ± 0.373	0 ± 0.373	1 (0.77 - 1.29)
CNA12	29.49 ± 0.036	22.94 ± 0.175	6.55 ± 0.179	-0.487 ± 0.179	1.40 (1.24 - 1.59)
CNA13	29.883 ± 0.202	23.617 ± 0.064	6.266 ± 0.212	-0.771 ± 0.212	1.71 (1.47 - 1.98)
CNA14	29.687 ± 0.393	23.583 ± 0.082	6.104 ± 0.401	-0.933 ± 0.401	1.91 (1.45 - 2.52)
CNA15	29.773 ± 0.022	24.09 ± 0.068	5.683 ± 0.071	-1.354 ± 0.071	2.56 (2.43 - 2.68)
EX446	28.90 ± 0.063	22.063 ± 0.078	6.837 ± 0.10	-0.20 ± 0.10	1.15 (1.07 - 1.23)
EX656	28.603 ± 0.089	21.53 ± 0.126	7.073 ± 0.154	0.036 ± 0.154	0.97 (0.88 - 1.08)

Tabla R9: Resultados y cálculos de la PCR cuantitativa con la sonda Hs 00245009_m1..

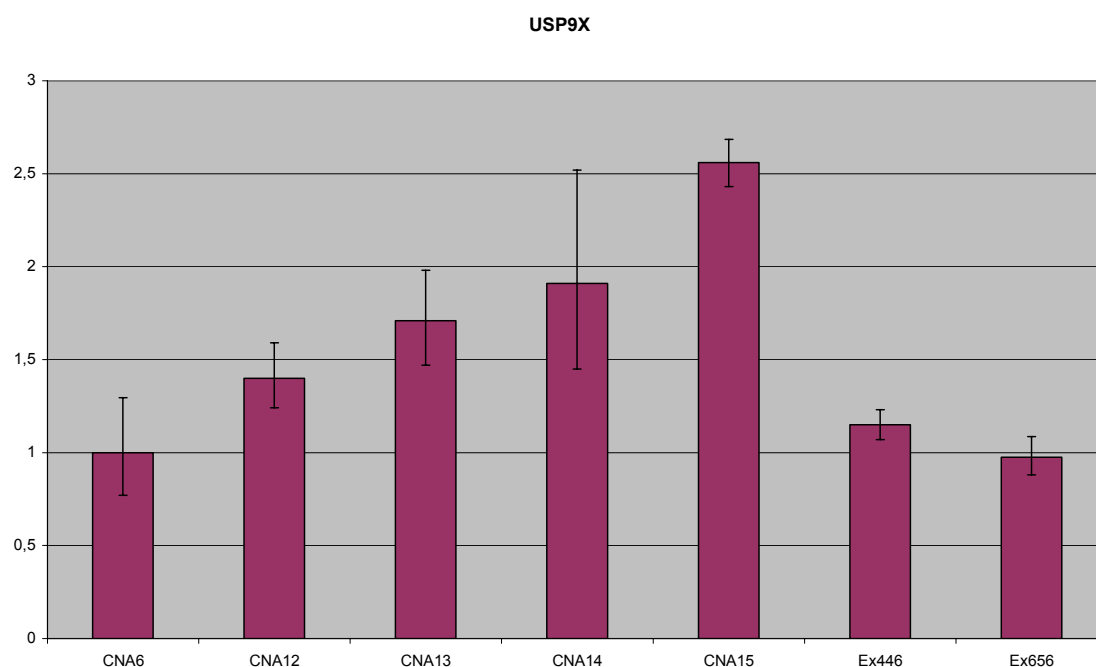


Fig. R33: Expresión relativa del gen *USP9X* en 5 controles y 2 pacientes con síndrome de Prieto, según los datos obtenidos con la sonda Hs 00245009_m1.

Los histogramas representan los valores $2^{-\Delta\Delta C_T}$ de la tabla R9.

III.5.6 Gen *DDX3X*

Para el análisis de la expresión del gen *DDX3X* se dispuso de la sonda Hs 00606179_m1, que se localiza entre los exones 10 y 11 de dicho gen, en la posición 1877 de las secuencias de referencia NM_024005 y NM_001356.

Individuo	C_T media <i>DDX3X</i>	C_T media <i>GAPDH</i>	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
CNA6	25.30 ± 0.043	22.363 ± 0.171	2.937 ± 0.176	0 ± 0.176	1 (0.88 - 1.13)
CNA12	26.363 ± 0.116	22.94 ± 0.175	3.423 ± 0.21	0.486 ± 0.21	0.71 (0.62 - 0.83)
CNA13	27.333 ± 0.182	23.617 ± 0.064	3.716 ± 0.193	0.779 ± 0.193	0.58 (0.51 - 0.66)
CNA14	26.73 ± 0.191	23.583 ± 0.082	3.147 ± 0.208	0.21 ± 0.208	0.86 (0.75 - 1.00)
CNA15	26.887 ± 0.125	24.09 ± 0.068	2.797 ± 0.142	-0.14 ± 0.142	1.10 (1.00 - 1.22)
EX446	25.43 ± 0.121	22.063 ± 0.078	3.367 ± 0.144	0.43 ± 0.144	0.74 (0.67 - 0.82)
EX656	25.20 ± 0.059	21.53 ± 0.126	3.67 ± 0.139	0.733 ± 0.139	0.60 (0.55 - 0.66)

Tabla R10: Resultados y cálculos de la PCR cuantitativa con la sonda Hs 00606179_m1.

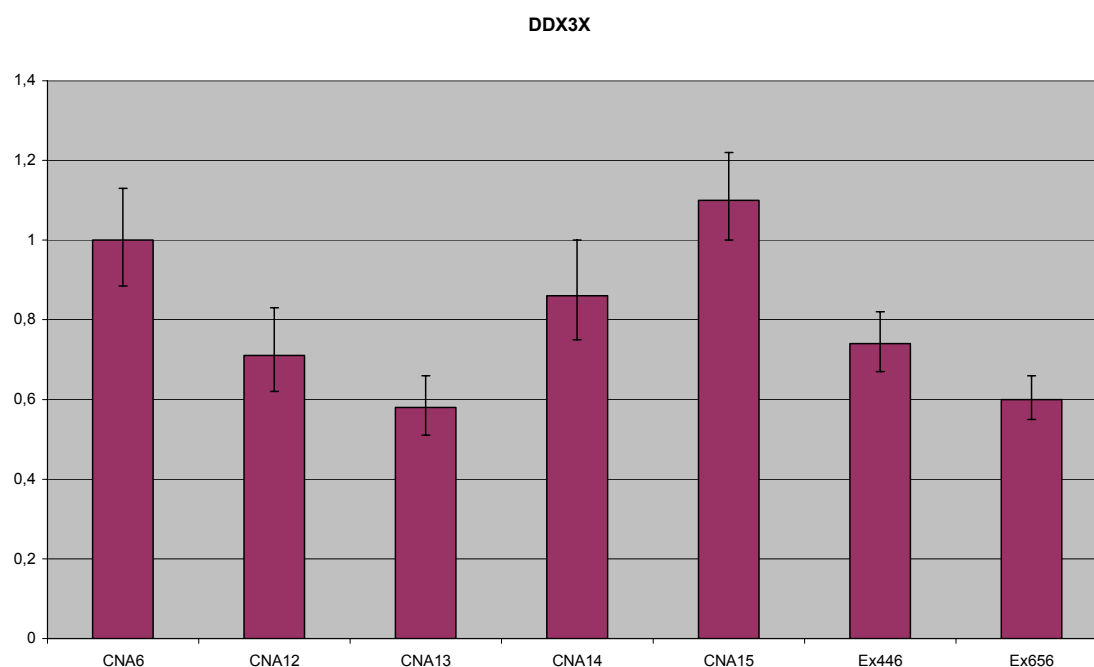


Fig. R34: Expresión relativa del gen *DDX3X* en 5 controles y 2 pacientes con síndrome de Prieto, según los datos obtenidos con la sonda Hs 00606179_m1.

Los histogramas representan los valores $2^{-\Delta\Delta C_T}$ de la tabla R10.

Como se observa en las figuras R28 a R34, no se aprecian diferencias significativas en los niveles de expresión de los genes analizados al comparar los datos de los pacientes de la familia fELX7 con los obtenidos a partir de individuos control. En todos los casos, al menos uno de los dos pacientes presenta valores dentro del rango de los controles, considerando el error asociado a los datos.

El hecho de que las sondas BCoR1 y 2 den resultados tan similares, corrobora la fiabilidad de la técnica, ya que se está cuantificando la expresión del mismo gen con dos sondas y dos pares de cebadores diferentes. Además, parece existir mayor divergencia de valores para *GAPDH* que para los genes analizados, lo que sugiere que las diferencias observadas entre las distintas muestras sanguíneas pudieran deberse más a una distinta composición celular o un diferente estado de actividad celular (como respuesta a otros factores tales como infecciones, alergias, etc.), que a diferencias en el nivel basal de transcripción de los genes analizados.

III.6 Análisis del gen *LAVA*

El gen *LAVA* fue identificado en la base de datos Aceview y está avalado por 12 clones de cDNA. La posición de este gen en el cromosoma X, en sentido antiparalelo al extremo 5' del gen *CRSP2* (ver figura R21), resultaba muy interesante, dado que la transcripción de uno de estos dos genes podría jugar un papel regulador en la expresión del otro. Por otro lado, para que se inicie la transcripción de un gen, es necesario el ensamblaje de un complejo proteico que reclute a la RNA polimerasa II y abra el DNA para hacerlo accesible. Al coincidir los extremos 5' de dos genes, situados en cadenas opuestas, parece lógico pensar que la formación de un complejo multiproteico para iniciar la transcripción en un sentido impedirá o, al menos, dificultará la formación de un complejo equivalente para que se inicie la síntesis en el sentido opuesto.

Este gen resultaba interesante, además, porque la información disponible sobre él sugería que la pauta de lectura podía estar incompleta en su extremo 5', puesto que no existía un codón de parada previo a la primera metionina. Era posible, por tanto, que el gen se extendiera más en dirección Xpter., de forma que su región de solapamiento con *CRSP2* sería mayor. Por otra parte, tampoco podía descartarse completamente la posibilidad de que se tratara de un transcrito alternativo perteneciente a la región 5' no traducida de *CRSP2*.

Por todo ello, se decidió continuar el análisis de este gen, llevando a cabo una hibridación de tipo *Northern*. Con ello se pretendía, en primer lugar, comprobar si realmente se trataba de una secuencia expresada y, en caso afirmativo, se averiguaría el tamaño real del transcrito. Esto último permitiría deducir si la secuencia de la base de datos contiene el gen en su totalidad y si se trata de un nuevo gen o, por el contrario, dicha secuencia pertenece a la región 5' no traducida de *CRSP2*.

La membrana elegida para realizar la hibridación fue la *12 Lane MTN* de *Clontech*. Esta membrana contiene RNA de 12 tejidos diferentes: cerebro, colon, corazón, riñón, hígado, pulmón, leucocitos de sangre periférica, placenta, músculo esquelético, intestino delgado, bazo y timo. Cubre, por tanto, un amplio rango tisular, lo que ofrece dos ventajas. Por una parte se obtiene información sobre los órganos donde se expresa el gen, y por otra, se maximizan las posibilidades de obtener alguna señal, sobre todo teniendo en cuenta la procedencia de los clones de cDNA que avalan la secuencia de este gen: dos procedían de glioblastoma y otros dos tumores, otros dos de riñón, y uno de hipotálamo.

Como sonda se usó un fragmento que contenía fundamentalmente la región predicha como 3' UTR del gen. Ello se debió a tres motivos: (i) había que evitar la zona de solapamiento con *CRSP2*, de forma que la sonda fuera específica de la secuencia descrita para *LAVA*. (ii) Además, todos los intentos de amplificar la pauta de lectura a partir de cDNA no dieron resultado, no pudiéndose obtener banda alguna en los numerosos intentos realizados. (iii) Por último, todos los clones de cDNA descritos para *LAVA* contenían esta región, lo que parecía confirmar su pertenencia al transcrito.

La sonda, que contiene los 364 pb entre las posiciones 430 y 794 del transcrito descrito en la base de datos Aceview, se generó mediante PCR a partir de DNA genómico. Posteriormente, se secuenció y se comprobó mediante análisis con el programa BLAST que fuera específica y no mostrara homologías con alguna secuencia distinta a *LAVA*. A continuación fue marcada con [α - 32 P]dCTP. La hibridación y los lavados se realizaron como se ha descrito en el punto VIII.4 de Material y Métodos. La figura R35 muestra el resultado de dicha hibridación, tras un periodo de cinco días de exposición a -70°C .

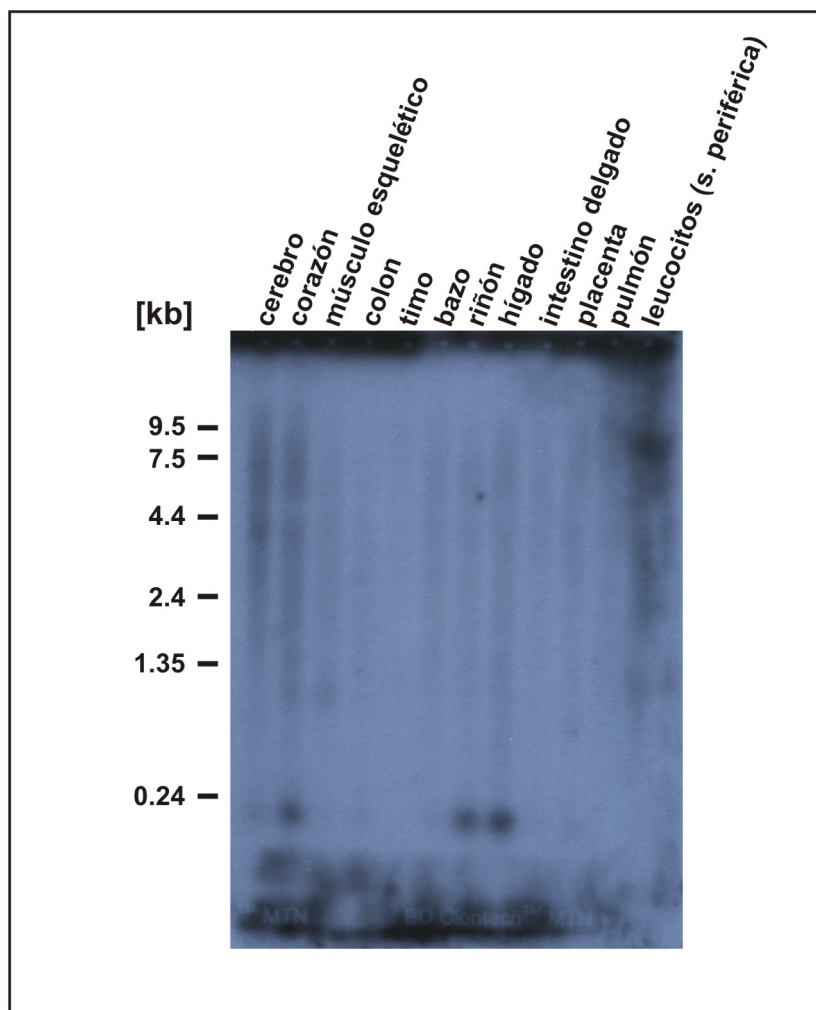


Fig. R35: MTN 12 lane hibridado con la sonda del gen *LAVA*.

La membrana fue hibridada con la sonda marcada con [α - 32 P]dCTP, siguiendo las instrucciones del manual. Se observa una banda de unos 200 pb en las carreras correspondientes a riñón, hígado y corazón. En la banda de cerebro podría haber una señal mucho más débil a la misma altura. No se aprecian bandas en el resto de tejidos.

El resultado de la hibridación fue la detección de una banda de unos 200 pb en corazón, riñón e hígado, que parece estar presente, aunque de forma mucho más débil, en cerebro. En el resto de tejidos representados en la membrana no se distinguió ninguna señal de hibridación. La banda parece específica, puesto que queda perfectamente enmarcada dentro de la carrera correspondiente al tejido, apareciendo además sólo en tres (cuatro, si se considera que hay señal en cerebro) de ellos.

Se confirma de esta forma que las secuencias descritas para *LAVA* no son en realidad parte de *CRSP2* y que hay secuencias expresadas en algunos tejidos. El hecho más significativo fue el que la banda obtenida tenga un tamaño no sólo inferior al de la sonda, sino mucho menor que el transcrito predicho para *LAVA*, de 908 pb.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

I. Retraso mental inespecífico

I.1 Región Xp22

I.1.1 Análisis de mutaciones

En la región Xp22.2, en una zona de unas 3 Mb entre el gen *RBBP7* y el marcador DXS1229, se han analizado un total de 13 genes en pacientes de 6 familias afectadas de retraso mental inespecífico ligado al cromosoma X. Cuatro de estas familias son españolas y las otras dos fueron cedidas para su análisis por el Dr. Charles Schwartz, del *Greenwood Genetic Center* (Carolina del Sur, E.E.U.U.). El análisis se ha llevado a cabo principalmente por amplificación y secuenciación de los exones de cada uno de los genes, aunque en el caso de *REPS2*, *RBBP7* y *SCML2* el análisis se realizó por SSCs, secuenciando únicamente aquellas muestras, cuyo patrón en el gel de acrilamida difería del patrón obtenido con una muestra control. La región candidata está delimitada, en principio, por los marcadores recombinantes obtenidos tras el análisis de ligamiento en la familia fELX2 (DXS8019 y DXS1229), aunque se incluyeron en el estudio los genes *REPS2* y *RBBP7*, puesto que antes de conocerse el orden definitivo de los marcadores en esta zona, ambos quedaban incluidos en la región candidata. Ya que por motivos de ligamiento sólo podían excluirse en la familia fELX2, se decidió continuar con su análisis a pesar de su localización.

Tras el análisis de los 13 genes candidatos, se han identificado 24 cambios. Los datos más relevantes acerca de ellos, como su localización dentro del gen, el número de familias que lo presentan o si han podido ser identificados en secuencias de las bases de datos, están recogidos en la siguiente tabla:

		nº cambios / nº familias	Presente en bases de datos o controles	
24 cambios	11 en regiones codificantes	2 sinónimos	1 / 2	sí
			1 / 1	sí
		9 no sinónimos	5 / 6	sí
			1 / 3	sí
			1 / 2	sí (dbSNP)
			2 / 1	1 sí 1 NO
	13 en regiones no codificantes	4 en 5' UTR	4 / 6	2 sí 2 NO
			1 / 6	1 sí
		8 en intrones	1 / 4	sí (dbSNP)
			4 / 2	sí (3 en dbSNP)
			2 / 1	1 sí 1 NO
		1 en 3' UTR	1 / 6	sí

Tabla D1: Resumen de los cambios de secuencia obtenidos tras el análisis de los 13 genes candidatos en Xp22.2.

Como puede observarse, los cambios encontrados afectan a todas las regiones génicas: regiones no traducidas en 5' y 3', exones e intrones. Curiosamente, la mayoría de los cambios presentes en las pautas abiertas de lectura suponen un cambio de aminoácido, aunque se trata en general de cambios bastante conservativos, en los que un aminoácido es sustituido por otro de características fisicoquímicas similares. En cualquier caso, todos ellos,

excepto uno, han podido ser identificados en al menos una secuencia de las bases de datos, ya sea procedente de un clon genómico o, en la mayoría de los casos, de un clon de cDNA. Hay que destacar que, pese a ello, sólo uno de los cambios identificados en exones estaba ya descrito como polimorfismo en la base de datos dbSNP, y que, además, lo presentan sólo 2 de las 6 familias analizadas. Sin embargo, ninguno de los 5 cambios exónicos encontrados en todas las familias aparece en dicha base de datos, cuando podría pensarse que se trata de polimorfismos más frecuentes. Este hecho puede explicarse porque la frecuencia de los distintos polimorfismos puede variar de unas poblaciones a otras, pudiendo ser estos cambios menos frecuentes en las poblaciones estudiadas por los autores que han remitido los datos existentes, hasta el momento, en dbSNP. Otro dato relevante es que 13 de los 24 cambios se agrupan en sólo tres de los genes analizados, siendo además genes que todavía no han sido caracterizados. Estos genes presentan, asimismo, 9 de los 11 cambios hallados en las regiones codificantes.

De los 24 cambios identificados, sólo 4 no están presentes en secuencias de las bases de datos o de controles. De ellos, únicamente uno se localiza en la región codificante del gen, y tampoco ha podido ser identificado en 178 muestras de controles no afectados por MRX. Se trata del cambio c.1734G>T (Lys578Asn) en el gen *FLJ14503*, presente en la familia fELX20, que será discutido en profundidad más adelante.

Como ya se ha comentado en el apartado de Resultados, los 2 cambios no presentes en las bases de datos, situados en la región 5' no traducida del gen *RBBP7*, pueden descartarse prácticamente como patológicos ya que el paciente de la familia MRX73 también los presenta, y dicho gen ha quedado fuera de su región de ligamiento. Lo mismo ocurre con el cambio c.963-86_-87insG, presente en un intrón del gen *REPS2*. Este cambio lo presenta un paciente de la familia MRX73, y este gen se localiza fuera de la región de ligamiento redefinida para esta familia.

¿Cómo debe entonces interpretarse esta ausencia de mutaciones en los genes de la región candidata?

Hay que recordar que el análisis de ligamiento en las familias fELX17, fELX18 y fELX20 no ha permitido acotar tanto la región que debe albergar el gen mutado, siendo éstas de mayor tamaño que la descrita para fELX2 (ver figura R1). Asimismo, como puede comprobarse en la figura I6, el caso de MRX59 es muy similar. Para K8944 no disponemos de los datos de ligamiento. Dada la gran heterogeneidad que existe en el XLMR, el hecho de que las regiones de ligamiento de varias familias solapen en un intervalo determinado no significa que dicho intervalo vaya a contener el gen responsable del fenotipo para todas ellas. Es muy probable, por tanto, que otros genes situados fuera de la región solapante en cada una de las familias acaben pudiendo ser relacionados con el RM que padecen sus miembros afectados.

Teniendo esto en cuenta, sí cabe plantearse por qué, al menos en el caso de fELX2, no se ha hallado algún cambio que pueda dar cuenta del fenotipo que afecta a varios miembros de esta familia. Existen varias causas posibles, que van desde las limitaciones de los métodos de análisis utilizados hasta la posibilidad de que los genes responsables no codifiquen proteínas:

- El análisis de mutaciones se ha llevado a cabo exclusivamente sobre DNA genómico de los pacientes, amplificando los exones y secuenciándolos. Esto hace que las posibles alteraciones en zonas intrónicas no adyacentes a exones, o en regiones promotoras, que puedan afectar al procesado del mensajero o a su abundancia, respectivamente, pasen desapercibidas.
- Por otra parte, la transcripción génica es un proceso complejo, cuya regulación depende de múltiples factores (revisado en Lee y Young, 2000), varios de ellos no necesariamente cercanos al gen en cuestión: las secuencias potenciadoras o silenciadoras, por ejemplo, pueden estar localizados a muchas kilobases del gen al que regulan. Las regiones de regulación transcripcional contienen a menudo múltiples módulos autónomos y cada uno desempeña una función concreta, contribuyendo en conjunto a la regulación global espacio-temporal del gen. Los cambios en estas regiones reguladoras son muy difíciles de analizar a nivel genómico, requiriendo estudios cuantitativos y sobre cDNA del tejido apropiado. Hay que tener en cuenta que

se están estudiando pacientes con retraso mental inespecífico, que carecen de otros signos clínicos.

- Tradicionalmente, se han considerado en el análisis de mutaciones únicamente aquellos genes que codifican proteínas. Sin embargo, se está descubriendo un número creciente de RNAs no codificantes, que probablemente ejercen funciones de regulación de diversa índole y que, por el hecho de desempeñar una función concreta en el organismo, son susceptibles de poder sufrir mutaciones y provocar enfermedades. Este tema se tratará con mayor extensión en el punto III.2 de la discusión.
- Tampoco se puede descartar la opción de que existan otros genes en la región analizada que no hayan sido todavía identificados. A pesar de la gran cantidad de información disponible actualmente en las bases de datos, es muy posible que queden todavía genes por descubrir, sobre todo en el caso de que no presenten homologías de secuencia con genes ya descritos en humanos o en otros organismos.

Cualquiera de estos factores podría explicar el por qué no hemos identificado el gen responsable de retraso mental en los pacientes, aunque no hay que olvidar que uno de los genes descritos más recientemente en la región, *NHS*, todavía no ha sido analizado en estas familias. No obstante, este gen está implicado en un síndrome que cursa con anomalías dentales y oculares que sólo ocasionalmente provoca retraso psicomotor.

I.1.2 Análisis del gen *FLJ14503*

En el gen *FLJ14503* se identificó el cambio c.1734G>T, que no ha sido identificado ni en secuencias de las bases de datos ni en 178 muestras procedentes de personas no afectadas de retraso mental. Teniendo en cuenta que la proporción de varones y mujeres en los controles analizados, es de aproximadamente un 50%, se han analizado en total más de 250 cromosomas X. El cambio c.1734G>T, que supone la sustitución de la lisina de la posición 578 por un residuo de asparagina, segrega con la enfermedad en la familia fELX20, como muestra la figura R4. El hecho de que el individuo III.17 no presente dicho cambio no es sorprendente, ya que esta persona no presenta el mismo haplotipo asociado a retraso mental y retinosis pigmentaria que el resto de afectados de la familia. Por tanto, se dedujo que su caso era de etiología diferente.

Antes de entrar a discutir los posibles efectos que el cambio c.1734G>T podría tener a nivel proteico, es interesante comprobar si podría afectar al procesado del mensajero. Diversos estudios han puesto de manifiesto la influencia que determinadas secuencias exónicas ejercen sobre la maquinaria encargada del procesado, haciendo necesario revisar el planteamiento clásico, por el que los cambios identificados en exones eran evaluados exclusivamente en función de su efecto sobre la proteína codificada por el gen (revisado en Cartegni *et al.*, 2002). En concreto, se han descrito secuencias exónicas potenciadoras (ESEs) y silenciadoras (ESSs) del procesado, y ya existen ejemplos de enfermedades causadas por cambios en este tipo de secuencias (Lorson *et al.*, 1999; Ramser *et al.*, 2005).

Las secuencias potenciadoras son, por el momento, las más estudiadas, aunque todavía se desconocen muchos detalles tanto sobre su composición, como sobre su función. A ellas se unen proteínas de la familia SR, que presentan dominios de reconocimiento del RNA (RRMs) y dominios de interacción con otras proteínas (RSs). Se han postulado dos posibles mecanismos de acción, que no son mutuamente excluyentes, y que aparecen en la figura D1 (en la página siguiente).

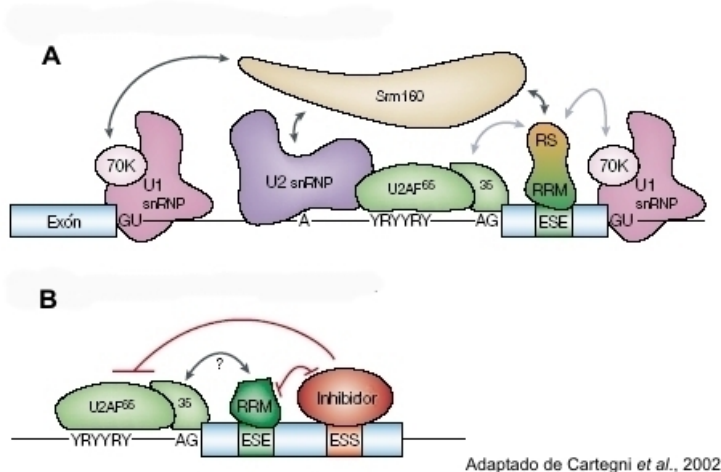


Fig. D1: Mecanismos de acción propuestos para los ESEs y las proteínas SR.

A. En este modelo, la acción sería dependiente del dominio RS, que interaccionaría con diversas proteínas de la maquinaria de procesamiento. La proteína SR, unida al ESE, reclutaría a dicha maquinaria y facilitaría el procesamiento, sobre todo en casos de sitios aceptores débiles (p. ej. si la zona rica en pirimidinas del intrón no es pura). B. En este caso la acción sería independiente del dominio RS, y tendría lugar por competencia con factores inhibidores unidos a un ESS.

Se ha desarrollado un programa bioinformático que permite predecir la presencia de ESEs en secuencias exónicas (Fairbrother et al., 2002), de forma que es posible obtener una predicción sobre el efecto que un cambio nucleotídico en un exón puede tener sobre el procesamiento del transcrito. Este programa analiza ventanas de 6 nucleótidos, ya que es un tamaño comparable al de las secuencias de unión de muchos factores que unen RNA. En el caso del exón 13 del gen *FLJ14503*, el programa predice la presencia de una ESE que podría verse afectada por el cambio c.1734G>T (figura D2). Aunque este resultado es muy prometedor, procede de una predicción informática pendiente de ser comprobada cuando se disponga de cDNA de los pacientes. De esta forma, un procesamiento erróneo del transcrito podría provocar un desplazamiento de la pauta de lectura de la proteína y la aparición de un codón de parada prematuro, generándose una proteína más corta de lo normal o incluso no llegar a generarse apenas producto debido a una degradación del transcrito (*nonsense mediated RNA decay*).

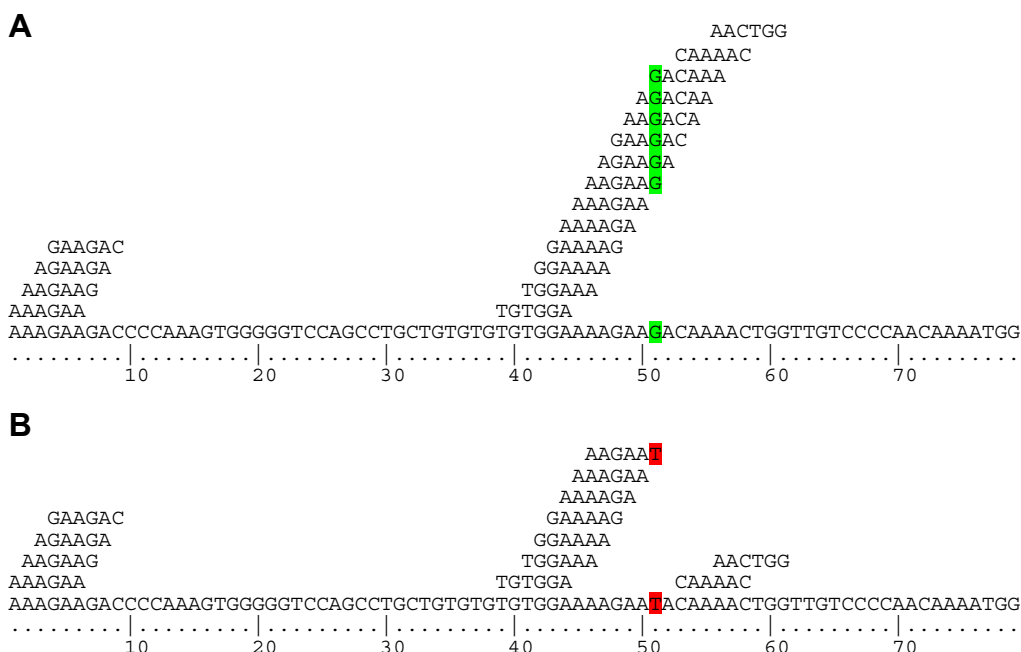


Fig. D2: Efecto del cambio c.1734G>T sobre una posible ESE predicha en el exón 13 de *FLJ14503*.
A. ESEs predichos en el exón 13 de *FLJ14503* por el programa Rescue-ESE. B. Resultado de la predicción para la secuencia con el cambio c.1734G>T. La presencia de la timina introducida por el cambio altera la segunda ESE.

Una vez discutido el posible efecto del cambio c.1734G>T sobre el procesamiento del mensajero, se puede considerar cómo podría verse afectada la proteína codificada.

¿Qué sabemos de la proteína codificada por *FLJ14503*? La primera información nos la ofrece el análisis con el programa BLASTP: esta proteína parece estar presente en otros organismos, como primates (*Pongo pygmaeus* y *Pan troglodytes*, con una similitud de secuencia superior al 90%), otros mamíferos (*Canis familiaris*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*, con similitudes de alrededor del 70-75%), y otros vertebrados (*Gallus gallus*, con una similitud menor, del 55%). En todos los casos, incluida la proteína humana, se trata de predicciones, lo que puede influir en el porcentaje de similitud indicado, si existe algún error en alguna de ellas. Hay que destacar que el grado de conservación de la proteína no es homogéneo a lo largo de toda su longitud, sino que existen algunas regiones mucho más conservadas que otras. En concreto pueden distinguirse tres regiones en las que la secuencia aminoacídica de las diferentes predicciones coincide en mayor medida que en el resto de la proteína, como recoge la figura D3 (ver también la figura R5).

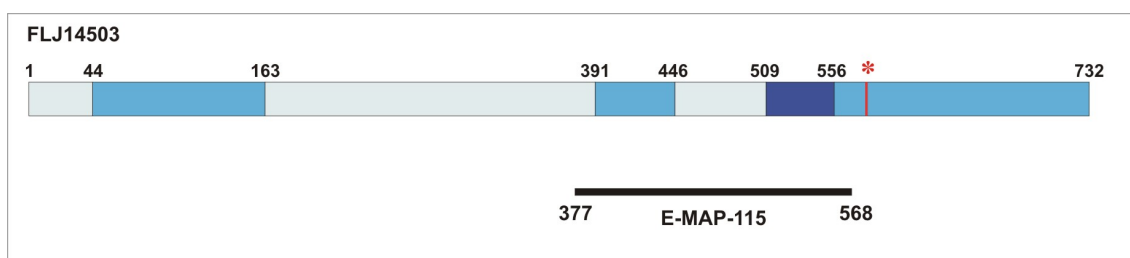


Fig. D3: Regiones conservadas en FLJ14503.

Las regiones de la proteína que aparecen en color más oscuro son las más conservadas entre las especies cuyas secuencias estaban disponibles en la base de datos. Los números de la parte superior corresponden a los aminoácidos de la proteína. Dentro de la región final existe una zona especialmente conservada entre los aminoácidos 509 y 556. Se indica también la posición del dominio E-MAP-115 predicho para FLJ14503 y la posición de la lisina 578 (con un asterisco rojo).

Es lógico pensar que la especial conservación de estas tres regiones pueda tener un significado funcional. De hecho, la zona más conservada, situada entre los aminoácidos 509 y 556, se encuentra incluida en el dominio E-MAP-115 predicho para FLJ14503. Además, según la predicción de estructura secundaria efectuada por el programa PROF, existirían dos regiones con una alta probabilidad de estructura helicoidal entre los aminoácidos 57-143, y 397- 551, coincidiendo por una parte con la primera región conservada de FLJ14503, y por otra con el dominio E-MAP-115.

La lisina 578 de la secuencia humana está conservada en las secuencias disponibles de primates y mamíferos, pero no así en la de *Gallus gallus*. La lisina 578 no forma parte del dominio E-MAP-115, pero está situada en una región conservada de la proteína, aunque es importante resaltar que precisamente su entorno es el que más diverge entre las diferentes secuencias:

<i>H. sapiens</i>	VKKEDPKVGVQPAVCVEK---KTKLVVVPNKMEINGLNTCQEVNGVDHAAPETYPQD
<i>P. pygmaeus</i>	VKKEDPKMGVQPAVCVEK---KTKLVVVPNKMEINGLNTCQEVNGVDHAAPETYPQD
<i>R. norvegicus</i>	VKKEDPKVEIQPLPDVEN---KIKPVVPNKIEINVLNTCQKVNVSERAAPETFPQD
<i>M. musculus</i>	VKKEDPKVELQPPPDVENKANKAKPVVPNKIEINVLNTCQKVSGSERAAPETFPQD
<i>P. troglodytes</i>	VKKEDPKVGVQPAVCVEK---KTKLAVHIQMEINGLNTCQEVNGVDHAAPETYPQD
<i>C. familiaris</i>	VKKEDPKVELHSVCVEN---KTKPVVPNKIEINGLNTCQEVNGVGRITAPETFPRD
<i>G. gallus</i>	IKKEEPKLEIPSTLNVEK---QPKALVLNQPEINGLATCLKSKSLESAAASVVPSQD

La posición inmediatamente anterior a la lisina 578, que es otra lisina en algunas de las proteínas, está ocupada por una asparagina en tres casos: *Canis familiaris*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*. Una sustitución Lys>Asn es lo que provoca el cambio encontrado en la familia fELX20, pero en la posición siguiente. Además, en ratón se ha producido una inserción de tres aminoácidos que no parece deberse a un error en la predicción de la secuencia, puesto que las bases que los codifican a nivel de DNA no se encuentran en el extremo de un exón, cosa que podría hacer sospechar un error en la determinación de la estructura exónica. Por

otra parte, en esta región aparecen cuatro residuos más de lisina que sí están conservados en todas las secuencias, a diferencia de lo que ocurre en la posición 578.

Con estos datos y sin conocer la función que desempeña la proteína es muy difícil poder predecir si este cambio de aminoácido puede tener alguna influencia sobre dicha función. Los resultados de la búsqueda de secuencias similares a FLJ14503 indican también una homología de alrededor del 40 - 50% con la proteína humana MAP7. Esta proteína, también denominada E-MAP-115, es una proteína de unión a microtúbulos expresada principalmente por células de origen epitelial (Masson y Kreis, 1993).

La organización de los microtúbulos varía de acuerdo a sus diferentes funciones durante el ciclo celular. En interfase están implicados en el posicionamiento de los orgánulos y en el transporte vesicular, mientras que durante la mitosis, los microtúbulos del huso acromático aseguran la correcta segregación de las cromátidas hermanas a las dos células hijas. Son estructuras muy dinámicas, y su estabilización y reorganización en los diferentes tipos celulares también son importantes para generar y mantener la polaridad en las células en diferenciación, como neuronas, mioblastos y células epiteliales. Existen numerosas proteínas que regulan el ensamblaje, la estabilidad y la arquitectura de los microtúbulos, y que reciben el nombre de MAPs (proteínas asociadas a microtúbulos). Sus funciones pueden ser muy variadas: estabilizarlos, desestabilizarlos, cortarlos, actuar como motores sobre ellos, etc. (Pollard y Earnshaw, 2004). Las MAPs son muy abundantes en cerebro, ya que los microtúbulos juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la estructura neuronal.

Según la clasificación expuesta en Pollard y Earnshaw (2004), MAP7 pertenece al grupo de MAPs estabilizadoras de microtúbulos, al igual que MAP1A, MAP1B, MAP2, MAP4 y tau, entre otras. Sin embargo, no presenta similitud de secuencia con ninguna de ellas. MAP1A, 1B, 2 y tau son neuronales, mientras que MAP4 se expresa en células no neurales, aunque a nivel estructural MAP2, MAP4 y tau forman una familia y MAP1A y 1B otra. MAP7 fue aislada a partir de homogenados de células HeLa, de origen epitelial, y sus características de unión a microtúbulos y sedimentación la diferencian del resto de MAPs (Masson y Kreis, 1993). En algunos tipos celulares, aunque no en todos, esta proteína se suelta de los microtúbulos en el inicio de la mitosis para reasociarse a ellos progresivamente a partir de profase tardía, en un proceso regulado por la fosforilación de algunos de sus residuos (Masson y Kreis, 1995). Su distribución a lo largo del desarrollo embrionario y en órganos adultos ha sido estudiada en el ratón, y se ha visto que predomina en epitelios, células del linaje espermatogénico y en algunos tipos de neuronas (Fabre-Jonca *et al.*, 1998). Estudios con queratinocitos indican que MAP7 juega un papel en las últimas etapas de la diferenciación de estas células, coincidiendo con la formación de contactos intercelulares (Fabre-Jonca *et al.*, 1999). Otros análisis han demostrado que *MAP7* es un gen inducible por ácido retinoico y que es necesario para la espermatogénesis (Komada *et al.*, 2000). Sin embargo, no parece que la función de esta proteína sea modular la dinámica de los microtúbulos (Faire *et al.*, 1999) y se piensa que podría estar implicada en la interacción de éstos con otros elementos del citoesqueleto.

En concordancia con la homología identificada a nivel de secuencia aminoacídica entre FLJ14503 y MAP7, diversos programas bioinformáticos predicen la existencia de un dominio E-MAP-115 de unión a microtúbulos entre los aminoácidos 377 y 568 de FLJ14503 (ver figura D2). Ésta, al igual que MAP7, no muestra similitud de secuencia con otras MAPs. La funcionalidad de este dominio se comprobó transfectando fusiones de FLJ14503 a la proteína verde fluorescente en células CHO-K1. Como se ha descrito en Resultados, la proteína aparece asociada a microtúbulos (ver figuras R9 a R11), lo que podría convertirla en un nuevo miembro de una familia de MAPs definida por MAP7. De este modo, partiendo de la información obtenida por similitud de secuencia y completándola con estudios de localización subcelular, se ha podido demostrar que la proteína codificada por *FLJ14503* es, muy probablemente, una nueva MAP, para la que, de momento, se desconoce su función. Con respecto al cambio c.1734G>T, la transfección de la variante K578N en el mismo tipo celular proporciona imágenes idénticas en cuanto a su localización subcelular, lo que indica que, al menos a ese respecto, el cambio hallado en fELX20 no altera la proteína.

Es importante destacar que FLJ14503 aparece también en el núcleo de las células transfectadas, algo que no ocurre con MAP7, ni con otras proteínas asociadas a microtúbulos.

Un análisis con el programa PSORTII predice una localización nuclear de la proteína con una probabilidad del 87%, basándose en la presencia de cuatro señales bipartitas de localización nuclear en las posiciones 81, 132, 452 y 459, y otras tres señales simples en 330 y 540. Si se realiza el mismo análisis con la proteína MAP7, no aparece ninguna señal de localización nuclear. Esto podría tener implicaciones funcionales importantes, aunque de momento, sin más datos acerca de la proteína, es difícil hacer predicciones. En cualquier caso, la localización nuclear de FLJ14503 parece excluir a los nucleolos, que aparecen como manchas más oscuras en el interior del núcleo.

Otro dato destacable es la variabilidad que aparece en la intensidad de la señal de núcleo y citoplasma entre unas células y otras. Para evitar que las diferencias en los niveles de proteína que expresa cada célula se interpreten erróneamente, se ha comparado la intensidad relativa entre núcleo y citoplasma de cada célula. Algunas células muestran una señal nuclear mucho más intensa que otras a intensidades similares en el citoplasma, mientras que en otras ni siquiera parece haber señal en el núcleo. Tal vez la localización nuclear de FLJ14503 dependa del momento del ciclo celular en que se encuentra cada célula. Como el análisis efectuado no permite discriminar entre células en G1, S y G2, no es posible establecer una correlación.

Especial atención merece el efecto que la expresión de FLJ14503 tiene sobre los microtúbulos en las células CHO-K1. Lo primero que hay que tener en cuenta es que al transfectar células con una construcción de una proteína, se está provocando una sobreexpresión de la misma, puesto que a los niveles de proteína endógena que pueda estar expresando la línea celular en cuestión, se añade la expresión a partir de la construcción introducida. Generalmente, los promotores que contienen estos vectores son bastante fuertes, así que se suele sintetizar una cantidad elevada de proteína. Esto presenta ventajas e inconvenientes: por una parte el exceso de proteína puede asumir una localización subcelular distinta de la real, sobre todo en el caso de que se sature el orgánulo o compartimento subcelular al que va destinada. A este respecto se puede señalar que la localización citoplásmica de FLJ14503 podría deberse a un exceso de proteína en las células, aunque tampoco se puede descartar la posibilidad de que existan diferentes *pools* de proteína con distinta localización subcelular. Además puede ocurrir que se induzca la expresión de una proteína que no es expresada en condiciones normales por el tipo celular que ha sido transfectado, en cuyo caso se estará alterando la dinámica normal de la célula. Sin embargo, por otra parte esto mismo puede suponer una ventaja, ya que se puede observar el efecto que la sobreexpresión de una proteína concreta tiene sobre la morfología, el comportamiento o la función celular, lo que puede proporcionar indicios sobre la función que ésta desempeña.

Teniendo esto en cuenta, parece obvio que las alteraciones que se aprecian en la distribución de los microtúbulos en las células CHO-K1 transfectadas se deben a la sobreexpresión de la proteína FLJ14503. La morfología normal del citoesqueleto de microtúbulos en células no polarizadas es más o menos radial: éstos parten del centrosoma, que generalmente ocupa una posición perinuclear, y se extienden hacia la periferia celular (ver imagen C2 de la figura R10). En las células transfectadas, los microtúbulos parecen formar una especie de haces, puesto que el grosor de estas estructuras indica que deben estar compuestas por varios microtúbulos que se mantienen unidos, cabe suponer, por la acción de FLJ14503. Estos haces, que en ocasiones alcanzan una gran longitud, son curvos y se distribuyen por toda la célula. Este efecto de agrupamiento de los microtúbulos (*microtubule bundling*) se ha descrito para otras MAPs. En el caso de MAP7 se observaron estructuras similares al transfectar células Vero (una línea celular de fibroblastos de mono), que no expresan habitualmente esta proteína de forma significativa (Masson y Kreis, 1993). MAP7 se expresa principalmente en células epiteliales, y las células Vero son de origen fibroblástico. Las células CHO-K1 también son de origen fibroblástico, y dada la similitud entre FLJ14503 y MAP7, podría estar ocurriendo algo similar en este caso. Además de MAP7, otras MAPs también pueden inducir la formación de haces de microtúbulos: es el caso, por ejemplo, de las proteínas doblecortina, necesaria para la migración neuronal (Horesh *et al.*, 1999), CLIP-115, que forma haces con un aspecto similar a FLJ14503 y MAP7 (Hoogenraad *et al.*, 2000), el dominio repetitivo de MAP2, que forma haces perinucleares más densos y menos “rizados” (Ludin *et al.*, 1996) y la cadena ligera LC1 de MAP1A y 1B (Noiges *et al.*, 2002). Basándose en estos datos y los obtenidos en este trabajo, se podría proponer que FLJ14503 es una MAP con

capacidad de unir microtúbulos entre sí o, como mínimo, de estabilizarlos, permitiendo así la formación de estos haces de gran longitud.

Es evidente que son necesarios muchos más experimentos para dilucidar la función del gen *FLJ14503*:

- (1) Sería necesario transfectar otras líneas celulares de orígenes diferentes, y comprobar por *Northern blot* los niveles endógenos de expresión de la proteína en las diferentes líneas, correlacionándolo con los efectos que la transfección ejerza sobre ellas.
- (2) Habría que comprobar si *FLJ14503* actúa estabilizando los microtúbulos, por ejemplo sometiendo a las células a tratamientos con nocodazol o bajas temperaturas, que provocan su despolimerización en condiciones normales.
- (3) Sería interesante estudiar la localización de la proteína durante la mitosis. La sobreexpresión de *FLJ14503* no parece impedir la división celular y, a pesar de que las células CHO-K1 estudiadas no se encuentran en una situación fisiológica normal, al menos en cuanto a la dinámica de sus microtúbulos, esto podría estar indicando que *FLJ14503* se disocia de los microtúbulos durante algunos estadios de la mitosis.
- (4) Otro aspecto que podría investigarse es si los agregados que aparecen en la periferia celular, en algunos casos, se deben simplemente a la sobreexpresión de la proteína o si tienen algún significado funcional. A este respecto sería interesante visualizar otros componentes del citoesqueleto, como los filamentos de actina, y comprobar si existe alguna interacción entre ellos.
- (5) El análisis de la distribución tisular de la proteína, tanto a lo largo del desarrollo como en los tejidos adultos podría ser útil de cara a establecer su función.
- (6) Por último sería de especial interés para dilucidar la posible función o funciones del producto proteico de *FLJ14503*, la identificación de aquellos elementos con los que posea capacidad de interactuar.

Dado que la variante K578N de *FLJ14503* no sólo muestra una distribución subcelular idéntica a la proteína normal, sino que su sobreexpresión parece ejercer los mismos efectos sobre la dinámica de los microtúbulos, no parece probable que el cambio identificado en fELX20 sea patológico a nivel proteico. Aún así, no puede descartarse por completo su implicación en el fenotipo de los pacientes de esta familia, puesto que los datos sobre la función de *FLJ14503* son muy escasos. Por el momento, sería prioritario comprobar si la sustitución c.1734G>T altera de alguna forma el procesado del mensajero.

I.2 Región Xq24-q25

En esta región se han analizado dos genes, *AGTR2* y *GRIA3*. El análisis de ligamiento en la familia fELX101 permitió acotar, en un principio, una región que los contenía a ambos, obteniéndose además un valor *lod* superior a 2. Dado que *AGTR2* es el gen responsable de varios casos de retraso mental (Vervoort *et al.*, 2002), su análisis era imprescindible antes de considerar la existencia de un nuevo locus MRX definido por esta familia. Este gen se analizó también en la familia fELX18, que muestra dos zonas con posible ligamiento en el cromosoma X, una de ellas en Xq22.2-Xq24. No se hallaron en este gen cambios en ninguna de las dos familias. Posteriormente, la región candidata para fELX101 pudo reducirse a un intervalo de 7,6 Mb entre los marcadores DXS6805 y DXS7346, excluyendo a *AGTR2*, y confirmando así que no es el gen responsable del retraso mental en dicha familia. Dada la amplitud de las regiones candidatas en el caso de fELX18, tampoco es de extrañar la ausencia de mutaciones, puesto que las dos regiones contienen todavía numerosos genes aún por analizar, que podrían ser responsables del RM.

El gen *GRIA3* sólo fue analizado en fELX101 por no quedar incluido en la región de ligamiento de fELX18. Su análisis era también necesario ya que está interrumpido por una translocación en una paciente con desorden bipolar y retraso mental (Gécz *et al.*, 1999). Al no hallarse tampoco ningún cambio patológico en la familia fELX101, ésta fue publicada como MRX82 (Martínez *et al.*, 2004).

La región candidata actual para fELX101 abarca 7.6 Mb e incluye 42 genes confirmados y 16 predicciones. Tanto por tamaño, como por número de genes, esta región es excesivamente grande para abordar un análisis completo, pero podría plantearse una aproximación de genes candidatos, seleccionando aquellos que parezcan más idóneos en función de lo que se conoce hasta el momento sobre los genes implicados en retraso mental y, por supuesto, partiendo preferentemente de aquellos que muestren expresión en cerebro. Aun así, dada la diversidad de funciones que desempeñan los genes descritos hasta ahora (ver introducción), es difícil descartar genes *a priori*, sobre todo si su patrón de expresión incluye el tejido nervioso.

De los 42 genes confirmados en la región, 32 (incluyendo *GRIA3*) presentan expresión en cerebro, según los datos de procedencia de los ESTs que los representan. Algunos podrían ser considerados buenos candidatos, como por ejemplo:

- *DOCK11*: podría codificar un posible regulador de Rac.
- *ZCCHC12*: presenta una elevada expresión en cerebro y codifica una proteína con dedos de zinc.
- *NRF*: codifica un regulador transcripcional que reprime la expresión de algunos genes inducidos por NF κ B, como el gen de la sintasa de óxido nítrico, una sustancia que, como se ha visto en la introducción, podría estar implicada en procesos de memoria.
- *ZNF183*: también codifica una proteína con dedos de zinc.
- *GLUD2*: codifica la enzima glutamato deshidrogenasa 2, importante en el metabolismo del glutamato, que es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central.

Esto no significa, por supuesto, que cualquiera de los otros genes contenidos en la región y expresados en cerebro no pueda ser responsable del retraso mental que padecen los pacientes de la familia fELX101, pero un análisis de genes candidatos podría comenzar con los cinco genes expuestos anteriormente.

II. Síndrome de Coffin-Lowry

El análisis del gen *RPS6KA3* en un paciente con síndrome de Coffin-Lowry ha permitido identificar la inserción *de novo* de un elemento LINE-L1 muy cerca del sitio aceptor del procesado del exón 4. Esta inserción provoca el *skipping* de dicho exón en el mensajero, dando lugar a un desplazamiento de la pauta de lectura y a la aparición de un codón de parada prematuro. La ausencia de proteína funcional en el paciente es, por tanto, la causa del síndrome que éste presenta.

El hecho de que la inserción del elemento LINE-L1 altere el procesado del transcrito primario se debe con toda probabilidad a que no sólo interrumpe la secuencia rica en pirimidinas cercana al sitio aceptor del procesado, sino que aleja en 2,8 kb la secuencia rama, que normalmente se sitúa entre 20 y 50 bases aguas arriba del sitio aceptor. Por otra parte, la presencia de la cola poliA/poliT introducida por la inserción podría afectar también al propio mecanismo de procesado.

Los elementos transponibles son secuencias de DNA con capacidad para moverse de un lugar a otro del genoma. Existen dos tipos principales: transposones de DNA, de estructura similar a los bacterianos y que se transponen mediante intermediarios de DNA. No dejan copias de sí mismos en el lugar de origen y se cree que no son activos en la actualidad. El segundo tipo lo forman los retrotransposones, que emplean intermediarios de RNA y se duplican con cada nueva transposición. Aunque la mayoría de ellos son inactivos, algunos mantienen la capacidad de retrotransponerse.

Existen diferentes clases de retrotransposones, que en conjunto representan más del 40% del genoma humano. Los elementos L1 (revisados en Ostertag y Kazazian 2001a)

pertenecen a la familia de los LINEs (*long interspersed nucleotide elements*) y dan cuenta de alrededor del 17% del genoma (Lander *et al.*, 2001). Estos elementos poseen una región 5' no traducida con actividad promotora interna, dos pautas abiertas de lectura, una región 3' no traducida que termina en una señal de poliadenilación y una cola poliA. De las 520.000 copias presentes en el genoma humano, la gran mayoría son elementos inactivos, por deleciones de la región 5', inversiones o mutaciones puntuales, existiendo sólo entre 3000 y 5000 elementos completos. La retrotransposición de este tipo de elementos implica una serie de pasos: transcripción (restringida, generalmente, a las células de la línea germinal), procesado y exportación del RNA mensajero, traducción, modificaciones postraduccionales y formación de una partícula ribonucleoproteica, reentrada al núcleo, transcripción inversa e integración en el genoma.

Los elementos L1 son retrotranscritos e integrados en el genoma mediante un mecanismo que acopla ambos procesos y que se denomina transcripción inversa cebada por la diana (*target primed reverse transcription*) o TPRT (Luan *et al.*, 1993), como se muestra en la figura D4.

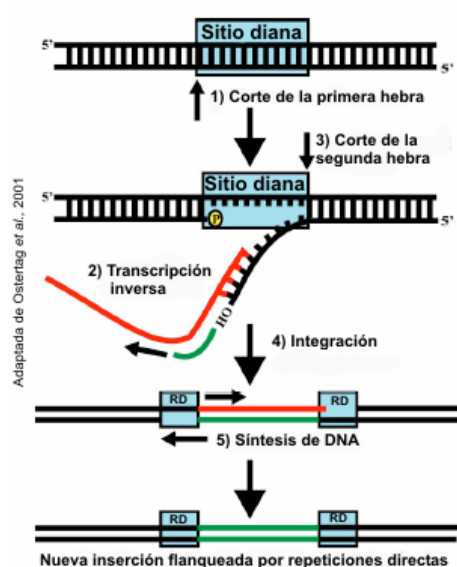


Fig. D4: Mecanismo de transcripción inversa cebada por la diana o TPRT.

Según este modelo, la endonucleasa corta una de las hebras del DNA en la diana, produciendo un extremo 3'-OH libre en el lugar del corte. Cuando el RNA del transposón aparea en este lugar, la transcriptasa reversa utiliza este RNA como molde y el extremo 3' hidroxilo como cebador para la transcripción. Después se corta la segunda hebra del DNA, se integra el cDNA y se completa la síntesis.

De acuerdo con este modelo, la secuencia del lugar de inserción suele ser rica en timinas, ya que así puede complementar con la cola poliA del elemento L1. En el paciente EX441 la inserción se ha producido a 8 bases del sitio aceptor del procesado del exón 4, precisamente en la zona rica en pirimidinas. Como se observa en la figura R17, se trata de una zona bastante rica en timinas, lo que concuerda con el modelo propuesto.

Aproximadamente un 25% de las nuevas inserciones de elementos L1 presentan inversiones de un tamaño que varía entre algunos cientos y 1500 pb. La inversión implica siempre a la parte 5' del elemento y suele estar a su vez interrumpida en su extremo 5'. El punto de la inversión puede estar además intacto o presentar duplicaciones o deleciones. De hecho, la inserción del paciente EX441 es un ejemplo de ello, como se comprueba en la figura R17. Aunque a primera vista pueda parecer que la inversión, en este caso, afecta a la región 3' del elemento, ello es debido a que la figura se ha representado tomando como referencia la orientación de la pauta de lectura del gen. Si se contempla la orientación contraria, la inserción presentaría la estructura que se presenta en la figura D5.



Fig. D5: Estructura de la inserción L1 en el paciente 441

Se ha representado la inserción L1 del paciente EX441 en la orientación contraria a la que aparece en la figura R17, es decir, teniendo en cuenta el sentido del elemento. Los números corresponden a las bases de la secuencia consenso del elemento L1 y las flechas indican la orientación de los fragmentos.

El elemento insertado está interrumpido en su zona 5', pero el extremo 3' está completo. Dentro del fragmento insertado, la zona 5' del elemento ha sufrido una inversión, y en el punto de inserción se ha producido la delección de 76 pb. La estructura concuerda con la de otras inserciones recientes, y puede ser explicada por el modelo de doble cebado propuesto por Ostertag y Kazazian (Ostertag y Kazazian, 2001b) y que aparece en la figura D6.

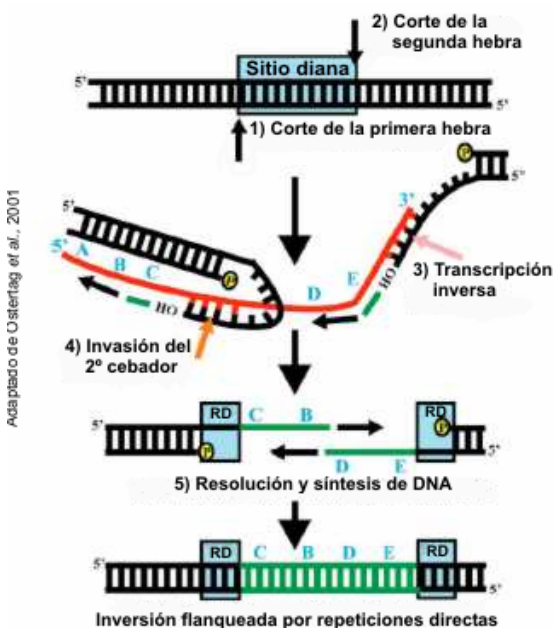


Fig. D6: Modelo de doble cebado.

Si el corte de la segunda hebra del DNA tiene lugar antes de que se complete la retrotranscripción, se genera un segundo grupo 3'-OH, que estará disponible para actuar como cebador. Este cebador potencial puede invadir el RNA del elemento L1 y promover la retrotranscripción desde un punto interno del mismo. La resolución de la estructura RNA/cDNA generada daría lugar a elementos con su extremo 5' interrumpido e invertido.

Se estima que la fracción de mutaciones en humanos debidas a sucesos de retrotransposición es de aproximadamente 1/600, y una de cada 1500 mutaciones estaría provocada por la inserción de un elemento L1 (Kazazian, 1999). Un estudio reciente sitúa entre 80 y 100 el número de elementos L1 con capacidad de retrotransposición, aunque sólo unos pocos son realmente activos, dando cuenta de la mayoría de inserciones *de novo* (Brouha et al., 2003). Aparte de la inserción descrita en este trabajo, existen al menos otras 13 inserciones patológicas de elementos L1 (revisado en Ostertag et al., 2001a), de las que 9 se han producido en exones (provocando la aparición de codones de parada o el *skipping* del exón) y las otras 4 en intrones (que provocan también *skipping*, disminución de la tasa de transcripción o una menor estabilidad del transcrito primario). Afectan, por ejemplo, a genes como *CYBB*, provocando la enfermedad granulomatosa crónica (Meischl et al., 1998 y 2000), *HBB*, en un paciente con β -talasemia (Divoky et al., 1996) o *RP2*, en un paciente con retinosis pigmentaria (Schwahn et al., 1998).

III. Síndrome de Prieto

III.1 Análisis de mutaciones

El análisis de ligamiento en la familia fELX7 ha permitido acotar la región candidata a un intervalo de 2,4 Mb entre los marcadores DXS1056 y DXS1201. En esta región se han analizado 13 genes: 9 de ellos son genes caracterizados, otros dos se consideran pseudogenes en las bases de datos y los dos restantes son probablemente genes que no codifican proteínas. El criterio para incluir estos genes en el estudio ha sido ya comentado en Resultados. El método seguido para su análisis ha sido la amplificación y secuenciación, bien de exones o, si era posible, del cDNA. Además se ha analizado de forma cuantitativa la expresión de 6 de los genes candidatos.

Se han identificado un total de 23 cambios, 20 en los exones y 3 en las regiones no traducidas, aunque todos ellos, excepto uno, están descritos como polimorfismos en dbSNP o presentes en, al menos, una secuencia de las bases de datos. De hecho, para la gran mayoría se han encontrado varios clones de cDNA que contienen el cambio en cuestión.

De los 20 cambios identificados en los exones, tres son sinónimos y 14 implican una sustitución a nivel aminoacídico, mientras que los tres restantes suponen la adición o eliminación de varios residuos en la proteína (adición de 7 aminoácidos en *USP9X* y eliminación de 6 y adición de 5 en *CASK*). Sin embargo, y como ya se ha comentado, en todos los casos se trata de polimorfismos.

El único cambio no hallado en las secuencias de las bases de datos es el c.2048G>A (p.Arg683His) en el gen *CRSP2*. A pesar de no haberse identificado tampoco en más de 200 cromosomas X de individuos no afectados por el síndrome de Prieto, se ha podido descartar como patológico, ya que no segrega con la enfermedad en esta familia: tres personas no afectadas lo presentan en hemi- u homocigosis (ver figura R24). Es posible que se trate de un polimorfismo muy poco frecuente en la población y que por eso no aparezca en las muestras control ni en las secuencias de las bases de datos. Este hecho pone de manifiesto la relevancia de contar con muestras del mayor número posible de miembros de la familia, ya que la probabilidad de que un miembro sano de la familia presente un cambio raro es mucho mayor que la de encontrarlo en la población general cuando su frecuencia es muy baja.

Un análisis cuantitativo de la expresión de los genes candidatos parecía más adecuado en este caso que en el retraso mental inespecífico, ya que por tratarse aquí de una forma sindrómica, se espera que el gen mutado ejerza sus efectos sobre diferentes tejidos y no sólo en el cerebro. El análisis cuantitativo se llevó a cabo sobre 8 de los 9 genes caracterizados en la región, ya que para el noveno no existían sondas que asegurasen la ausencia de contaminación por DNA genómico residual. Hasta el momento sólo se han obtenido resultados fiables para 6 de ellos, como se ha indicado en Resultados. En todos los casos, los niveles de expresión de los genes no parecen diferir significativamente de los niveles hallados en los controles. Las muestras de los pacientes corresponden a dos hermanos y siempre, al menos, uno de los dos pacientes presenta valores dentro del rango de los controles, considerando el error asociado a los datos. No es probable, por tanto, que alguno de estos seis genes (*BCOR*, *ATP6AP2*, *MGC39350*, *CRSP2*, *USP9X* y *DDX3X*) sea responsable del fenotipo que muestran los afectados en la familia fELX7.

Por ello, se plantea una situación similar a la descrita para la familia fELX2: ¿cómo se puede explicar la ausencia de mutaciones en los genes analizados?

- En algunos genes no ha sido posible comprobar (*GPR82*) o cuantificar (*CASK*, *GPR34*) su expresión, por lo que no pueden ser descartados definitivamente. Esto es aplicable también a los dos genes considerados como pseudogenes en las bases de datos (*MKRN4* y *LOC158781*).
- De nuevo hay que considerar la posibilidad de que existan genes todavía no identificados en la región y que podrían ser nuevos candidatos a analizar.
- No puede excluirse la posibilidad de que alguna secuencia reguladora esté alterada en los pacientes de la familia fELX7, influyendo en la regulación de un gen localizado fuera de la región candidata.

- Por último, y como ya se ha comentado, el análisis de mutaciones se ha centrado también en los genes que codifican proteínas. Sin embargo, se está descubriendo un número creciente de RNAs no codificantes, pero implicados en funciones reguladoras, que también son susceptibles de provocar enfermedades en caso de estar mutados. El gen *LAVA* podría corresponder a una secuencia de este tipo, como se discutirá más abajo.

De todos los genes analizados en la región candidata para el síndrome de Prieto, el gen *CASK* es, sin duda, el más complejo. Codifica una proteína de andamiaje, que forma complejos multiproteicos en los terminales sinápticos, pero cuya expresión no está restringida al cerebro, siendo prácticamente ubicua. *CASK* también se localiza, por ejemplo, en diferentes dominios de la membrana lateral o basolateral en diversos tipos de células epiteliales (Cohen *et al.*, 1998). Este gen puede considerarse como uno de los mejores candidatos de la región, ya que el síndrome de Prieto incluye otros síntomas aparte de los neurológicos. Se han identificado diversos transcritos, algunos de los cuales supondrían la generación de una proteína más corta y con un extremo C-terminal diferente al de la proteína normal (ver figura R26), que carecería del dominio de unión a la proteína 4.1 y los dominios SH3 y guanilato quinasa. Esto hace suponer una regulación compleja de la expresión de este gen, en la que se generan diferentes transcritos mediante procesado alternativo, que podrían ser, además, específicos de tejido. Por tanto, a pesar de que los datos obtenidos hasta el momento no señalan una posible implicación de este gen en el síndrome de Prieto, tampoco es posible descartarlo completamente.

III.2 Análisis del gen *LAVA*: implicaciones

Durante el análisis de la región Xp11.4 se identificó un posible gen (*LAVA*) en la base de datos Aceview que presentaba un interés adicional por su solapamiento con la pauta de lectura del gen *CRSP2* (ver figura R21). Según la información disponible en esta base de datos, cabía la posibilidad de que el gen *LAVA* se extendiera más en dirección 5', lo que implicaría una mayor región de solapamiento con *CRSP2*. Se decidió, por tanto, llevar a cabo un análisis por *Northern blot* que permitiera averiguar el tamaño real del transcrito a la vez que verificar su existencia. El resultado de este análisis fue sorprendente, ya que se obtuvo una señal correspondiente a un transcrito de tan sólo 200 pb, menor incluso que la sonda empleada para detectarlo (ver figura R35).

¿Cómo puede interpretarse un resultado como éste? Por el aspecto de la hibridación, parece tratarse de un transcrito específico y no de un artefacto, ya que la señal se encuadra perfectamente en las carreras de RNA correspondientes y aparece únicamente en algunos tejidos. Pero un mensajero de tamaño tan reducido, y que hibrida con una sonda que contiene en su mayor parte la región 3' no traducida del supuesto gen, no parece muy probable que esté codificando una proteína. Tampoco puede descartarse completamente esa opción, ya que al ser la sonda empleada de mayor tamaño que la señal obtenida, no se conoce con exactitud cuál es la secuencia que se está detectando.

En los últimos años, los RNAs no codificantes (ncRNAs) están recibiendo una atención muy especial. Mientras que las secuencias que codifican proteínas representan tan sólo el 1.5% del genoma humano, hay una proporción mucho mayor que está siendo expresada (Wong *et al.*, 2001). Si por término medio, el 95% de un gen que codifica para una proteína corresponde a intrones, al menos el 30% del genoma se ha de transcribir. Suponiendo que exista un número similar de genes que no codifican proteínas, que de genes "convencionales", es probable que, al menos, la mitad del genoma sea transcrita, algo que concuerda con los análisis recientes de los cromosomas 7, 21 y 22 (Kapranov *et al.*, 2002; Scherer *et al.*, 2003). Por lo tanto, alrededor del 98% de todo lo que se transcribe está formado por ncRNAs procedentes de los intrones de los genes que codifican proteínas y de exones e intrones de genes que no las codifican y que en ocasiones solapan con los genes convencionales (revisado en Mattick y Makunin, 2005). Durante mucho tiempo se ha considerado todo este

RNA como “sobrante” e inútil, a excepción de los tRNAs, rRNAs y snRNAs. Sin embargo, una proporción significativa de estos ncRNAs parece ser estable en la célula y el número de genes funcionales que codifican ncRNAs ha ido incrementándose de forma espectacular en los últimos años, siendo descritos ya más de 800 en mamíferos.

Estos ncRNAs pueden presentar tamaños muy variables y participan en diversas funciones, desde la inactivación del cromosoma X para la compensación de dosis (genes *Xist* y *Tsix*), hasta la regulación traduccional (miRNAs y siRNAs). Se han descrito también enfermedades provocadas por cambios en ncRNAs, por ejemplo la ataxia espinocerebelosa de tipo 8 (Nemes *et al.*, 2000). Numerosas revisiones sobre el tema han sido publicadas en los últimos años y pueden consultarse para una mayor información (Mattick, 2001; Storz, 2002; Szymansky y Barciszewski, 2002; Szymansky *et al.*, 2003; Mattick, 2003; Morey y Avner, 2004; He y Hannon, 2004; Ying y Lin, 2004; Mattick, 2004; Mattick y Makunin, 2005).

Entre las funciones de los ncRNAs nos interesa destacar aquí su posible participación en la regulación de la cromatina. La dinámica y regulación de la cromatina, tanto a gran escala como en regiones promotoras, parece estar controlada por pequeños RNAs reguladores no codificantes. Toda una serie de procesos, tales como la metilación del DNA, la impronta, la transvección, la variegación por efecto de posición, la remodelación de la cromatina, y la activación y represión de dominios cromosómicos parecen implicar señales de RNA. Es interesante señalar que varios de los genes implicados en retraso mental juegan también un papel en algunos de estos procesos, por lo que es probable que algunas de estas secuencias puedan estar implicadas, de forma directa o indirecta, en algunos de los casos de retraso mental en los que no se encuentran mutaciones en los genes convencionales.

Por otra parte, se ha propuesto que estos ncRNAs podrían formar una especie de red de control de señales actuando en *trans*, que permitirían interconectar de forma rápida las actividades que tienen lugar en distintos puntos de la célula, integrando información procedente tanto del exterior, como del interior celular, de manera análoga a la forma en que el cerebro procesa la información. De hecho, muchos de estos ncRNAs (principalmente miRNAs) son expresados de manera específica durante el desarrollo cerebral y la diferenciación neuronal (Miska *et al.*, 2004). Además de miRNAs, se ha descrito un ncRNA de 200 pb, denominado BC200 RNA que es expresado exclusivamente en cerebro y que se localiza en dominios somatodendríticos (Tiedge *et al.*, 1993).

Por último, la proteína FMRP, cuya ausencia provoca el síndrome del cromosoma X-frágil, una de las causas más frecuentes de retraso mental de origen genético, es una proteína de unión a RNA implicada en el control traduccional. Actualmente, se cree que FMRP participa en fenómenos de plasticidad sináptica a través de la regulación del transporte de RNA mensajero y de la síntesis local de proteínas en las sinapsis. Esta proteína se asocia con polirribosomas, en una forma dependiente de RNA, a través de partículas ribonucleoproteicas de RNA mensajero (mRNP), y puede suprimir la traducción tanto *in vitro*, como *in vivo*. Una de sus dianas es la proteína MAP1B, implicada en la regulación del citoesqueleto de microtúbulos. La información de que se dispone actualmente, sugiere que FMRP podría regular la traducción de sus mensajeros diana a través de la interacción con miRNAs: una vez que FMRP se une a su mRNA diana, reclutaría al complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*) y a los miRNAs, facilitando el reconocimiento entre los miRNAs y sus mRNAs diana. Este mecanismo permitiría que esta actividad fuera rápida y reversible, requisitos necesarios para la plasticidad sináptica dependiente de la síntesis de proteínas (Jin *et al.*, 2004).

El gen *LAVA* podría incluirse dentro de este grupo creciente de ncRNAs, dada su posible naturaleza no codificante y su solapamiento con otro gen. Atendiendo a su tamaño, no parece que se trate de un miRNA, ya que en ese caso cabría esperar haber detectado los pre-miRNAs, de unas 70 pb. No obstante, como ya se ha dicho, el rango de tamaño de los ncRNAs es muy variable. El patrón de expresión tisular obtenido por *Northern blot* reduce la probabilidad de que este gen pueda estar implicado en el síndrome de Prieto, ya que no parece presentar una gran expresión en cerebro, de hecho, la señal es casi imperceptible. Sin embargo, otro de los genes analizados en este trabajo reúne también algunas características que le sitúan como candidato a ser un ncRNA. Se trata de *TNRC8* (o *hura*). A pesar de que se le predice un tamaño de 3,75 kb, no parece contener una pauta abierta de lectura clara. Existen

50 clones de cDNA que confirmarían que se trata de una secuencia expresada, y al menos 17 de ellos proceden de tejido cerebral. En este trabajo, se ha secuenciado la posible pauta de lectura, de unas 200 pb, no presentando similitud con ninguna proteína conocida. No se ha identificado tampoco ningún cambio respecto a la secuencia de la base de datos. También se ha comprobado si la repetición CTG, presente en la zona 5', pudiera haber sufrido una expansión, pero se ha descartado esta posibilidad. No obstante, considerando el alto grado de conservación que presenta la región 5', un análisis más detallado de dicha región, así como un análisis de expresión por *Northern blot*, podrían proporcionar información relevante sobre este gen, antes de ser excluido como candidato.

IV. Síndrome de Lenz

Este síndrome fue descrito por Lenz en 1955, como una microftalmia recesiva ligada al cromosoma X, acompañada de múltiples malformaciones. Desde entonces, se han ido publicando diferentes familias, que han permitido definir los principales signos clínicos del síndrome: microftalmia o anoftalmia, microcefalia, retraso mental, malformaciones del pabellón auditivo externo y de labio y paladar, y rasgos dismórficos urogenitales y esqueléticos (Stevenson *et al.*, 2000). No obstante, y como suele ocurrir con las formas sindrómicas, el espectro clínico de síntomas es bastante amplio, y la variabilidad entre los pacientes también, siendo la microftalmia la única característica presente en el 100% de los casos. En 1991, Graham y colaboradores publicaron ligamiento de una familia con anoftalmia en la región Xq17-28. Diez años después, se publicaron datos de ligamiento para el síndrome de Lenz, obtenidos de una familia con 4 afectados, y que localizaban el *locus* de la enfermedad en un intervalo de 17.65 cM en la región cromosómica Xq27-Xq28, coincidiendo con la localización previa para la anoftalmia (Forrester *et al.*, 2001). Sin embargo, en el año 2002 se publicó una nueva familia, con diagnóstico clínico compatible con síndrome de Lenz, y que mostraba ligamiento con un intervalo de 10 cM en el brazo corto del cromosoma X, en concreto en la región Xp21.1-Xp11.4 (Ng *et al.*, 2002). En este segundo intervalo se identificó posteriormente una mutación en el gen *BCOR*, que suponía un cambio aminoacídico (Ng *et al.*, 2004), haciendo patente la existencia de al menos dos *loci* para esta enfermedad. Curiosamente, mutaciones más graves en *BCOR*, como deleciones, desplazamientos de la pauta de lectura y aparición de codones de parada prematuros, provocan el síndrome OFCD (Ng *et al.*, 2004), una rara enfermedad dominante ligada al cromosoma X, con letalidad masculina y caracterizada por rasgos dismórficos oculares, faciales, cardíacos y dentales, pero con un fenotipo más leve que el síndrome de Lenz. El hecho de que una mutación presumiblemente hipomórfica (el cambio aminoacídico p.P85L) provoque un fenotipo diferente y limitado a varones, es decir, de herencia recesiva, podría estar parcialmente relacionado con la inactivación preferencial del cromosoma X portador de la mutación, observada en al menos seis mujeres afectadas por el síndrome OFCD.

En el caso de la familia fELX91, en la que dos de sus miembros están afectados por el síndrome de Lenz, se ha podido identificar la mutación responsable de la enfermedad; una deleción AG en el gen *PQBP1*. Se trata del cambio c.461_462delAG, que provoca el desplazamiento de la pauta de lectura y la aparición de un codón de parada prematuro en el exón 4 de dicho gen. Mutaciones en *PQBP1* han sido asociadas a diversos síndromes (Síndromes de Renpenning, Sutherland-Haan, Hamel, Golabi-Ito-Hall y Porteous), así como a un caso de retraso mental inespecífico, pero hasta ahora no había sido relacionado dicho gen con el síndrome de Lenz.

PQBP1 está mutado en diferentes patologías, sin embargo, el espectro de mutaciones es mucho más reducido, puesto que sólo hay descritas 6 mutaciones distintas. Esto supone que determinados cambios están presentes en familias que manifiestan fenotipos diferentes, lo que refleja una gran variabilidad fenotípica interfamiliar. La tabla D2 recoge las características clínicas más relevantes de las distintas familias, así como la mutación identificada en cada una de ellas en *PQBP1*.

Familia / Síndrome	Características clínicas	Mutación
N9	RM, microcefalia, retraso del crecimiento, úvula hendida, coloboma unilateral de iris y coroides en un paciente	c.463_464dupAG
SHS / Sutherland-Haan	RM, microcefalia, talla baja, braquicefalia, diplegia espástica, microorquidia, estenosis/atresia anal	c.463_464dupAG
Porteous	RM, talla corta	c.463_464dupAG
N45	RM, microcefalia, atresia anal, situs inversus	c.459_462delAGAG
MRX55	RM, tamaño corporal reducido en un paciente	c.459_462delAGAG
K8600 / Renpenning	RM, microcefalia, algunas rasgos dismórficos faciales	c.459_462delAGAG
Fichera <i>et al.</i> , 2002 y 2005 / Sutherland - Haan	RM, microcefalia, hiperreflexia o diplegia espástica y rasgos dismórficos faciales	c.459_462delAGAG
N40 / Hamel	RM, microcefalia, talla corta, espasticidad, defecto cardíaco, paladar leporino o muy arqueado, otras rasgos dismórficos craneofaciales	c.461_462delAG
fELX91 / Lenz	RM, microftalmia, microcefalia, talla corta, coloboma de coroides, hipoplasia renal, diplegia espástica, rasgos dismórficos faciales y digitales	c.461_462delAG
K8110 / Renpenning	RM, microcefalia, talla corta, coloboma ocular en un paciente (de 20 totales), rasgos dismórficos faciales, microorquidia	c.641insC
K9008	RM, microcefalia, talla corta, rasgos dismórficos faciales	c.575_576delAG
Golabi-Ito-Hall	RM, microcefalia, talla corta, rasgos dismórficos faciales	c.194A>G

Tabla D2: Características clínicas y cambios nucleotídicos de las diferentes familias con mutaciones en *PQBP1*. Adaptado de Stevenson *et al.*, 2005.

Como puede observarse, la mayoría de las mutaciones descritas afectan a la misma secuencia del gen: un tramo de 6 repeticiones AG en tándem en el exón 4, incluidas en el dominio DR/ER (ver figura D7). La inserción o delección de dinucleótidos AG en dicho dominio provoca el desplazamiento de la pauta de lectura, dando lugar a la aparición de un codón de parada prematuro. Las proteínas resultantes, además de estar incompletas, carecen de la señal de localización nuclear, por lo que su localización en la célula se ve alterada (Kalscheuer *et al.*, 2003), lo que sin duda tiene efectos negativos sobre su función. Se ha detectado también un bajo nivel de proteína en linfoblastos, probablemente debido a una degradación selectiva de los mensajeros con codones de parada prematuros. Dos de los tres cambios restantes también alteran la pauta de lectura, y sólo se ha descrito un cambio aminoacídico, que modifica el triplete altamente conservado YYW del dominio WW, convirtiéndolo en YCW. Mutaciones en este triplete eliminan la actividad promotora de la transcripción de la RNA polimerasa II (Komuro *et al.*, 1999a).

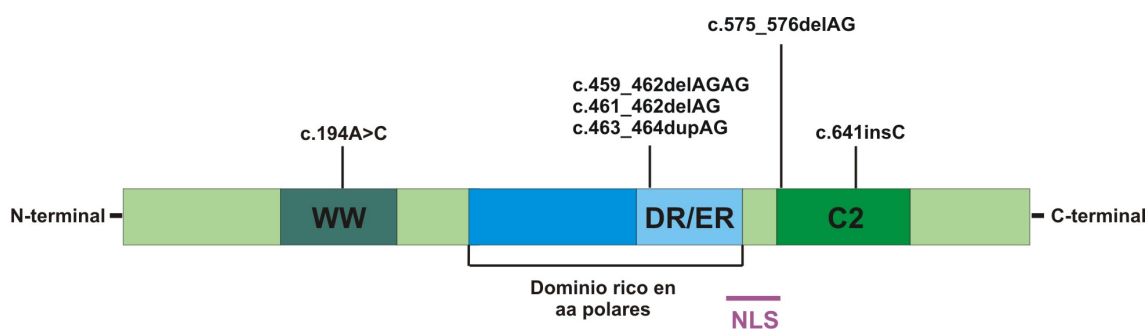


Fig. D7: Dominios de PQBP1 y posición relativa de las mutaciones identificadas.

Los diferentes dominios de PQBP1 se han representado como cajas de colores y sobre ellos se indica, referida a la secuencia NM_005710, la posición de las mutaciones identificadas hasta el momento. Se muestra también la posición de la señal de localización nuclear (NLS). Esta figura ha sido adaptada de Lenski *et al.*, 2004.

Para comprender las posibles causas de la variabilidad fenotípica de las mutaciones en *PQBP1*, es necesario conocer la información de que se dispone actualmente acerca de este gen. *PQBP1* codifica una proteína predominantemente nuclear, con varios dominios funcionales:

- (i) un dominio WW, denominado así por contener residuos de triptófano, tirosina y prolina a intervalos regulares, y que presenta una cierta homología con los dominios SH3. Actuaría como un dominio de interacción, ya que se une a motivos ricos en prolina, presentes en otras proteínas.
- (ii) 5 repeticiones en tándem de 7 aminoácidos, en su mayoría ácidos y básicos, que de momento parecen específicas de *PQBP1*.
- (iii) una zona con repeticiones DR / ER, llamadas así por estar formadas por arginina (R), que alterna con ácido aspártico (D) o glutámico (E). Estas regiones estarían implicadas en la interacción con trectos de poliglutaminas de otras proteínas. Junto con la región anterior, completan el dominio rico en aminoácidos ácidos y básicos.
- (iv) un dominio C2, que generalmente funciona como dominio de unión a fosfolípidos dependiente de calcio. La mayoría de proteínas que contienen estos dominios funcionan en transducción de señales o tráfico asociado a membranas.

A través de los dominios de di- y heptaaminoácidos, *PQBP1* interacciona con el factor de transcripción Brn-2 (Waragay *et al.*, 1999), reprimiendo completamente su efecto transactivador. Además, *PQBP1* también interacciona con otras proteínas portadoras de repeticiones trinucleotídicas, como la huntingtina y el receptor de andrógenos, interaccionando directamente con los trectos de poliglutaminas. El dominio WW podría tener una cierta capacidad activadora de la transcripción, que queda autorreprimida por otras zonas de la propia proteína (Komuro *et al.*, 1999a). Estos autores proponen, además, que esta proteína podría unir RNA e identificar a la proteína Npw38BP por su interacción con el dominio WW (Komuro *et al.*, 1999b). A través de este dominio, *PQBP1* también interacciona con la región C-terminal de la RNA polimerasa II, y la interacción es mayor si un determinado residuo de la polimerasa es fosforilado (Okazawa *et al.*, 2002). Este hecho es relevante, ya que dicha región de la RNA polimerasa II funciona, en una forma dependiente de fosforilación, como plataforma para múltiples nucleoproteínas que regulan la transcripción y la modificación del RNA. El dominio C2 parece mediar la interacción de *PQBP1* con la proteína U5-15kD, que es un componente del complejo proteico U5 del spliceosoma (Waragai *et al.*, 2000). U5-15kD es, además, homóloga a la proteína dim1p de levadura, que fue aislada originalmente por ser esencial para la transición G2/M durante el ciclo celular (Berry y Gould, 1997). Basándose en todos estos datos, se ha propuesto que *PQBP1* sea una proteína adaptadora que conecte múltiples proteínas, haciendo de nexo entre dos procesos nucleares íntimamente relacionados: la transcripción y el procesamiento de los mensajeros (Okazawa *et al.*, 2001).

Dado este amplio abanico de interacciones, no resulta tan sorprendente la variabilidad fenotípica asociada a las mutaciones de *PQBP1*, que sería explicable mediante la presencia de variantes polimórficas en otras proteínas, ya se trate de las que interaccionan directamente con *PQBP1* o de otras proteínas implicadas en los mismos procesos, que pueden estar influyendo

en la mayor o menor gravedad de los síntomas. Por otro lado, diferencias interfamiliares, o incluso interindividuales, en la maquinaria encargada de la degradación de los transcritos con codones de parada prematuros pueden también estar afectando a la cantidad de proteína presente en las células, contribuyendo así a la variabilidad observada.

Lo que sí parece claro es que la mutación identificada en fELX91 y N40, c.461_462delAG, está asociada a fenotipos más graves. A pesar de que otros dos cambios (c.463_464dupAG y c.459_462delAGAG) alteran la pauta de lectura de la proteína en la misma posición, en ambos casos el nuevo fragmento añadido es idéntico, y de longitud mayor que el que se obtendría en los casos de fELX91 y N40. Se especula que los 11 nuevos aminoácidos incorporados en estas dos familias afecten en mayor grado las interacciones que PQBP1 establece con otras proteínas, resultando así en fenotipos más graves.

En cualquier caso, comparando las características clínicas de las diferentes familias, se observa que determinados signos aparecen prácticamente en todas ellas: RM (en todas), microcefalia y talla corta. Los rasgos dismórficos faciales también son similares en los diferentes pacientes, cuyos rostros muestran bastante parecido (Kleefstra *et al.*, 2004). Parece obvio que, a pesar de las diferentes denominaciones de los distintos síndromes, todos ellos forman un continuo, en el que las familias N40 y fELX91 representarían el extremo de mayor gravedad y MRX55 el más leve. Se ha propuesto, incluso, que se aplique una denominación común de Síndrome de Renpenning para todos ellos (Stevenson *et al.*, 2005), aunque esta propuesta no contempla todavía el fenotipo de la familia estudiada en este trabajo.

En este trabajo se ha identificado una mutación en el gen *PQBP1* en otra familia afectada por el síndrome de Lenz, lo que eleva ya a tres el número de genes implicados. Este síndrome engloba, por tanto, al menos tres desórdenes distintos, lo que sin duda tiene repercusión a nivel diagnóstico. Parece probable que estos genes estén implicados en algún proceso común del desarrollo, ya que la sintomatología es muy similar en los pacientes. En cualquier caso puede ser conveniente revisar los criterios de diagnóstico clínico para diferentes síndromes con fenotipos similares, intentando quizá incluir los datos que se van conociendo a nivel molecular.

V. Discusión general

En este trabajo se han analizado 9 familias distintas, con miembros afectados por diversas formas de retraso mental ligado al cromosoma X. Tres de ellas presentan formas sindrómicas: síndrome de Coffin-Lowry, síndrome de Prieto y síndrome de Lenz, mientras que el resto están afectadas de retraso mental inespecífico, a excepción de fELX20, en la que los pacientes tienen, además del retraso, una retinosis pigmentaria. La estrategia seguida en la búsqueda de los genes responsables ha sido la clonación posicional de genes candidatos, consistente en redefinir la región candidata y analizar aquellos genes que pudieran estar implicados de acuerdo con su función o expresión. Una estrategia como ésta tendrá mayor probabilidad de éxito cuanto más pueda acotarse la región de estudio, aunque no lo garantiza. Este es un factor limitante en el caso del RMLX porque el análisis de ligamiento se ha de realizar en familias aisladas. En total se han analizado 29 genes de los que, hasta la fecha, 5 han ido siendo descritos por otros grupos como responsables de retraso mental.

Los resultados concretos en cada región y/o familia analizada ya se han comentado en el resto de puntos de esta Discusión, pero hay varios aspectos generales que pueden destacarse en relación al conjunto del trabajo realizado. Uno de ellos, aplicable a la búsqueda de genes responsables de cualquier patología, es la necesidad de disponer del material adecuado. Un análisis a nivel genómico sólo permite descartar cambios en las regiones codificantes y en las zonas limítrofes de los intrones, y ya se ha visto que incluso así pueden pasar desapercibidos los efectos que algunos de estos cambios puedan tener en el procesamiento de los transcritos. Es necesario, por tanto, disponer de cDNA de los pacientes para, al menos, poder verificar la expresión de los genes y la integridad de los transcritos. No obstante, el RM inespecífico presenta un problema añadido: incluso disponiendo de muestras de sangre periférica para poder obtener RNA, ¿qué cambios cabe esperar encontrar en este tejido? ¿Hasta qué punto son representativos de lo que ocurre en el cerebro? Cuando un paciente

muestra, como único síntoma, retraso mental, parece lógico pensar que el problema está muy localizado, en el cerebro. Esto plantea dos alternativas: o bien la función que desempeña el producto que está alterado sólo es crítica en ese órgano (por la existencia de vías redundantes en otros tejidos o por el propio funcionamiento neural), o bien la alteración se está produciendo sólo en el cerebro, porque afecta a isoformas o transcritos expresados únicamente en él. En este segundo caso, un análisis basado en muestras obtenidas de sangre periférica no permitirá tampoco identificar la causa del retraso mental.

El análisis de mutaciones se ha centrado tradicionalmente en genes que codifican proteínas. Esto es lógico, ya que este tipo de genes es más fácil de identificar y los efectos de los cambios son mucho más predecibles. Sin embargo, cada vez parece más evidente que existe una gran variedad de RNAs que no codifican proteínas, pero que desempeñan funciones muy diversas en las células con un papel central a muchos niveles en la regulación celular. Tal vez sean más resistentes a los cambios, ya que de su secuencia no depende la secuencia de aminoácidos de una proteína, pero es indudable que ciertos cambios podrán afectar también a su función. De hecho, una expansión de un triplete CTG en un gen que codifica para un ncRNA es la responsable de la ataxia espinocerebelosa tipo 8 (*SCA8*). A este respecto cabe esperar la presencia de numerosos ncRNAs en el cromosoma X, dado que los genes contenidos en él tienen un tamaño tres veces superior a la media, lo que significa que una gran proporción del cromosoma se transcribe (Giannelli y Green, 2000). Suponiendo que los ncRNAs jueguen un papel importante en el desarrollo neuronal y en el funcionamiento cerebral, parece probable que una parte de los casos de retraso mental leve de etiología desconocida pueda deberse a una combinación de polimorfismos que afecten tanto a genes convencionales, como a ncRNAs implicados en procesos cognitivos. En este caso, el término polimorfismo designaría a un cambio en la secuencia, cuyo efecto sobre la función del producto (ya sea una proteína o un ncRNA) es relativamente pequeño, de forma que es la combinación de varios de ellos lo que provoca la manifestación del fenotipo. En este sentido, conviene recordar que numerosos estudios avalan la existencia y la importancia del componente hereditario de la inteligencia. En cualquier caso, el campo de los ncRNAs será de gran interés también en el análisis de enfermedades complejas y de la variación de rasgos cuantitativos.

Por último, cabe destacar la gran heterogeneidad, tanto genética como alélica, en el RMLX. Por una parte, atendiendo al solapamiento entre las regiones de ligamiento de las diferentes familias MRX, cabría esperar un mínimo de 14 *loci* responsables de retraso mental inespecífico. Sin embargo, y salvo excepciones como las de *ARX* y *JARID1C*, los genes que se han identificado hasta la fecha suelen dar cuenta únicamente de un 1%-2% de los casos de RMLX. Además, muchas familias en las que el intervalo de ligamiento contiene genes MRX conocidos, carecen sin embargo de mutaciones en los mismos. Esto hace pensar que el número de genes implicados en retraso mental es bastante superior al estimado en un principio. Por otra parte, mutaciones en un mismo gen pueden provocar desde fenotipos sindrómicos complejos hasta retraso mental inespecífico, como ocurre, por ejemplo, en el *locus PQBP1*. Una revisión *a posteriori* de las familias con mutaciones en el mismo gen puede poner de manifiesto que lo que se ha considerado, en un principio, como síndromes diferentes, forman en realidad parte de una misma entidad, que se manifiesta con diferentes niveles de gravedad.

En definitiva, los resultados obtenidos en este trabajo corroboran la heterogeneidad existente en el RMLX y la dificultad en la identificación de los genes implicados, algo no tan sorprendente si se considera la complejidad de los procesos que regulan. Por otra parte, teniendo en cuenta la importancia de los mismos para la conciencia y capacidades humanas, se desprende que el reto merece la pena.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El análisis de mutaciones llevado a cabo en 13 genes de la región Xp22 para las familias fELX2 (MRX73), fELX17, fELX18, MRX59 y K8944, afectadas de retraso mental inespecífico, no ha permitido identificar un nuevo gen MRX, al menos, en lo que respecta a la presencia de mutaciones en las regiones codificantes de dichos genes.

2. Se ha confirmado la existencia del transcrito correspondiente al gen *FLJ14503* en cerebro fetal. La proteína codificada colocaliza con los microtúbulos, como cabía esperar por la predicción de un dominio E-MAP-115 en su secuencia. Según los resultados obtenidos, se propone que *FLJ14503* formaría parte de una familia de proteínas estabilizadoras de microtúbulos definida por MAP7.

3. El cambio c.1734G>T en el gen *FLJ14503*, que segrega con el retraso mental en la familia fELX20, no altera la localización de esta proteína ni su efecto sobre los microtúbulos. Podría tratarse de un polimorfismo raro o de una mutación patológica, en el caso de que altere el procesamiento del mensajero.

4. Se propone la existencia de un nuevo *locus* MRX en Xq24-q25, al excluirse los genes *AGTR2* y *GRIA3* en la familia fELX101, la cual ha sido designada con el código MRX82.

5. Se ha confirmado el diagnóstico de síndrome de Coffin-Lowry a nivel molecular en un paciente. La inserción *de novo* de un elemento LINE-1 defectivo en el intrón 3 del gen *RPS6KA3* provoca la eliminación del exón 4 en el procesado del mensajero, desplazando la pauta de lectura y creando un codón de parada prematuro.

6. Se han descartado los 13 genes analizados en la región candidata del síndrome de Prieto, con respecto a la presencia de mutaciones en las regiones codificantes o de mutaciones que alteren el procesado. Los resultados obtenidos en el análisis cuantitativo de la expresión de 6 de estos genes corroboran su exclusión.

7. Se ha confirmado la existencia de un transcrito de 200 pb, correspondiente al gen designado *LAVA* en la base de datos Aceview, que contrasta con la hipotética pauta abierta de lectura de 908 pb. Se propone que este gen podría incluirse dentro del grupo creciente de ncRNAs.

8. Se ha identificado la mutación responsable de un caso familiar de síndrome de Lenz. Se trata del cambio c.461_462delAG en el gen *PQBP1*, que provoca un desplazamiento de la pauta de lectura y la aparición de un codón de parada prematuro. Este hallazgo confirma y amplía la variabilidad fenotípica recientemente descrita para las mutaciones en este gen.

9. El síndrome de Lenz puede estar causado por mutación del gen *PQBP1*, lo que incrementa la heterogeneidad genética de este síndrome a un mínimo de tres genes distintos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Allen KM, Gleeson JG, Bagrodia S, Partington MW, MacMillan JC, Cerione RA, Mulley JC and Walsh CA (1998) *PAK3* mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Nat Genet* **20**: 25-30.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-10.
- American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4^a* edición (Washington DC, 1994)
- Bagrodia A and Cerione RA (1999) PAK to the future. *Trends Cell Biol* **9**: 350-55.
- Bahi N, Friocourt G, Carrié A, Graham ME, Weiss JL, Chafey P, Fauchereau F, Burgoyne RD and Chelly J (2003) IL1 receptor accessory protein like, a protein involved in X-linked mental retardation, interacts with Neuronal Calcium Sensor-1 and regulates exocytosis. *Hum Mol Genet* **12**: 1415-25.
- Bark C, Hammarström K, Westin G and Pettersson U (1985) Nonrandom integration of human U4 RNA pseudogenes. *Mol Cell Biol* **5**: 943-48.
- Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, Sparkes RL, Koop B, Birch DG, Bergen AAB, Prinsen CFM, Polomeno RC, Gal A, Drack AV, Musarella MA, Jacobson SG, Young RSL and Weleber RG (2000) Mutations in *NYX*, encoding the leucine-rich proteoglycan nyctalopin, cause X-linked complete congenital stationary night blindness. *Nat Genet* **26**: 319-23.
- Benne R, Brown-Luedi ML and Hershey JWB (1977) Purification and characterization of protein synthesis initiation factors eIF-1, eIF-4C, eIF-4D, and eIF-5 from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* **253**: 3070-77.
- Berg IET, van Beurden EACM, Malingré HEM, van Amstel HKP, Poll-The BT, Smeitink JAM, Lamers WH and Berger R (1995) X-linked liver phosphorylase kinase deficiency is associated with mutations in the human liver phosphorylase kinase α -subunit. *Am J Hum Genet* **56**: 381-87.
- Berry LD and Gould KL (1997) Fission yeast *dim1⁺* encodes a functionally conserved polypeptide essential for mitosis. *J Cell Biol* **137**: 1337-54.
- Bérubé NG, Mangelsdorf M, Jagla M, Vanderluit J, Garrick D, Gibbons RJ, Higgs DR, Slack RS and Picketts DJ (2005) The chromatin-remodeling protein ATRX is critical for neuronal survival during corticogenesis. *J Clin Invest* **115**: 258-67.
- Bienvenu T, Poirier K, Friocourt G, Bahi N, Beaumont D, Fauchereau F, Ben Jeema L, Zemni R, Vinet MC, Francis F, Couvert P, Gomot M, Moraine C, van Bokhoven H, Kalscheuer V, Frints S, Gécz J, Ohzaki K, Chaabouni H, Fryns JP, Desportes V, Beldjord C and Chelly J (2002) ARX, a novel Prd-class-homeobox gene highly expressed in the telencephalon, is mutated in X-linked mental retardation. *Hum Mol Genet* **11**: 981-91.
- Billuart P, Bienvenu T, Ronce N, des Portes V, Vinet MC, Zemni R, Crollius HR, Carrié A, Fauchereau F, Cherry M, Briault S, Hamel B, Fryns JP, Beldjord C, Kahn A, Moraine C and Chelly J (1998) Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature* **392**: 923-26.
- Brouha B, Schustak J, Badge RM, Lutz-Prigge S, Farley AH, Moran JV and Kazazian HH Jr (2003) Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 5280-85.

- Burdon KP, McKay JD, Sale MM, Russell-Eggitt IM, Mackey DA, Wirth MG, Elder JE, Nicoll A, Clarke MP, Fitzgerald LM, Stankovich JM, Shaw MA, Sharma S, Gajovic S, Gruss P, Ross S, Thomas P, Voss AK, Thomas T, Gécz J and Craig JE (2003) Mutations in a novel gene, *NHS*, cause the pleiotropic effects of a nance-horan syndrome, including severe congenital cataract, dental anomalies, and mental retardation. *Am J Hum Genet* **73**: 1120-30.
- Butz S, Okamoto M and Südhof TC (1998) A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain. *Cell* **94**: 773-82.
- Cadavid ALM, Ginzl A and Fischer JA (2000) The function of the *Drosophila* Fat facets deubiquitinating enzyme in limiting photoreceptor cell number is intimately associated with endocytosis. *Development* **127**: 1727-36.
- Carrié A, Jun L, Bienvenu T, Vinet MC, McDonell N, Couvert P, Zemni R, Cardona A, Van Buggenhout G, Frints S, Hamel B, Moraine C, Ropers HH, Strom T, Howell GR, Whittaker A, Ross MT, Kahn A, Fryns JP, Beldjord C, Marynen and Chelly J (1999) A new member of the IL-1 receptor family highly expressed in hippocampus and involved in X-linked mental retardation. *Nat Genet* **23**: 25-31.
- Cartegni L, Chew SL and Krainer AR (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* **3**: 285-98.
- Chaudhuri J, Kausik S and Maitra U (1997) Function of eukaryotic translation initiation factor 1A (eIF1A) (formerly called eIF-4C) in initiation of protein synthesis. *J Biol Chem* **272**: 7883-91.
- Chelly J and Mandel JL (2001) Monogenic causes of X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet* **2**: 669-80.
- Chen WG, Chang O, Lin Y, Meissner A, West AE, Griffith EC, Jaenisch R and Greenberg ME (2003) Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* **302**: 885-89.
- Chen X, Zhang B and Fischer JA (2002) A specific protein substrate for a deubiquitinating enzyme: Liquid facets is the substrate of Fat facets. *Genes Dev* **16**: 289-94.
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins D and Thompson JD (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acid Res* **31**: 3497-34500.
- Chung O, Stoll M and Unger T (1996) Physiologic and pharmacologic implications of AT1 versus AT2 receptors. *Blood Press Suppl* **2**: 47-52.
- Cohen AR, Wood DF, Marfatia SM, Walther Z, Chishti AH and Anderson JM (1998) Human CASK/LIN-2 binds Syndecan-2 and protein 4.1 and localizes to the basolateral membrane of epithelial cells. *J Cell Biol* **142**: 129-38.
- Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, Cunniff C, Graham JM Jr, Jones MC, Kaback MM, Moeschler J, Schaefer GB, Schwartz S, Tarleton J and Opitz J (1997) Evaluation of mental retardation: recommendations of a consensus conference: American College of Medical Genetics. *Am J Med Genet* **72**: 468-77.
- D'Adamo P, Menegon A, Lo Nigro C, Grasso M, Gulisano M, Tamanini F, Bienvenu T, Gedeon AK, Oostra B, Wu SK, Tandon A, Valtorta F, Balch WE, Chelly J and Toniolo D. (1998) Mutations in *GDI1* are responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nat Genet* **19**: 134-39.

- Dahl HH, Hunt SM, Hutchison WM and Brown GK (1987) The human pyruvate dehydrogenase complex. Isolation of cDNA clones for the E1 alpha subunit, sequence analysis, and characterization of the mRNA. *J Biol Chem* **262**: 7398-7403.
- de Meirleir L, MacKay N, Lam Hon Wah AM and Robinson BH (1988) Isolation of a full-length complementary DNA coding for human E1-alpha subunit of the pyruvate dehydrogenase complex. *J Biol Chem* **263**: 1991-95.
- Demirci FYK, White NJ, Rigatti BW, Lewis KF and Gorin MB (2001) Identification, genomic structure, and screening of the vacuolar proton-ATPase membrane sector-associated protein M8-9 gene within the COD1 critical region (Xp11.4). *Mol Vision* **7**: 234-39.
- Dent EW and Gertler FB (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* **40**: 209-27.
- Dever TE, Wei C-L, Benkowski LA, Browning K, Merrick WC and Hershey JWB (1994) Determination of the amino acid sequence of rabbit, human, and wheat germ protein synthesis factor eIF-4C by cloning and chemical sequencing. *J Biol Chem* **269**: 3212-18.
- Divoky V, Indrak K, Mrug M, Brabec V, Huisman THJ and Prchal JT (1996) A novel mechanism of beta thalassemia: the insertion of L1 retrotransposable element into bet globin IVS II. *Blood* **88**: 148a (Abstr.580).
- Dougherty MK and Morrison DK (2004) Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci* **117**: 1875-84.
- Endo H, Hasegawa K, Narisawa K, Tada K, Kagawa Y and Ohta S (1989) Defective gene in lactic acidosis: abnormal pyruvate dehydrogenase E1-alpha subunit caused by a frame shift. *Am J Hum Genet* **44**: 358-64.
- Fabre-Jonca N, Allaman JM, Radlgruber G, Meda P, Kiss JZ, French LE and Masson D (1998) The distribution of murine 115-kDa epithelial microtubule-associated protein (E-MAP-115) during embryogenesis and in adult organs suggests a role in epithelial polarization and differentiation. *Differentiation* **63**: 169-80.
- Fabre-Jonca N, Viard I, French LE and Masson D (1999) Upregulation and redistribution of E-MAP-115 (Epithelial Microtubule-Associated Protein of 115 kDa) in terminally differentiating keratinocytes is coincident with the formation of intercellular contacts. *J Invest Dermatol* **112**: 216-25.
- Faergeman NJ and Knudsen J (1997) Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem J* **323**: 1-12.
- Fairbrother WG, Yeh RF, Sharp PA and Burge CB (2002) Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* **297**: 1007-13.
- Faire K, Waterman-Storer CM, Gruber D, Masson D, Salmon ED and Bulinski JC (1999) E-MAP-115 (ensconsin) associates dynamically with microtubules *in vivo* and is not a physiological modulator of microtubule dynamics. *J Cell Sci* **112**: 4243-55.
- Fallon L, Moreau F, Croft BG, Labib N, Gu WJ and Fon EA (2002) Parkin and CASK/LIN-2 associate via a PDZ-mediated interaction and are co-localized in lipid rafts and postsynaptic densities in brain. *J Biol Chem* **277**: 486-91.
- Feder M, Pas J, Wyrwicz LS and Bujnicki JM (2003) Molecular phylogenetics of the RrmJ/fibrillarin superfamily of ribose 2'-O-methyltransferases. *Gene* **302**: 129-38.
- Fiala JC, Spacek J and Harris KM (2002) Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Rev* **39**: 29-54.

- Fichera M, Borgione E, Avola E, Amata S, Sturnio M, Romano C and Ragusa A (2002) A new MRXS locus maps to the X chromosome pericentromeric region: a new syndrome or narrow definition of Sutherland-Haan genetic locus? *J Med Genet* **39**: 276-80.
- Fichera M, Falco M, Lo Giudice M, Castiglia L, Guarnaccia V, Cali F, Spalletta A, Scuderi C and Avola E (2005) Skewed X-inactivation in a family with mental retardation and PQBP1 gene mutation. *Clin Genet* **67**: 446-47.
- Fischer M, Kaech S, Knutti D and Matus A (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* **20**: 847-54.
- Fischer-Vize JA, Rubin GM and Lehmann R (1992) The *fat facets* gene is required for *Drosophila* eye and embryo development. *Development* **116**: 985-1000.
- Fondell JD, Ge H and Roeder RG (1996) Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 8329-33.
- Forrester S, Kovach MJ, Reynolds NM, Urban R and Kimonis V (2001) Manifestations in four males with and an obligate carrier of the Lenz microphthalmia syndrome. *Am J Med Genet* **98**: 92-100.
- Freude K, Hoffmann K, Jensen LR, Delatycki MB, des Portes V, Moser B, Hamel B, van Bokhoven H, Moraine C, Fryns JP, Chelly J, Géczy J, Lenzner S, Kalscheuer VM and Ropers HH (2004) Mutations in the *FTSJ1* gene coding for a novel S-adenosylmethionine-binding protein cause nonsyndromic X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* **75**: 305-09.
- Frints SGM, Froyen G, Marynen P and Fryns JP (2002) X-linked mental retardation: vanishing boundaries between non-syndromic (MRX) and syndromic (MRXS) forms. *Clin Genet* **62**: 423-32.
- Friocourt G, Kappeler C, Saillour Y, Fauchereau F, Rodriguez MS, Bahi N, Vinet MC, Chafey P, Poirier K, Taya S, Wood SA, Dargemont C, Francis F and Chelly J (2005) Doublecortin interacts with the ubiquitin protease DFFRX, which associates with microtubules in neural processes. *Mol Cell Neurosci* **28**: 153-64.
- Frödin M and Gammeltoft S (1999) Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol* **151**: 65-77.
- Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP and Kouzarides T (2003) The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* **278**: 4035-40.
- Gallinat S, Busche S, Raizada MK and Summers C (2000) The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**: E357-74.
- Galliot B and Miller D (2000) Origin of anterior patterning. How old is our head? *Trends Genet* **16**: 1-5.
- Ge J and Barnes NM (1996) Alterations in angiotensin AT1 and AT2 receptor subtype levels in brain regions from patients with neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol* **297**: 299-306.
- Géczy J, Barnett S, Liu J, Hollway G, Donnelly A, Eyre H, Eshkevaru HS, Baltazar R, Grunn A, Nagaraja R, Gilliam C, Peltonen L, Sutherland GL, Baron M and Mulley C (1999) Characterization of the human glutamate receptor subunit 3 gene (*GRIA3*), a candidate for bipolar affective disorder and nonspecific X-linked mental retardation. *Genomics* **62**: 356-68.

- Gécz J, Bielby S, Sutherland GR and Mulley JC (1997b) Gene structure and subcellular localization of FMR2, a member of a new family of putative transcription activators. *Genomics* **44**: 201-13.
- Gécz J, Gedeon AK, Sutherland GR and Mulley JC (1996) Identification of the gene *FMR2*, associated with FRAXE mental retardation. *Nat Genet* **13**: 105-08.
- Gécz J, Oostra BA, Hockey A, Carbonell P, Turner G, Haan EA, Sutherland GR and Mulley JC (1997a) FMR2 expression in families with FRAXE mental retardation. *Hum Mol Genet* **6**:435-41.
- Gedeon AK, Nelson J, Gécz J and Mulley JC (2003) X-linked mild non-syndromic mental retardation with neuropsychiatric problems and the missense mutation A365E in PAK3. *Am J Med Genet* **120A**: 509-17.
- Geppert M, Bolshakov VY, Siegelbaum SA, Takei K, De Camilli P, Hammer RE and Südhof TC (1994) The role of Rab3A in neurotransmitter release. *Nature* **369**: 493-97.
- Giannelli F and Green PM (2000) The X-chromosome and the rate of deleterious mutations in humans. *Am J Hum Genet* **67**: 515-17.
- Goldberg JL (2003) How does and axon grow? *Genes Dev* **17**: 941-58.
- Govek EE, Newey SE, Akerman CJ, Cross JR, Van der Veken L and Van Aelst L (2004) The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat Neurosci* **4**: 364-72.
- Graham CA, Redmond RM and Nevin NC (1991) X-linked clinical anophthalmos. Localization of the gene to Xq27-Xq28. *Ophthalmic Paediatr Genet* **12**: 43-48.
- Graves JAM, Gécz J and Hameister H (2002) Evolution of the human X - a smart and sexy chromosome that controls speciation and development. *Cytogenet Genome Res* **99**: 141-45.
- Gray TA, Hernandez L, Carey AH, Schaldach MA, Smithwick MJ, Rus K, Marshall Graves JA, Stewart CL and Nicholls RD (2000) The ancient source of a distinct gene family encoding proteins featuring RING and C₃H zinc-finger motifs with abundant expression in developing brain and nervous system. *Genomics* **66**: 76-86.
- Grayson C, Reid SNM, Ellis JA, Rutherford A, Sowden J, Yates JRW, Farber DB and Trump D (2000) Retinoschisin, the X-linked retinoschisis protein, is a secreted photoreceptor protein, and is expressed and released by Weri-Rb1 cells. *Hum Mol Genet* **9**: 1873-79.
- Grootjans JJ, Zimmermann P, Reekmans G, Smets A, Degeest D, Dürr J and David G (1997) Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 13683-88.
- Gu W, Malik S, Ito M, Yuan CX, Fondell JD, Zhang X, Martinez E, Qin J and Roeder RG (1999) A novel human SRB/MED-containing cofactor complex, SMCC, involved in transcription regulation. *Mol Cell* **3**: 97-108.
- Gu Y, Shen Y, Gibbs RA and Nelson DL (1996) Identification of FMR2, a novel gene associated with the FRAXE CCG repeat and CpG island. *Nat Genet* **13**: 109-13.
- Guan LS, Rauchman M and Wang ZY (1998) Induction of Rb-associated protein (RbAp46) by Wilm's tumor suppressor WT1 mediates growth inhibition. *J Biol Chem* **273**: 27047-50.
- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**: 509-14.

- Hata Y, Butz S and Südhof TC (1996) CASK: a novel dlg/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neuroligins. *J Neurosci* **16**: 2488-94.
- He L and Hannon GJ (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* **5**: 522-31.
- Hedges LV and Nowell A (1995) Sex differences in mental tests scores, variability, and numbers of high-scoring individuals. *Science* **269**: 41-45.
- Hendrickx J, Coucke P, Dams E, Lee P, Odievre M, Corbeel L, Fernandes JF and Willems PJ (1995) Mutations in the phosphorylase kinase gene PHKA2 are responsible for X-linked liver glycogen storage disease. *Hum Mol Genet* **4**: 77-83.
- Hendrickx J, Dams E, Coucke P, Lee P, Fernandes J, and Willems PJ (1996) X-linked liver glycogenosis type II (XLG II) is caused by mutations in *PHKA2*, the gene encoding the liver alpha subunit of phosphorylase kinase. *Hum Mol Genet* **5**: 649-52.
- Hittelman AB, Burakov D, Iñiguez-Lluhí JA, Freedman LP and Garabedian MJ (1999) Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *EMBO J* **18**: 5380-88.
- Hoogenraad CC, Akhmanova A, Grosveld F, de Zeeuw CI and Galjart N (2000) Functional analysis of CLIP-115 and its binding to microtubules. *J Cell Sci* **113**: 2285-97.
- Horesh D, Sapir T, Francis F, Wolf SG, Caspi M, Elbaum M, Chelly J and Reiner O (1999) Duoblecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum Mol Genet* **8**: 1599-1610.
- Hsueh YP and Sheng M (1999) Regulated expression and subcellular localization of syndecan heparan sulfate proteoglycans and the syndecan-binding protein CASK/LIN-2 during rat brain development. *J Neurosci* **19**: 7415-25.
- Hsueh YP, Wang TF, Yang FC and Sheng M (2000) Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2. *Nature* **404**: 298-302.
- Hsueh YP, Yang FC, Kharazia V, Naisbitt S, Cohen AR, Weinberg RJ and Sheng M (1998) Direct interaction of CASK/LIN-2 and syndecan heparan sulfate proteoglycan and their overlapping distribution in neuronal synapses. *J Cell Biol* **142**: 139-51.
- Huang Y, Baker RT and Fischer-Vize JA (1995) Control of cell fate by a deubiquitinating enzyme encoded by the *fat facets* gene. *Science* **270**: 1828-31.
- Huopaniemi L, Tynjismaa H, Rantala A, Rosenberg T and Alitalo T (2000) Characterization of two unusual *RS1* gene deletions segregating in Danish retinoschisis families. *Hum Mutat* **16**: 307-14.
- Huynh KD, Fischle W, Verdin E and Bardwell VJ (2000) BCoR, a novel corepressor involved in BCL-6 repression. *Genes Dev* **14**: 1810-23.
- Ikeda M, Ishida O, Hinoi T, Kishida S and Kikuchi A (1998) Identification and characterization of a novel protein interacting with Ral-binding protein 1, a putative effector protein of Ral. *J Biol Chem* **273**: 814-21.
- Item CB, Stockler-Ipsiroglu S, Stromberger C, Muhl A, Alessandri MG, Bianchi MC, Tosetti M, Fornai F and Cioni G (2001) Arginine:glycine amidinotransferase deficiency: the third inborn error of creatine metabolism in humans. *Am J Hum Genet* **69**: 1127-33.

- Jacquot S, Merienne K, de Cesare D, Pannetier S, Mandel JL, Sassone-Corsi P and Hanauer A (1998) Mutation analysis of the RSK2 gene in Coffin-Lowry patients: extensive allelic heterogeneity and a high rate of *de novo* mutations. *Am J Hum Genet* **63**: 1631-40.
- Jensen LR, Amende M, Gurok U, Moser B, Gimmel V, Tzschach A, Janecke AR, Tariverdian G, Chelly J, Fryns JP, Van Esch H, Kleefstra T, Hamel B, Moraine C, Gécz J, Turner G, Reinhardt R, Kalscheuer VM, Ropers HH and Lenzner S (2005) Mutations in the *JARID1C* gene, which is involved in transcriptional regulation and chromatin remodeling, cause X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* **76**: 227-36.
- Jin P, Alisch RS and Warren ST (2004) RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat Cell Biol* **6**: 1048-53.
- Jones PL, Veenstra GJC, Wade PA, Vermaark D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J and Wolffe AP (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genet* **19**: 187-91.
- Jonk LJC, de Jonge MEJ, Vervaart JMA, Wissink S and Kruijer W (1994) Isolation and development expression of retinoic acid-induced genes. *Dev Biol* **161**: 604-14.
- Kalscheuer VM, Freude C, Musante L, Jensen LR, Yntema HG, Gécz J, Sefiani A, Hoffmann K, Moser B, Haas S, Gurok U, Haesler S, Aranda B, Nshedjan A, Tzschach A, Hartmann N, Roloff TC, Shoichet S, Hagens O, Tao J, van Bokhoven H, Turner G, Chelly J, Moraine C, Fryns JP, Nuber U, Hoeltzenbein M, Scharff C, Scherthan H, Lenzner S, Hamel BCJ, Schweiger S and Ropers HH (2003) Mutations in the polyglutamine binding protein 1 gene cause X-linked mental retardation. *Nat Genet* **35**: 313-15.
- Kalscheuer VM, Tao J, Donnelly A, Hollway G, Schwinger E, Kübart S, Menzel C, Hoeltzbein M, Tommerup N, Eyre H, Harbord M, Haan E, Sutherland GR, Ropers H-H and Gécz J (2003) Disruption of the serine/threonine kinase 9 gene causes severe X-linked infantile spasm and mental retardation. *Am J Hum Genet* **72**: 1401-11.
- Kanai Y, Dohmae N and Hirokawa N (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**: 513-25.
- Kandel ER, Schwartz JH and Jessell TM (1995) Essentials of neural science and behavior. Norwalk, Connecticut: Appleton & Lange.
- Kapranov P, Cawley SE, Drenkow J, Bekinarov S, Strausberg RL, Fodor SP and Gingeras TR (2002) Large-scale transcriptional activity in chromosomes 21 and 22. *Science* **296**: 916-19.
- Kazazian HH Jr (1999) An estimated frequency of endogenous insertional mutations in humans. *Nat Genet* **22**: 130
- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM and Haussler D (2002) The human genome browser at UCSC. *Genome Res* **12**: 996-1006.
- Kim K, Hou P, Gorski JL and Cooper JA (2004) Effect of Fgd1 on cortactin in Arp2/3 complex-mediated actin assembly. *Biochemistry* **43**: 2422-27.
- Kleefstra T, Franken CE, Arens YHJM, Ramakers GJA, Yntema HG, Sistermans EA, Hulsman CFCH, Nillesen WN, van Bokhoven H, de Vries BBA and Hamel BCJ (2004) Genotype-phenotype studies in three families with mutations in the polyglutamine tract binding protein 1 gene (*PQBP1*). *Clin Genet* **66**: 318-26.

- Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P and Flint J (1999) Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* **354**: 1676-81.
- Koike K, Ohta S, Urata Y, Kagawa Y and Koike M (1988) Cloning and sequencing of cDNAs encoding alpha and beta subunits of human pyruvate dehydrogenase. *Proc Nat Acad Sci* **85**: 41-45.
- Komada M, McLean DJ, Griswold MD, Russell LD and Soriano P (2000) *E-MAP-115*, encoding a microtubule-associated protein, is a retinoic acid inducible gene required for spermatogenesis. *Genes Dev* **14**: 1332-42.
- Komuro A, Saeki M and Kato S (1999a) Npw38, a novel nuclear protein possessing a WW domain capable of activating basal transcription. *Nucleic Acids Res* **27**: 1957-65.
- Komuro A, Saeki M and Kato S (1999b) Association of two nuclear proteins, Npw38 and NpwBP, via the interaction between the WW domain and a novel proline-rich motif containing glycine and arginine. *J Biol Chem* **274**: 36513-19.
- Kortschak RD, Tucker PW and Saint R (2000) ARID proteins come in from the desert. *Trends Biochem Sci* **25**: 294-99.
- Kowanetz K, Husnjak K, Höller D, Kowanetz M, Soubeyran P, Hirsch D, Schmidt MHH, Pavelic K, De Camilli P, Randazzo PA and Dikic I (2004) CIN85 associates with multiple effectors controlling intracellular trafficking of epidermal growth factor receptors. *Mol Biol Cell* **15**: 3155-66.
- Kutsche K, Yntema H, Brandt A, Jantke I, Nothwang HG, Orth U, Boavida MG, David D, Chelly J, Fryns JP, Moraine C, Ropers HH, Hamel BCJ, van Bokhoven H and Gal A (2000) Mutations in *ARHGEF6*, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation. *Nat Genet* **26**: 247-50.
- Lahn BT and Page DC (1997) Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* **278**: 675-80.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian *et al.* (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921.
- Lau LF, Mammen A, Ehlers MD, Kindler S, Chung WJ, Garner CC and Haganir RL (1996) Interaction of the N-methyl-D-aspartate receptor complex with a novel synapse associated protein, SAP102. *J Biol Chem* **271**: 21622-28.
- Laumonier F, Bonnet-Brihault F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP, Raynaud M, Ronce N, Lemmonier E, Calvas P, Laudier B, Chelly J, Fryns JP, Ropers HH, Hamel BCJ, Andres C, Barthélémy C, Moraine C and Briault S (2004) X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the *NLGN4* gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum Genet* **74**: 552-57.
- Lee DK, Nguyen T, Lynch KR, Cheng R, Vanti WB, Arkhitko O, Lewis T, Evans JF, George SR and O'Dowd BF (2001) Discovery and mapping of ten novel G protein-coupled receptor genes. *Gene* **275**: 83-91.
- Lee S, Fan S, Makarova O, Straight S and Margolis B (2002) A novel and conserved protein-protein interaction domain of mammalian Lin2-CASK binds and recruits SAP97 to the lateral surface of epithelia. *Mol Cell Biol* **22**: 1778-91.

- Lee TI and Young RA (2000) Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* **34**: 77-137.
- Lenski C, Abidi F, Meindl A, Gibson A, Platzer M, Kooy RF, Lubs HA, Stevenson RE, Ramser J and Schwartz CE (2004) Novel truncating mutations in the *polyglutamine tract binding protein 1* gene (*PQBP1*) cause Renpenning syndrome and X-linked mental retardation in another family with microcephaly. *Am J Hum Genet* **74**: 777-80.
- Lenz W (1955) Recessiv-geschlechtsgebundene Mikrophtalmie mit multiplen Missbildungen. *Zeit Kinderheil* **77**: 384
- Leonard H and Wen X (2002) The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **8**(3): 117-34.
- Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppersen P, Klein F and Bird A (1992) Purification, sequence and cellular localisation of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* **69**: 905-14.
- Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ and Wirth B (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 6307-11.
- Luan DD, Korman MH, Jakubczak JL and Eickbush TH (1993) Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell* **72**: 595-605.
- Ludin B, Ashbridge K, Fünfschilling U and Matus A (1996) Functional analysis of the MAP2 repeat domain. *J Cell Sci* **109**: 91-99.
- Lundquist EA (2003) Rac proteins and the control of axon development. *Curr Opin Neurobiol* **13**: 384-90.
- Luo L (2002) Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 601-35.
- Marchese A, Sawdargo M, Nguyen T, Cheng R, Heng HHQ, Nowak T, Im DS, Lynch KR, George SR and O'Dowd BF (1999) Discovery of three novel orphan G-protein-coupled receptors. *Genomics* **56**: 12-21.
- Margolis RL, Abraham RM, Gatchell SB, Li SH, Kidwai AS, Breschel TS, Stine OC, Callahan C, McInnis MG and Ross CA (1997) cDNAs with long CAG trinucleotide repeats from human brain. *Hum Genet* **100**: 114-22.
- Martin RE and Bazan NG (1992) Changing fatty acid content of growth cone lipids prior to synaptogenesis. *J Neurochem* **59**: 318-25.
- Martinez F, Martinez-Garay I, Millán JM, Pérez-Aytes A, Moltó MD, Orellana C and Prieto F (2001) Localization of non-specific X-linked mental retardation gene (MRX73) to Xp22.2. *Am J Med Genet* **102**: 200-04.
- Martinez F, Martinez-Garay I, Oltra S, Molto MD, Orellana C, Monfort S, Prieto F and Tejada I (2004) Localization of MRX82: a new nonsyndromic X-linked mental retardation locus to Xq24-q25 in a Basque family. *Am J Med Genet* **131**: 174-78.
- Martinez-Garay I, Ballesta MJ, Oltra S, Orellana C, Palomeque A, Moltó MD, Prieto F and Martinez F (2003) Intronic L1 insertion and F268S, novel mutations in RPS6KA3 (RSK2) causing Coffin-Lowry Syndrome. *Clin Genet* **64**: 491-96.

- Masson D and Kreis TE (1993) Identification and molecular characterization of E-MAP-115, a novel microtubule-associated protein predominantly expressed in epithelial cells. *J Cell Biol* **123**: 357-71.
- Masson D and Kreis TE (1995) Binding of E-MAP-115 to microtubules is regulated by cell cycle-dependent phosphorylation. *J Cell Biol* **131**: 1015-24.
- Masuko N, Makino K, Kuwahara H, Fukunaga K, Sudo T, Araki N, Yamamoto H, Yamada Y, Miyamoto E and Saya H (1999) Interaction of NE-dlg/SAP102, a neuronal and endocrine tissue-specific membrane-associated guanylate kinase protein, with calmodulin and PSD-95/SAP90: a possible regulatory role in molecular clustering at synaptic sites. *J Biol Chem* **274**: 5782-90.
- Mattick JS (2001) Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO Reports* **2**: 986-91.
- Mattick JS (2003) Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *BioEssays* **25**: 930-39.
- Mattick JS (2004) RNA regulation: a new genetics? *Nat Rev Genet* **5**: 316-23.
- Mattick JS and Makunin IV (2005) Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet* **14**: R121-32.
- Matynia A, Kushner SA and Silva AJ (2002) Genetic approaches to molecular and cellular cognition: a focus on LTP and learning and memory. *Annu Rev Genet* **36**: 687-720.
- Maximov A, Südhof TC and Bezprozvanny I (1999) Association of neuronal calcium channels with modular adaptor proteins. *J Biol Chem* **274**: 24453-56.
- McFerran BW, Graham ME and Burgoyne RD (1998) Neuronal Ca²⁺ sensor 1, the mammalian homologue of frequenin, is expressed in chromaffin and PC12 cells and regulates neurosecretion from dense-core granules. *J Biol Chem* **273**: 22768-72.
- Meijlink F, Beverdam A, Brouwer A, Oosterveen TC and BergeDT (1999) Vertebrate aristaless-related genes. *Int J Dev Biol* **43**: 651-63.
- Meischl C, Boer M, Ahlin A and Roos D (2000) A new exon created by intronic insertion of a rearranged LINE-1 element as the cause of chronic granulomatous disease. *Eur J Hum Genet* **8**: 697-703.
- Meischl C, De Boer M and Roos D (1998) Chronic granulomatous disease caused by line-1 retrotransposons. *Eur J Haematol* **60**: 349-59.
- Meloni I, Muscettola M, Raynaud M, Longo I, Bruttini M, Moizard MP, Gomot M, Chelly J, des Portes V, Fryns JP, Ropers HH, Magi B, Bellan C, Volpi N, Yntema HG, Lewis SE, Schaffer JE and Renieri A (2002) *FACL4*, encoding fatty acid-CoA ligase 4, is mutated in non-specific X-linked mental retardation. *Nat Genet* **30**: 436-40.
- Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, Yoshii A, Sestan N, Rakic P, Constantine-Paton M and Horvitz HR (2004) Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biology* **5**: R68.1-R68.13.
- Missler M, Zhang W, Rohlmann A, Kattenstroth G, Hammer RE, Gottmann K and Südhof TC (2003) α -Neurexins couple Ca²⁺ channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature* **423**: 939-48.

- Montini E, Andolfi G, Caruso A, Buchner G, Walpole SM, Mariani M, Consalez G, Trump D, Ballabio A and Franco B (1998) Identification and characterization of a novel serine-threonine kinase gene from the Xp22 region. *Genomics* **51**: 427-33.
- Montini E, Buchner G, Spalluto C, Andolfi G, Caruso A, Den Dunnen JT, Trump D, Rocchi M, Ballabio A and Franco B (1999) Identification of SCML2, a second human gene homologous to the *Drosophila sex comb on midleg (scm)*: a new gene cluster on Xp22. *Genomics* **58**: 65-72.
- Montini E, Rugarli EI, Van de Vosse E, Andolfi G, Mariani M, Puca AA, Consalez GG, Den Dunnen JT, Ballabio A and Franco B (1997) A novel human serine-threonine phosphatase related to the *Drosophila retinal degeneration C (rdgC)* gene is selectively expressed in sensory neurons of neural crest origin. *Hum Mol Genet* **6**: 1137-45.
- Morey C and Avner P (2004) Employment opportunities for non-coding RNAs. *FEBS Letters* **567**: 27-34.
- Muller BM, Kistner U, Kindler S, Chung WJ, Kuhlendahl S, Fenster SD, Lau LF, Veh RW, Haganir RL, Gundelfinger ED and Garner CC (1996) SAP102, a novel postsynaptic protein that interacts with NMDA receptor complexes in vivo. *Neuron* **17**: 255-65.
- Mulley JC, Kerr B, Stevenson E and Lubs H (1992) Nomenclature guidelines for X-linked mental retardation. *Am J Med Genet* **43**: 383-91.
- Murray RZ, Jolly LA and Wood SA (2004) The FAM deubiquitylating enzyme localizes to multiple points of protein trafficking in epithelia, where it associates with E-cadherin and β -catenin. *Mol Biol Cell* **15**: 1591-99.
- Näär AM, Beurang PA, Robinson KM, Oliner JD, Avizonis D, Scheek S, Zwicker J, Kadonaga JT and Tjian R (1998) Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a in vitro. *Genes Dev* **12**: 3020-31.
- Näär AM, Beurang PA, Zhou S, Abraham S, Solomon W and Tjian R (1999) Composite co-activator ARC mediates chromatin-directed transcriptional activation. *Nature* **398**: 828-32.
- Nakai K and Horton P (1999) PSORT: a program for detecting the sorting signals of proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* **24**: 34-35.
- Nakai K and Kanehisa M (1992) A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* **14**: 897-911.
- Nan XS, NG HH, Johnson CA, Laherty CA, Turner BM, Eisenman RN and Bird A (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**: 386-89.
- Nemes JP, Benzow KA and Koob MD (2000) The SCA8 transcript is an antisense RNA to a brain-specific transcript encoding a novel actin-binding protein (KLHL1). *Hum Mol Genet* **9**: 1543-51.
- Ng D, Hadley DW, Tiffit CJ and Biesecker LG (2002) Genetic heterogeneity of syndromic X-linked recessive microphthalmia-anophthalmia: is Lenz microphthalmia a single disorder? *Am J Med Genet* **110**: 308-14.
- Ng D, Thakker N, Corcoran CM, Donnai D, Perveen R, Schneider A, Hadley DW, Tiffit C, Zhang L, Wilkie AO, van der Smagt JJ, Gorlin RJ, Burgess SM, Bardwell VJ, Black GC and Biesecker LG (2004) Oculofaciocardiodental and Lenz microphthalmia syndromes result from distinct classes of mutations in BCOR. *Nat Genet* **36**: 411-16.

- Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T and Traer JD (2002) Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* **109**: 1417-27.
- Noiges R, Eichinger R, Kutschera W, Fischer I, Németh Z, Wiche G and Propst F (2002) Microtubule-associated protein 1A (MAP1A) and MAP1B: light chains determine distinct functional properties. *J Neurosci* **22**: 2106-14.
- Novick P and Zerial M (1997) The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 496-504.
- Nuyt AM, Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P and Llorens-Cortes C (1999) Ontogeny of angiotensin II type 2 receptor mRNA expression in fetal and neonatal rat brain. *J Comp Neurol* **407**: 193-206.
- O'Hara PJ, Horowitz H, Eichinger G and Young ET (1988) The yeast ADR6 gene encodes homopolymeric amino acid sequences and a potential metal-binding domain. *Nucleic Acids Res* **16**: 10153-69.
- Okazawa H, Rich T, Chang A, Lin X, Waragai M, Kajikawa M, Enokido Y, Komuro A, Kato S, Shibata M, Hatanaka H, Mouradian MM, Sudol M and Kanazawa I (2002) Interaction between mutant ataxin-1 and PQBP-1 affects transcription and cell death. *Neuron* **34**: 701-13.
- Okazawa H, Sudol M and Rich T (2001) PQBP-1 (Np/PQ): a polyglutamine tract-binding and nuclear inclusion-forming protein. *Brain Res Bull* **56**: 273-80.
- Olson MF, Pasteris NG, Gorski JL and Hall A (1996) Faciogenital dysplasia protein (FGD1) and Vav, two related proteins required for normal embryonic development, are upstream regulators of Rho GTPases. *Curr Biol* **6**: 1628-33.
- Osterhoff C, Ivell R and Kirchhoff C (1997) Cloning of a human epididymis-specific mRNA, HE-6, encoding a novel member of the seven transmembrane-domain receptor superfamily. *Dev Cell Biol* **16**: 379-89.
- Ostertag EM and Kazazian HH Jr (2001a) Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet* **35**: 501-38.
- Ostertag EM and Kazazian HH Jr (2001b) Twin Priming: a proposed mechanism for the creation of inversions in L1 retrotransposition. *Genome Res* **11**: 2059-65.
- Owsianka AM and Patel AH (1999) Hepatitis C virus core protein interacts with a human DEAD box protein DDX3. *Virology* **257**: 330-40.
- Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL and Lu B (2004) Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* **306**: 487-91.
- Park SH, Lee SG, Kim Y and Song K (1998) The assignment of a human putative helicase gene, DDX3, to human X chromosome bands p11.3→p11.23. *Cytogenet Cell Genet* **81**: 178-79.
- Plenge RM, Stevenson RA, Lubs HA, Schwartz CE and Willard HF (2002) Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders. *Am J Hum Genet* **71**: 168-73.
- Pollard TD and Earnshaw WC (2004) Cell Biology. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders (Elsevier).

- Prieto F, Badía L, Mulas F, Monfort A and Mora F (1987) X-linked dysmorphic syndrome with mental retardation. *Clin Genet* **32**: 326-34.
- Pusch CM, Zeitz C, Brandau O, Pesch K, Achatz H, Feil S, Scharfe C, Maurer J, Jacobi FK, Pinckers A, Andreasson S, Hardcastle A, Wissinger B, Berger W and Meindl A (2000) The complete form of X-linked congenital stationary night blindness is caused by mutations in a gene encoding a leucine-rich repeat protein. *Nat Genet* **26**: 324-27.
- Qian YW and Lee EYHP (1995) Dual retinoblastoma-binding proteins with properties related to a negative regulator of Ras in yeast. *J Biol Chem* **270**: 25507-13.
- Rachez C, Lemon BD, Suldan Z, Bromleigh V, Gamble M, Näär AM, Erdjument-Bromage H, Tempst P and Freedman LP (1999) Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex. *Nature* **398**: 824-28.
- Rachez C, Suldan Z, Ward J, Chang CPB, Burakov D, Erdjument-Bromage H, Tempst P and Freedman LP (1998) A novel protein complex that interacts with the vitamin D₃ receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes Dev* **12**: 1787-1800.
- Ramakers GJA (2002) Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci* **25**: 191-99.
- Ramser J, Abidi FE, Burckle CA, Lenski C, Toriello H, Wen G, Lubs HA, Engert S, Stevenson RE, Meindl A, Schwartz CE and Nguyen G (2005) A unique exonic splice enhancer mutation in a family with X-linked mental retardation and epilepsy points to a novel role of the rennin receptor. *Hum Mol Genet* **14**: 1019-27.
- Rao A, Harms KJ and Craig AM (2000) Neuroligation: building synapses around the neurexin-neurologin link. *Nat Neurosci* **3**: 747-49.
- Rapoport SI, Chang MC and Spector AA (2001) Delivery and turn-over of plasma-derived essential PUFAs in mammalian brain. *J Lipid Res* **42**: 678-85.
- Ridley AJ and Hall A (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**: 389-99.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D and Hall A (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**: 401-10.
- Rohrbough J, Grotewiel MS, Davis RL and Broadie K (2000) Integrin-mediated regulation of synaptic morphology, transmission, and plasticity. *J Neurosci* **20**: 6868-78.
- Ropers HH and Hamel BCJ (2005) X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet* **6**: 46-57.
- Ropers HH, Hoeltzenbein M, Kalscheuer V, Yntema H, Hamel B, Fryns JP, Chelly J, Partington M, Géczy J and Moraine C (2003) Nonsyndromic X-linked mental retardation: where are the missing mutations? *Trends Genet* **19**: 316-20.
- Rosenberger G, Gal A and Kutsche K (2005) AlphaPIX associates with calpain 4, the small subunit of calpain, and has a dual role in integrin-mediated cell spreading. *J Biol Chem* **280**: 6879-89.
- Rosenberger G, Jantke I, Gal A and Kutsche K (2003) Interaction of α PIX (ARHGEF6) with β -parvin (PARVB) suggests an involvement of α PIX in integrin-mediated signaling. *Hum Mol Genet* **12**: 155-67.
- Rost B (1996) PDH: predicting one-dimensional protein structure by profile based neural networks. *Meth in Enzym* **266**: 525-39.

- Rost B and Sander C (1993) Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J Mol Biol* **232**: 584-99.
- Ryan RF, Schultz DC, Ayyanathan K, Singh PB, Friedman JR, Fredericks WJ and Rauscher FJ 3rd (1999) KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol* **19**: 4366-78.
- Ryu S, Zhou S, Ladurner AG and Tjian R (1999) The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1. *Nature* **397**: 446-50.
- Saavedra JM (1999) Emerging features of brain angiotensin receptors. *Regul Pept* **85**: 31-45.
- Salomons GS, van Dooren SJ, Verhoeven NM, Marsden D, Schwartz C, Cecil KM, DeGrauw TJ and Jakobs C (2003) X-linked creatine transporter defect: an overview. *J Inher Metab Dis* **26**: 309-18.
- Salomons GS, van Dooren SJM, Verhoeven NM, Cecil KM, Ball WS, Degrauw TJ and Jakobs C (2001) X-linked creatine transporter gene (*SLC6A8*) defect: a new creatine-deficiency syndrome. *Am J Hum Genet* **68**: 1497-1500.
- Sambrook J and Russell RW (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-67.
- Sans N, Petralia RS, Wang YX, Blahos J II, Hell JW and Wenthold RJ (2000) A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *J Neurosci* **20**: 1260-71.
- Sassone-Corsi P, Mizzen CA, Cheung P, Crosio C, Monaco L, Jacquot S, Hanauer A and Allis CD (1999) Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science* **285**: 886-91.
- Sauer CG, Gehrig A, Warneke-Wittstock R, Marquardt A, Ewing CC, Gibson A, Lorenz B, Jurklics B and Weber BHF (1997) Positional cloning of the gene associated with X-linked juvenile retinoschisis. *Nat Genet* **17**: 164-70.
- Scala E, Ariani F, Mari F, Caselli R, Pescucci C, Longo I, Meloni I, Giachino D, Bruttini M, Hayek G, Zappella M and Renieri A (2005) CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms. *J Med Genet* **42**: 103-07.
- Scheiffele P (2003) Cell-cell signaling during synapse formation in the CNS. *Annu Rev Neurosci* **26**: 485-508.
- Scherer SW, Cheung J, MacDonald JR, Osborne LR, Nakabayashi K, Herbrick JA, Carson AR, Parker-Katirae L, Skaug J, Khaja R, Zhang J, Hudek AK, Li M, Haddad M, Duggan GE, Fernandez BA, Kanematsu E, Gentles S, Christopoulos CC, Choufani S, Kwasnicka D, Zheng XH, Lai Z, Nusskern D, Zhang Q, Gu Z, Lu F, Zeeman S, Nowaczyk MJ, Teshima I, Chitayat D, Shuman C, Weksberg R *et al.* (2003) Human chromosome 7: DNA sequence and biology. *Science* **300**: 767-72.
- Schoenwaelder SM and Burridge K (1999) Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 274-86.
- Schöneberg T, Schulz A, Grosse R, Schade R, Henklein P, Schultz G and Gudermann T (1999) A novel subgroup of class I G-protein-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta* **1446**: 57-70.

- Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG and Rauscher FJ 3rd (2002) SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP-1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev* **16**: 919-32.
- Schwahn U, Lenzner S, Dong J, Feil S, Hinzmann B, van Duijnhoven G, Kirschner R, Hemberger M, Bergen AA, Rosenberg T, Pinckers AJ, Fundele R, Rosenthal A, Cremers FP, Ropers HH and Berger W (1998) Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2. *Nat Genet* **19**: 327-32.
- Shoichet SA, Hoffmann K, Menzel C, Trautmann U, Moser B, Hoeltzenbein M, Echenne B, Partington M, van Bokhoven H, Moraine C, Fryns JP, Chelly J, Rott HD, Ropers HH and Kalscheuer V (2003) Mutations in the *ZNF41* gene are associated with cognitive deficits: identification of a new candidate for X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* **73**:1341-54.
- Sigrist CJA, Cerutti L, Hulo N, Gattiker A, Falquet L, Pagni M, Bairoch A and Bucher P (2002) PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief Bioinform* **3**: 265-74.
- Skuse DH (2005) X-linked genes and mental functioning. *Hum Mol Genet* **14** Spec No 1: R27-32.
- Smit, AFA, Hubley, R & Green, P. *RepeatMasker Open-3.0* 1996-2004
- Srinivasan RS, de Erkenez AC and Hemenway CS (2003) The mixed lineage leukaemia fusion partner AF9 binds specific isoforms of the BCL-6 corepressor. *Oncogene* **22**: 3395-3406.
- Stancheva I, Collins AL, van der Veyver IB, Zoghbi H and Meehan, RR (2003) A mutant form of MeCP2 protein associated with human Rett syndrome cannot be displaced from methylated DNA by notch in *Xenopus* embryos. *Mol Cell* **12**: 425-35.
- Stevenson RE, Bennett CW, Abidi F, Kleefstra T, Porteous M, Simensen RJ, Lubs HA, Hamel BCJ and Schwartz CE (2005) Renpenning syndrome comes into focus. *Am J Med Genet* **134A**: 415-21.
- Stevenson RE, Schwartz CE and Schroer RJ (2000) X-linked mental retardation. New York, Oxford: Oxford University Press.
- Stipp CS and Hemler ME (2000) Transmembrane-4-superfamily proteins CD151 and CD81, associate with alpha 3 beta 1 integrin, and selectively contribute to alpha 3 beta 1-dependent neurite outgrowth. *J Cell Sci* **113**: 1871-82.
- Stöckler S, Hanefeld F and Frahm J (1996) Creatine replacement therapy in guanidinoacetate methyltransferase deficiency, a novel inborn error of metabolism. *Lancet* **348**: 789-90
- Storz G (2002) An expanding universe of noncoding RNAs. *Science* **296**: 1260-63.
- Strømme P, Mangelsdorf ME, Shaw MA, Lower KM, Lewis SME, Bruyere H, Lütcherath V, Gedeon AK, Wallace RH, Scheffer IE, Turner G, Partington M, Frints SGM, Fryns JP, Sutherland GR, Mulley JC and Géczy J (2002) Mutations in the human ortholog of *Aristaless* cause X-linked mental retardation and epilepsy. *Nat Genet* **30**: 441-45.
- Sun X, Zhang Y, Cho H, Rickert P, Lees E, Lane W and Reinberg D (1998) NAT, a human complex containing Srb polypeptides that functions as a negative regulator of activated transcription. *Mol Cell* **2**: 213-22.

- Szymansky M and Barciszewski J (2002) Beyond the proteome: non-coding regulatory RNAs. *Genome Biology* **3**: 0005.1-0005.8.
- Szymansky M, Barciszewska MZ, Zywicki M and Barciszewski J (2002) Noncoding RNA transcripts. *J Appl Genet* **44**: 1-19.
- Tabuchi K, Biederer T, Butz S and Südhof TC (2002) CASK participates in alternative tripartite complexes in which Mint 1 competes for binding with Caskin 1, a novel CASK-binding protein. *J Neurosci* **22**: 4264-73.
- Takai Y, Shimizu K and Ohtsuka T (2003) The roles of cadherins and nectins in interneuronal synapse formation. *Curr Opin Neurobiol* **13**: 520-26.
- Take H, Watanabe S, Takeda K, Yu Z-X, Iwata N and Kajigaya S (1999) Cloning and characterization of a novel adaptor protein, CIN85, that interacts with c-Cbl. *Biochem Biophys Res Commun* **268**: 321-28.
- Tang AH, Neufeld TP, Rubin GM and Müller H-AJ (2001) Transcriptional regulation of cytoskeletal functions and segmentation by a novel maternal pair-rule gene, Lilliputian. *Development* **128**: 801-13.
- Tarpey P, Parnau J, Blow M, Woffendin H, Bignell G, Cox C, Cox J, Davies H, Edkins S, Holden S, Kornly A, Mallya U, Moon J, O'Meara S, Parker A, Stephens P, Stevens C, Teague J, Donnelly A, Mangelsdorf M, Mulley J, Partington M, Turner G, Stevenson R, Schwartz C, Young I, Easton D, Bobrow M, Futreal PA, Stratton MR, Géczi J, Wooster R and Raymond FL (2004) Mutations in the *DLG3* gene cause nonsyndromic X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* **75**: 318-24.
- Taya S, Yamamoto T, Kanai-Azuma M, Wood SA and Kaibuchi K (1999) The deubiquitinating enzyme Fam interacts with and stabilizes β -catenin. *Genes to Cells* **4**: 757-67.
- Taya S, Yamamoto T, Kano K, Kawano Y, Iwamatsu A, Tsuchiya T, Tanaka K, Kanai-Azuma M, Wood SA, Mattick JS and Kaibuchi K (1998) The ras target AF-6 is a substrate of the Fam deubiquitinating enzyme. *J Cell Biol* **142**: 1053-62.
- The DIG System User's guide for filter hybridization* (1993) Boehringer Mannheim GMBH, Biochemica
- Tiedge H, Chen W and Brosius J (1993) Primary structure, neural-specific expression, and dendritic location of human BC200 RNA. *J Neurosci* **13**: 2382-90.
- Toutain A, Ayrault AD and Moraine C (1997) Mental retardation in Nance-Horan syndrome: clinical and neuropsychological assessment in four families. *Am J Med Genet* **71**: 301-14.
- Ullrich O, Stenmark H, Alexandrov K, Huber LA, Kaibuchi K, Sasaki T, Takai Y and Zerial M (1993) Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of rab proteins. *J Biol Chem* **268**: 18143-50.
- Van Aelst L and D'Souza-Schorey C (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* **11**: 2295-2322.
- Van de Vosse E, Walpole SM, Nicolaou A, Van der Bent P, Cahn A, Vaudin M, Ross MT, Durham J, Pavitt R, Wilkinson J, Grafham D, Bergen AAB, Van Ommen G-JB, Yates JRW, Den Dunnen JT and Trumpp D (1998) Characterization of *SCML1*, a new gene Xp22, with homology to developmental polycomb genes. *Genomics* **49**: 96-102.

- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang O, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M *et al.* (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304-51.
- Vervoort VS, Beachem MA, Edwards PS, Ladd S, Miller KE, de Mollerat X, Clarkson K, DuPont B, Schwartz CE, Stevenson RE, Boyd E and Srivastava (2002) *AGTR2* mutations in X-linked mental retardation. *Science* **296**: 2401-03.
- Villard L and Fontes M (2002) α -Thalassemia/mental retardation syndrome, X-linked (ATR-X, MIM#301040, ATR-X/XNP/XH2 gene MIM#300032). *Eur J Hum Genet* **10**: 223-25.
- Wallimann T and Hemmer W (1994) Creatine kinase in non-muscular tissues and cells. *Mol Cell Biochem* **133-134**: 193-220.
- Walpole IR, Hockey A and Nicoll A (1990) The Nance-Horan syndrome. *J Med Genet* **27**: 632-34.
- Walpole SM, Hiriyana KT, Nicolaou A, Bingham EL, Durham J, Vaudin M, Ross MT, Yates JRW, Sieving PA and Trump D (1999) Identification and characterization of the human homologue (*RAI2*) of a mouse retinoic acid-induced gene in Xp22. *Genomics* **55**: 275-283.
- Wang GS, Hong CJ, Yen TY, Huang HS, Ou Y, Huang TN, Jung WG, Kuo TY, Sheng M, Wang TF and Hsueh YP (2004) Transcriptional modification by a CASK-interacting nucleosome assembly protein. *Neuron* **42**: 113-28.
- Wang Y-ME, Esbensen P and Bentley D (1998) Arginine kinase expression and localization in growth cone migration. *J Neurosci* **18**: 987-98.
- Waragai M, Junn E, Kajikawa M, Takeuchi S, Kanazawa I, Shibata M, Mouradian MM and Okazawa H (2000) PQBP-1/Npw38, a nuclear protein binding to the polyglutamine tract, interacts with U5-15kD/dim1p via the Carboxyl-terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun* **273**: 592-95.
- Waragai M, Lammers CH, Takeuchi S, Imafuku I, Udagawa Y, Kanazawa I, Kawabata M, Mouradian MM and Okazawa H (1999) PQBP-1, a novel polyglutamine tract-binding protein, inhibits transcription activation by Brn-2 and affects cell survival. *Hum Mol Genet* **8**: 977-87.
- Watanabe S, Take H, Takeda K, Yu Z-X, Itawa N and Kajigaya S (2000) Characterization of the CIN85 adaptor protein and identification of components involved in CIN85 complexes. *Biochem Biophys Res Commun* **278**: 167-74.
- Watty A, Prieto F, Beneyto M, Neugebauer M and Gal A (1991) Gene localization in a family with X-linked syndromal mental retardation (Prieto Syndrome). *Am J Hum Genet* **38**: 234-39.
- Wilsker D, Patsialou A, Dallas PB and Moran E (2002) ARID proteins: a diverse family of DNA binding proteins implicated in the control of cell growth, differentiation, and development. *Cell Growth Differ* **13**: 95-106.
- Wittwer F, van der Straten A, Keleman K, Dickson BJ and Hafen E (2001) Lilliputian: an AF4/FMR2-related protein that controls cell identity and cell growth. *Development* **128**: 791-800.

- Wong GK, Passey DA and Yu J (2001) Most of the human genome is transcribed. *Genome Res* **11**: 1975-77.
- World Health Organization. International classification of impairments, disabilities and handicaps. (World Health Organization, Geneva, 1980)
- Yedavalli VSRK, Neuveut C, Chi Y, Kleiman L and Jeang KT (2004) Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE Export Function. *Cell* **119**: 381-92.
- Ying SY and Lin SL (2004) Intron-derived microRNAs-fine tuning of gene functions. *Gene* **342**: 25-28.
- Yntema H (2001) Molecular genetics of nonspecific X-linked mental retardation. PhD Thesis. Nijmegen.
- Yoshikawa H, Fujiyama A, Nakai K, Inazawa J and Matsubara K (1998) Detection and isolation of a novel human gene located on Xp11.2-p11.4 that escapes X-inactivation using a two-dimensional DNA mapping method. *Genomics* **49**: 237-46.
- Zechner U, Wilda M, Kehrer-Sawatzki H, Vogel W, Fundele R and Hameister H (2001) A high density of X-linked genes for general cognitive ability: a run-away process shaping human evolution? *Trends Genet* **17**: 697-701.
- Zeit C, Scherthan H, Freier S, Feil S, Suckow V, Schweiger S and Berger W (2003) NYX (nyctalopin on chromosome X), the gene mutated in congenital stationary night blindness, encodes a cell surface protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**: 4184-91.
- Zemni R, Bienvenu T, Vinet MC, Sefiani A, Carrié A, Billuart P, McDonell N, Couvert P, Francis F, Chafey P, Fauchereau F, Friocourt G, des Portes V, Cardona A, Frints S, Meindl A, Brandau O, Ronce N, Moraine C, van Bokhoven H, Ropers HH, Sudbrak R, Kahn A, Fryns JP, Beldjord C and Chelly J (2000) A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation. *Nat Genet* **24**: 167-70.
- Zhang Y, Iratni R, Erdjument-Bromage H, Tempst P and Reinberg D (1997) Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell* **89**: 357-64.
- Zhang Y, LeRoy G, Seeling HP, Lane WS and Reinberg D (1998) The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell* **95**: 279-89.
- Zhang Y, Luan Z, Liu A and Hu G (2001) The scaffolding protein CASK mediates the interaction between rabphilin3a and β -neurexins. *FEBS Letters* **497**: 99-102.



VNIVERSITATĪ VALÈNCIA