







Biologicas  
458  
T.D

**UNIVERSIDAD DE VALENCIA**  
**FACULTAD DE BIOLOGÍA**  
**Departamento de Genética**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES CITOLÓGICAS DE LA**  
**FUNDACIÓN VALENCIANA DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

***DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE LA***  
***HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR EN ESPAÑA***

**TESIS DOCTORAL**  
**F. Javier Chaves Martínez**  
**Valencia, 1996.**

UMI Number: U603056

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U603056

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346





*Biologicas*

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
BIBLIOTECA CIÈNCIES

Nº Registre 9880  
DATA 24-I-97

SIGNATURA  
T. D. 458  
Nº LIBRE: j 208,1433

**UNIVERSIDAD DE VALENCIA**  
**FACULTAD DE BIOLOGÍA**  
**Departamento de Genética**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES CITOLÓGICAS DE LA**  
**FUNDACIÓN VALENCIANA DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

***DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE LA***  
***HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR EN ESPAÑA***

Memoria presentada por F. Javier  
Chaves Martínez para optar al título de  
Doctor en Ciencias Biológicas.

Valencia, Noviembre de 1996.



**M<sup>a</sup> EUGENIA ARMENGOD GONZÁLEZ, Investigadora del Instituto de Investigaciones Citológicas de la Fundación Valenciana de Investigaciones Biomédicas,**

**CERTIFICA:**

**que la presente Tesis Doctoral "Diagnóstico Genético de la Hipercolesterolemia Familiar en España" ha sido realizada bajo su dirección por el Licenciado en Ciencias Biológicas, D. Felipe Javier Chaves Martínez, y que, habiendo revisado el trabajo, considera que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.**

**Y para que conste a los efectos oportunos, se expide la presente certificación en Valencia, a 21 de Noviembre de 1996.**

**Fdo. M<sup>a</sup> Eugenia Armengod González**





Este trabajo de investigación ha sido financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias y la Consellería de Cultura, Educació i Ciència, a través de los proyectos FIS 93/0408 y GV 2505/94, respectivamente.

F. Javier Chaves Martínez

Valencia, Noviembre de 1996.



# ***ÍNDICE***



## ÍNDICE

---

### - Abreviaciones.

<b>I</b>	<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>3</b>
I.1	HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR.	5
I.2	RECEPTOR DE LDL.	7
I.2.1	- Características del Receptor.	7
I.2.2	- Características del Gen RLDL.	8
I.2.3	- Traducción y Procesado del RLDL.	10
I.2.4	- Internalización y Reciclado.	10
I.2.5	- Actividad del RLDL y Regulación del Colesterol en la Célula.	10
I.2.6	- Mutaciones en el Gen RLDL Causantes de HF.	12
I.3	OTRAS HIPERCOLESTEROLEMIAS CON FENOTIPO IIA.	14
I.3.1	- Defecto Familiar de Apolipoproteína B-100.	14
I.3.2	- Hipercolesterolemia Poligénica.	15
I.4	DIAGNÓSTICO CLÍNICO-BIOQUÍMICO DE LA HF.	16
I.4.1	- Limitaciones Clínicas	16
I.4.2	- Limitaciones Bioquímicas	17
I.4.3	- Tratamiento.	18
I.5	DIAGNÓSTICO GENÉTICO.	19
I.5.1	- Diagnóstico Genético Indirecto.	19
I.5.2	- Diagnóstico Genético Directo.	21
<b>II</b>	<b>OBJETIVOS.</b>	<b>23</b>
<b>III</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	<b>27</b>
III.1	- MATERIAL.	29
III.1.1	- Casas Comerciales.	29
III.1.2	- Instrumental General.	30
III.1.3	- DNAs.	30
III.1.4	- Enzimas de Restricción.	30
III.1.5	- Transferencia Southern.	30
III.1.6	- PCR.	31
III.1.7	- Análisis de SSCP.	31
III.1.8	- Secuenciación.	31
III.1.8.1	- Secuenciación Manual.	31
III.1.8.2	- Secuenciación Semiautomática.	32
III.1.8.3	- Secuenciación Automática.	32
III.2	- MÉTODOS.	33
III.2.1	- Selección de Probandos HF y de Controles Normolipidémicos.	33
III.2.2	- Extracción de DNA.	33
III.2.3	- Obtención y Marcaje de Sondas.	33
III.2.4	- Transferencia Southern.	34
III.2.5	- Amplificación por PCR.	34
III.2.6	- PCR Largo.	36
III.2.7	- Análisis de Restricción de Productos de PCR.	36
III.2.8	- Análisis Mediante SSCP.	36
III.2.9	- Métodos Estadísticos.	37
III.2.10	- Obtención de DNA para Secuenciación.	39
III.2.10.1	- Amplificación de DNA para Secuenciar.	39
III.2.10.2	- Purificación del DNA.	39
III.2.11	- Secuenciación.	40
III.2.11.1	- Sistemas Manuales.	40
III.2.11.2	- Sistema Semiautomático.	41
III.2.11.3	- Sistema Automático.	41

---

<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS.</b>	<b>43</b>
IV.1.	CRIBADO DE PACIENTES PORTADORES DE LA MUTACIÓN ApoB <sub>3500</sub> EN LA MUESTRA HF.	47
IV.2.	CRIBADO DE PACIENTES HF PORTADORES DE GRANDES ALTERACIONES EN EL GEN RLDL.	48
IV.3.	DIAGNÓSTICO GENÉTICO INDIRECTO.	51
IV.3.1.	- Polimorfismos del Gen RLDL y Metodología para su Estudio.	52
IV.3.2.	- Frecuencia e Informatividad de los Polimorfismos <i>Sfa</i> NI, <i>Taq</i> I, <i>Av</i> all, <i>Pvu</i> II y <i>Nco</i> I.	57
IV.3.3.	- Contenido Informativo y Desequilibrio de Ligamiento de los polimorfismos Seleccionados.	58
IV.3.4.	- Estudio de los Polimorfismos <i>Av</i> all, <i>Pvu</i> II y <i>Nco</i> I Mediante PCR Largo.	59
IV.3.5.	- Análisis del sitio <i>Apa</i> LI Mediante PCR Largo.	62
IV.3.6.	- Análisis de la Segregación del Gen RLDL Mediante Polimorfismos.	64
IV.3.7.	- Frecuencia, Heterocigosidad y Valor PIC de Once Polimorfismos Presentes en el Gen RLDL.	65
IV.3.8.	- Desequilibrio de Ligamiento e Informatividad de los Polimorfismos Analizados.	66
IV.4.	ANÁLISIS FAMILIAR.	67
IV.4.1.	- Análisis de las Familias.	68
IV.4.1.1.	- Familia FH11.	69
IV.4.1.2.	- Familia FH13.	71
IV.4.1.3.	- Familia FH17.	74
IV.4.1.4.	- Familia FH18.	75
IV.4.1.5.	- Familia FH20.	76
IV.4.1.6.	- Familia FH27.	78
IV.4.1.7.	- Familia FH28.	80
IV.4.1.8.	- Familia FH31.	81
IV.4.1.9.	- Familia FH42.	82
IV.4.1.10.	- Familia FH44.	85
IV.4.1.11.	- Familia FH47.	86
IV.4.1.12.	- Familia FH48.	87
IV.4.1.13.	- Familia FH50.	88
IV.4.1.14.	- Familia FH51.	89
IV.4.1.15.	- Familia FH58.	90
IV.4.1.16.	- Familia FH59.	91
IV.4.1.17.	- Familia FH60.	92
IV.4.1.18.	- Familia FH62.	94
IV.4.2.	- Haplotipos Encontrados y Orden de Máxima Informatividad.	96
IV.4.2.1.	- Análisis con 11 polimorfismos ( <i>Bgl</i> II, <i>Sfa</i> NI, <i>Taq</i> I, <i>Stu</i> I, <i>Hinc</i> II-C- <sub>T1725</sub> , <i>Av</i> all, <i>Hae</i> III, <i>Pvu</i> II, <i>Msp</i> I, <i>Nco</i> I): Haplotipos Identificados.	96
IV.4.2.2.	- Análisis con 5 Polimorfismos ( <i>Sfa</i> NI, <i>Taq</i> I, <i>Av</i> all, <i>Pvu</i> II y <i>Nco</i> I).	98
IV.4.2.3.	- Análisis con 3 Polimorfismos ( <i>Av</i> all, <i>Pvu</i> II y <i>Nco</i> I).	99
IV.5.	DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN RLDL.	101
IV.5.1.	- Caracterización de Grandes Alteraciones.	102
IV.5.1.1.	- Caracterización de la Alteración Valencia-1 (Familia FH16).	102
IV.5.1.2.	- Caracterización de la Alteración Valencia-4 (Probando FH30).	107
IV.5.2.	- Procedimientos Experimentales Optimizados y Desarrollados para Detectar y Caracterizar Pequeñas Mutaciones.	109
IV.5.2.1.	- Detección de Mutaciones Mediante Análisis de SSCPs.	109
IV.5.2.2.	- Secuenciación de Mutaciones.	110
IV.5.2.2.1.	- Secuenciación Manual.	110
IV.5.2.2.2.	- Secuenciación Semiautomática.	111
IV.5.2.2.3.	- Secuenciación Automática.	113

## ÍNDICE

---

IV.5.3.	- Detección y Caracterización de Pequeñas Mutaciones en el Gen RLDL.	118
IV.5.3.1.	- Región Reguladora.	118
IV.5.3.2.	- Exón 1.	120
IV.5.3.3.	- Exón 2.	123
IV.5.3.4.	- Exón 3.	127
IV.5.3.5.	- Exón 4.	130
IV.5.3.6.	- Exón 5.	133
IV.5.3.7.	- Exón 6.	136
IV.5.3.8.	- Exón 9.	139
IV.5.3.9.	- Exón 11.	142
IV.5.3.10.	- Exón 13.	146
IV.5.3.11.	- Exón 14.	148
<b>V</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>151</b>
V.1.	INNOVACIONES TECNOLÓGICAS EN EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO.	153
V.1.1.	- Análisis de SSCPs.	153
V.1.2.	- Utilización de PCR Largo.	154
V.1.3.	- Secuenciación automática directa de productos de PCR.	158
V.2.	PREVALENCIA DE LA MUTACIÓN APOB3500 EN PACIENTES ESPAÑOLES DIAGNOSTICADOS CLÍNICAMENTE COMO HF.	159
V.3.	DIAGNÓSTICO INDIRECTO DE LA HF.	161
V.3.1.	- Estudio de Polimorfismos del Locus RLDL.	161
V.3.2.	- Análisis de Segregación del Gen RLDL: Construcción de Haplotipos	165
V.4.	DIAGNÓSTICO DIRECTO DE LA HF.	169
V.4.1.	- Detección y Caracterización de Grandes Reordenamientos.	170
V.4.2.	- Detección y Caracterización de Pequeñas Mutaciones en el Gen RLDL	173
V.5.	COMPLEMENTACIÓN DEL DIAGNÓSTICO CLÍNICO-BIOQUÍMICO CON EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO.	179
<b>VI</b>	<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>183</b>
<b>VII</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>187</b>

---



## ÍNDICE

---

---

# *Abreviaciones*



## ABREVIACIONES

---

<b>ACAT:</b>	Acil-coenzimaA colesterol aciltransferasa.
<b>AG:</b>	Ácidos grasos.
<b>Apo:</b>	Apolipoproteína.
<b>APS:</b>	Persulfato amónico.
<b>Ci:</b>	Cardiopatía isquémica.
<b>CT:</b>	Colesterol total en sangre.
<b>dATP, dCTP, dGTP y dTTP:</b>	Dexosiadenosina 5'-trifostato (citidina, guanosina y timidina).
<b>ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP:</b>	Didexosiadenosina 5'-trifostato (citidina, guanosina y timidina).
<b>DFB:</b>	Defecto familiar de apolipoproteína B-100.
<b>DIG:</b>	Digoxigenina.
<b>DIG-dUTP:</b>	Digoxigenina-11-desoxiuracilo-5'-trifostato.
<b>DIMAEH:</b>	Ácido DIG-3-0-metilcarbamil-ε-aminocaproico-N-hidroxisuccinimida éster.
<b>DMSO:</b>	Dimetilsulfóxido
<b>dNTPs:</b>	Mezcla equimolar de dexosinucleótidos 5' trifostato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP).
<b>EC:</b>	Ésteres de colesterol.
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminotetraacético.
<b>EGF:</b>	Factor de crecimiento epidérmico.
<b>F-dATP:</b>	Florescein-11-desoxiadnoxina 5'-trifostato.
<b>F-dUTP:</b>	Florescein-11-desoxiuracilo-5'-trifostato.
<b>HDL:</b>	Lipoproteínas de alta densidad.
<b>HDL-C:</b>	Colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad.
<b>HF:</b>	Hipercolesterolemia familiar.
<b>HP:</b>	Hipercolesterolemia poligénica.
<b>IDL:</b>	Lipoproteínas de densidad intermedia.
<b>Kb:</b>	Kilobase.
<b>LCAT:</b>	Lecitin colesterol aciltransferasa.
<b>LDL:</b>	Lipoproteínas de baja densidad.
<b>LDL-C:</b>	Colesterol transportado por las LDL.
<b>LPL:</b>	Lipoproteína lipasa.
<b>LH:</b>	Lipasa hepática.
<b>pb:</b>	Par de bases.
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena catalizada por DNA polimerasas termoestables.
<b>rpm:</b>	Revoluciones por minuto.
<b>RLDL:</b>	Receptor de LDL.
<b>SDS:</b>	Dodecil sulfato sódico.
<b>SSCP:</b>	Polimorfismo de conformación de cadena sencilla de DNA.
<b>TG:</b>	Triglicéridos.
<b>TEMED:</b>	N,N,N',N'-Tetra-metiletilendiamina.
<b>UV:</b>	Ultravioleta (luz).
<b>VLDL:</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad.
<b>VLDL-C:</b>	Colesterol transportado por las lipoproteínas de muy baja densidad.

---



# ***INTRODUCCIÓN***



**I.1. HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR.**

La hipercolesterolemia familiar (HF) es una enfermedad del metabolismo lipídico caracterizada principalmente por la elevación de los niveles de colesterol total (CT) en sangre, debido al incremento del colesterol transportado por las lipoproteínas de baja densidad (LDL-C), mientras que se mantienen normales los niveles del colesterol transportado por lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-C) y de triglicéridos (TG) y ligeramente reducidos los niveles de colesterol transportado por lipoproteínas de alta densidad (HDL-C), (Kwiterovich *et al.*, 1974). Este perfil bioquímico se corresponde con el fenotipo IIA de la clasificación de Beaumont *et al.* (1970) de las dislipemias (ver Tabla 1) y aceptada por la OMS (1970),.

Genéticamente, la HF se caracteriza por ser una enfermedad monogénica con un patrón de transmisión autosómico dominante. Esta enfermedad es causada por mutaciones en el gen del receptor para lipoproteínas de baja densidad (gen RLDL), el cual se localiza en el brazo corto del cromosoma 19 (p13.2) y mide unas 45 Kb (Südorf *et al.*, 1985). Este gen codifica para un receptor de membrana plasmática que reconoce a las apolipoproteínas ApoB-100 y ApoE, mediando la internalización a través de vesículas recubiertas de clatrina (Brown *et al.*, 1976) de las partículas lipoproteicas que las presenten en su superficie.

Diversos estudios epidemiológicos realizados en diferentes poblaciones caucásicas han indicado que la frecuencia de la forma heterocigótica de HF oscila entre 1/300 y 1/500 y la de la forma homocigótica está en torno a 1/1.000.000 de habitantes (Havel *et al.*, 1980).

**Tabla 1:** Clasificación de las dislipemias según Beaumont *et al.* (1970).

FENOTIPO	CARACTERÍSTICAS	
Tipo I	↑ Quilomicrones	Hipertrigliceridemia
Tipo II A	↑ LDL	Hipercolesterolemia
Tipo II B	↑ LDL , ↑ VLDL	Hipercolesterolemia Hipertrigliceridemia
Tipo III	↑ IDL	Hipercolesterolemia Hipertrigliceridemia
Tipo IV	↑ VLDL	Hipertrigliceridemia
Tipo V	↑ Quilomicrones, ↑ VLDL	Hipertrigliceridemia

La deficiencia en la actividad del RLDL origina una disminución del aclaramiento de las VLDL, IDL y LDL mediado por este receptor, lo que conlleva:

- el aumento de las LDL circulantes; las VLDL no aclaradas del torrente circulatorio son transformadas en IDL y éstas, si no son retiradas de la circulación sanguínea, en LDL.

- el aumento de la síntesis endógena de colesterol en las células, debido a la disminución en la captación del colesterol exógeno y, por tanto, en el nivel de colesterol intracelular, junto con la necesidad que de este producto presentan las células.



- el aumento en la síntesis del RLDL, como consecuencia del menor aporte de colesterol a la célula, pero este incremento normalmente no es suficiente para compensar la deficiente actividad de uno de los genes RLDL.

Además, se originan otras respuestas tendentes a proporcionar colesterol a las células, como la inhibición de la esterificación del colesterol y la activación de la hidrólisis de los ésteres de colesterol.

La unión de todos estos procesos aumenta el colesterol circulante, en forma de LDL-C principalmente, ya que las LDL no son retiradas con la eficacia necesaria y parte del colesterol sintetizado por las células pasa a la circulación, mediante las HDL, cuyo contenido en colesterol es transferido a las LDL, además de acumularse el colesterol procedente de la dieta.

La elevación del nivel de LDL tiene como consecuencia el desarrollo de xantomas, xantelasmas, arco corneal y un alto riesgo de enfermedad coronaria prematura, debida al desarrollo de arteriosclerosis coronaria (Kannel *et al.*, 1979, 1986; Keys, 1980; Steinberg, 1987).

La arteriosclerosis es la manifestación más importante de la HF y la que incide de una forma más negativa en la calidad y esperanza de vida de los enfermos debido a los altos índices de mortalidad y morbilidad que conlleva; de hecho, en las sociedades desarrolladas, la arteriosclerosis es la primera causa de mortalidad y morbilidad. En los pacientes de HF, la arteriosclerosis tiene como manifestaciones más importantes la cardiopatía isquémica (que se presenta desde la infancia en los homocigotos), angina de pecho e infarto agudo de miocardio, por el que fallecen la mayoría de los homocigotos entre los 15 y los 30 años y padecen la mayoría de los heterocigotos a partir de los 55 años. Además, en muchos casos se presentan depósitos de colesterol en la válvula aórtica, que origina estenosis aórtica, lo que dificulta aun más la función cardiaca de los pacientes. Es importante señalar que en los enfermos de HF hay una incidencia de enfermedad coronaria 25 veces mayor que en la población general (Sugre *et al.*, 1981), presentando el 50 % de los varones heterocigotos cardiopatía isquémica antes de los 50 años; la aparición está adelantada 10 años frente a las mujeres heterocigotas (donde la incidencia es menor) y 20 años frente a la población general (Sugre *et al.*, 1981), por lo que los problemas coronarios son los causantes de la mayoría de los fallecimientos dentro de este grupo de enfermos.

## I.2. RECEPTOR DE LDL.

### **I.2.1. Características del Receptor.**

El receptor de las LDL es una proteína transmembrana de 839 aminoácidos (con Mr de 120.000 cuando no está glicosilada y 160.000 cuando lo está) cuya secuencia fue descrita, por primera vez, por Yamamoto *et al.* (1984). La proteína presenta los siguientes dominios (ver Fig. 1):

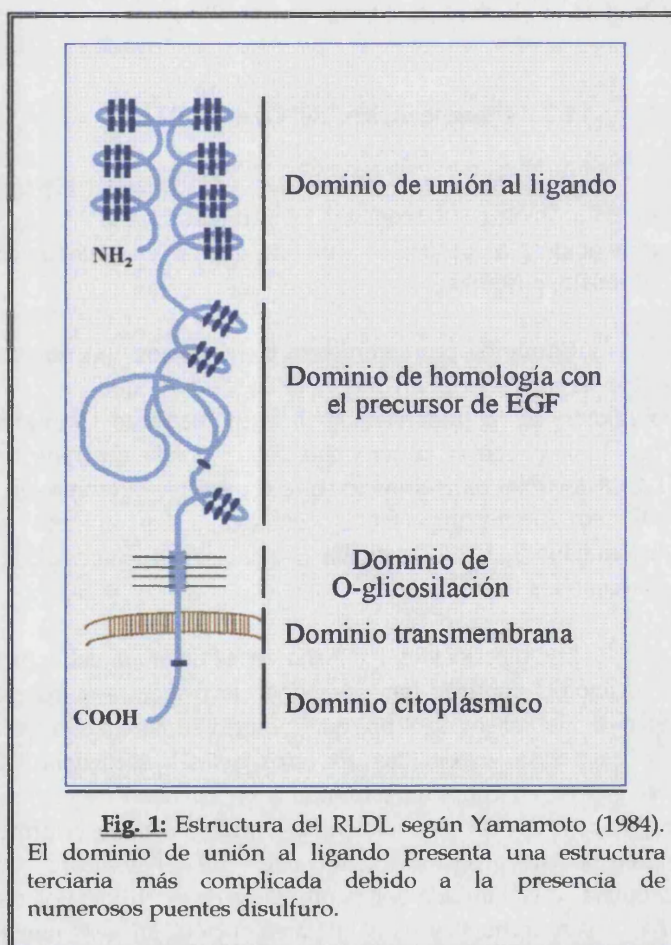
**I- Dominio de unión al ligando o dominio rico en cisteínas:** Está formado por los 322 aminoácidos del extremo amino terminal y contiene un alto porcentaje de cisteínas. Este dominio está estructurado en 7 repeticiones de 40 aminoácidos de los cuales 6 son cisteínas (Hobbs *et al.*, 1990). El plegamiento de la cadena de aminoácidos forma la estructura de unión a ApoB y ApoE (Esser *et al.*, 1988). Esta región presenta numerosas cargas negativas, lo que permite su interacción con las cargas positivas que presentan ApoB y ApoE (procedentes de numerosas Arg y Lys) en la región de reconocimiento y unión al receptor. Estas cargas son esenciales para que se produzca un reconocimiento mutuo y la unión receptor-ApoB ó ApoE (Mahley, 1981; Weisgraber *et al.*, 1988; Myant, 1990a).

Esta región confiere una gran estabilidad al RLDL debido al gran número de puentes disulfuro lo que le permite soportar los cambios de pH que se producen durante su reciclado (Yamamoto *et al.*, 1984).

**II- Dominio de homología con el precursor del factor de crecimiento epidérmico (EGF):** Está formado por los aproximadamente 400 aminoácidos siguientes al dominio de unión; contiene 3 repeticiones de 40 aminoácidos ricas en cisteínas que presentan un alto grado de homología con las repeticiones presentes en el EGF y que no son homologas con las existentes en el dominio de unión al ligando (Soutar & Knigh, 1990; Hobbs *et al.*, 1992); también contiene 5 repeticiones del motivo Tyr-Trp-Thr-Asp cada 40-60 aminoácidos (Hobbs *et al.*, 1992).

**III- Región de O-glicosilación:** Comprende los aminoácidos 700 a 747, entre los cuales se localizan 18 residuos de Ser y Thr, por lo que también se le denomina "dominio rico en Ser-Thr" (Yamamoto *et al.*, 1984).

**IV- Dominio transmembrana:** Esta formado por 22 aminoácidos hidrófobos que atraviesan la membrana plasmática.



**Fig. 1:** Estructura del RLDL según Yamamoto (1984). El dominio de unión al ligando presenta una estructura terciaria más complicada debido a la presencia de numerosos puentes disulfuro.

**V- Dominio citoplasmático:** Consta de los 50 aminoácidos del extremo C-terminal y presenta una señal para la localización del receptor en invaginaciones recubiertas de clatrina y otra para la localización en la superficie sinusoidal de los hepatocitos polarizados (Matter *et al.*, 1992). Este dominio presenta una conformación de giro inverso que permite la unión a las adaptinas (Bansai & Gierasch, 1991). Además, una Cys situada en el aminoácido 818 podría permitir la dimerización del RLDL bajo ciertas circunstancias (van Driel *et al.*, 1987) y una Ser en el aminoácido 833 que podría intervenir en la regulación de la actividad del receptor mediante su fosforilación (Kisimoto *et al.*, 1987).

La región externa de la proteína presenta 5 sitios potenciales de N-glicosilación (en los aminoácidos 76, 135, 251, 494 y 636), si bien estudios cuantitativos muestran que solo existen 2 N-glicosilaciones en el receptor, posiblemente porque los sitios de N-glicosilación localizados en el dominio rico en cisteínas se encuentran en el interior de la estructura tridimensional de esta región y, por tanto, no son accesibles (Yamamoto *et al.*, 1984).

El RLDL es una proteína bien conservada en las diferentes especies donde se ha estudiado (humanos, conejos, vacas, hamster, ratas y ranas), presentando una homología entre el 69 y el 86% en los dominios de unión al ligando, de homología al EGF y citoplásmico y una homología entre el 46 y el 62 % en el dominio transmembrana, si bien, la homología es baja en el péptido señal y en el dominio de unión de O-glicanos (Goldstein *et al.*, 1995).

## **L.2.2 Características del Gen RLDL.**

El gen que codifica el RLDL se localiza en 19p13.2, tiene un tamaño de 45 Kb y está formado por un promotor, 18 exones y 17 intrones. El mRNA, de 5.3 Kb, es traducido en una proteína de 839 aminoácidos; a los cuales hay que añadir 21 aminoácidos del péptido señal que la proteína pierde durante su procesado.

La región promotora está formada por 144 pb, localizadas a unas 100 pb en dirección 5' del inicio de la traducción (Südorf *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1990). Esta región permite la activación o inhibición de la transcripción del gen mediante la unión de proteínas específicas de secuencia que regulan la unión o la actividad del complejo de transcripción. El promotor contiene una secuencia TATA esencial para el inicio de la transcripción (como las encontradas en otras regiones promotoras) y tres repeticiones imperfectas similares a las regiones de unión del activador de la transcripción denominado Sp1. La repetición 1 se encuentra separada 35 nucleótidos de las repeticiones 2 y 3, que son consecutivas (ver Fig. 2.A)

Las repeticiones 1 y 3 son zonas de unión del activador de la transcripción Sp1, mientras que la repetición 2 contiene una secuencia de respuesta a los esteroides (Dawson *et al.*, 1988), denominada SRE-1 que consta de 8 bp, que también se ha encontrado en la región promotora de los genes HMG-CoA sintetasa y reductasa. En estos genes la secuencia SRE-1 induce la activación de la transcripción del gen en ausencia de esteroides y la represión de la transcripción cuando éstos están presentes. La regulación de la transcripción se realiza mediante la proteína SREBP-1 (Yokoyama *et al.*, 1993), la unión de esta proteína a la secuencia SRE-1 aumenta la transcripción de este gen; la acción de esta proteína se ve inhibida por la presencia de esteroides. Por otro lado, hay que señalar que las repeticiones 1 y 3 son esenciales para la transcripción del gen, mientras que la repetición 2 es esencial para la regulación mediante esteroides (mutaciones en la repetición 2 provocan la pérdida de la actividad supresora de los esteroides, Soutar & Knigh, 1990).



## INTRODUCCIÓN

Los exones que forman el gen se agrupan, según la región de la proteína que codifican, de la siguiente forma (ver Fig. 2.B):

Exón 1: Péptido señal.

Exones 2 a 6: Región de unión al ligando.

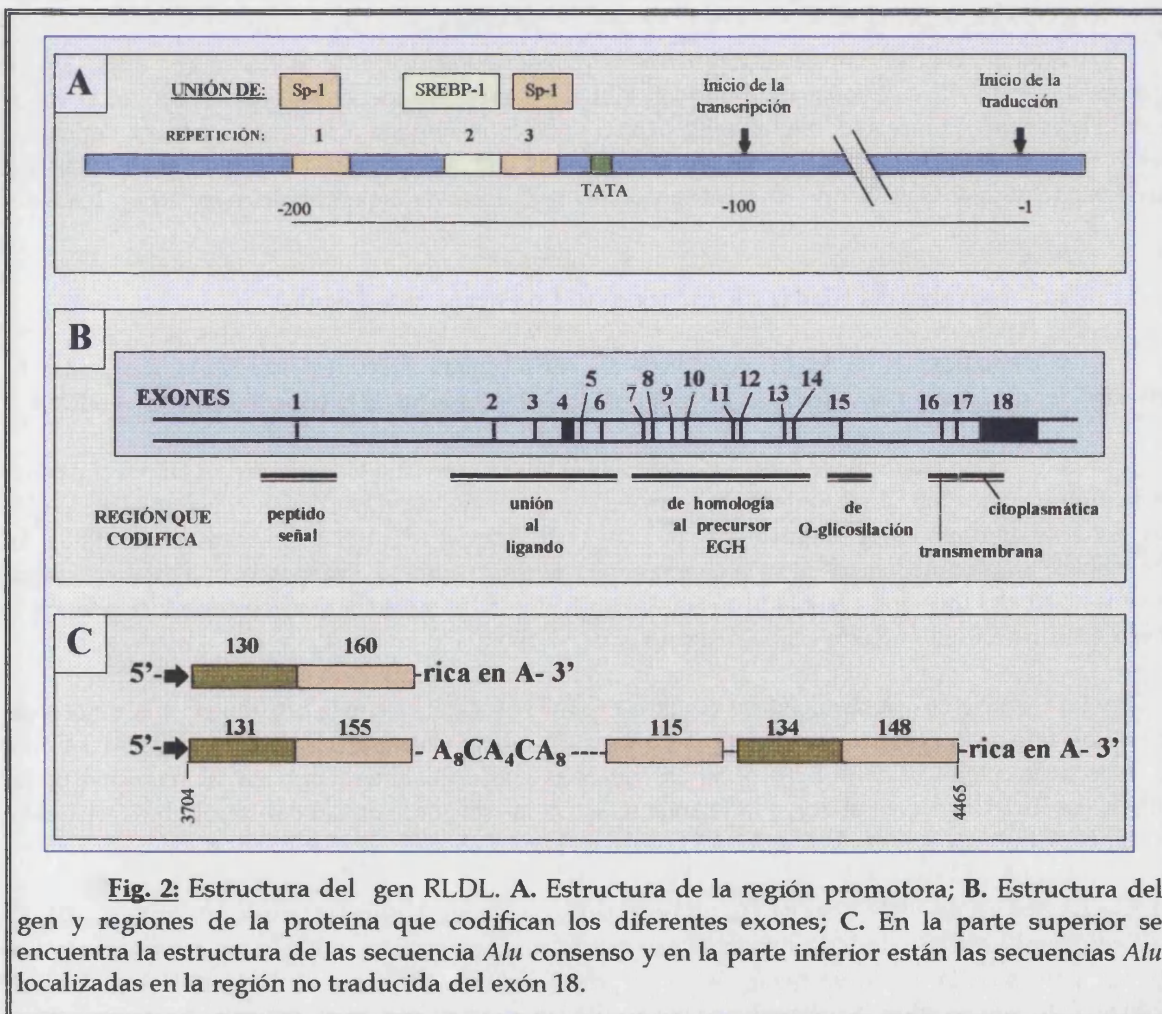
Exones 7 a 14: Dominio de homología con el precursor del EGF.

Exón 15: Dominio de O-glicosilación.

Exón 16 y parte del exón 17: Dominio transmembrana.

Exón 17 y exón 18 (región traducida): Dominio citoplásmico.

La región no traducida del exón 18 (nucleótidos 2581 a 5103) presenta tres secuencias tipo *Alu* entre los nucleótidos 3704 y 4465, cuya estructura y tamaño se pueden observar en la Fig. 2.C. Estas secuencias *Alu* podrían ser eliminadas de algunos mRNA, ya que presentan secuencias similares a las secuencias consenso para el procesado de intrones, el posible sitio 5' de procesado se sitúa en 3538 y el 3' en 4650 (Yamamoto *et al.*, 1984), pero este no parece ser el caso ya que no se han encontrado mRNAs de menor tamaño en los diferentes tejidos estudiados.



**Fig. 2:** Estructura del gen RLDL. A. Estructura de la región promotora; B. Estructura del gen y regiones de la proteína que codifican los diferentes exones; C. En la parte superior se encuentra la estructura de las secuencia *Alu* consenso y en la parte inferior están las secuencias *Alu* localizadas en la región no traducida del exón 18.

### **I.2.3. Traducción y Procesado del RLDL.**

La traducción y procesado del receptor de LDL son los normales de un receptor de la membrana plasmática ya que se realizan según los siguientes pasos (ver Fig. 3.A.):

- Se traduce en el retículo endoplásmico en forma de un precursor (Tolleshaug *et al.*, 1982) que pierde el péptido señal durante este proceso. Al precursor se le añaden cadenas de N-glicanos (ricas en manosa) y el núcleo de los O-glicanos. En esta fase el precursor presenta una Mr de 120.000.

- Es transportado al sistema de Golgi, donde se completa la glicosilación durante su transporte entre las diferentes cisternas. La proteína migra, entonces con Mr 160.000; este gran retraso en la movilidad se debe a cambios conformacionales provocados por las glicosilaciones, ya que el incremento en masa por los azúcares no es suficiente para explicarlo (Cummings *et al.*, 1983).

- Es transportada a la membrana plásmática.

### **I.2.4. Internalización y Reciclado.**

Una vez los RLDLs son transportados a la membrana plasmática, capturan las LDL y se concentran en las invaginaciones revestidas de clatrina. En poco tiempo las invaginaciones se transforman en vesículas endocíticas revestidas de clatrina, cubierta que pierden rápidamente (ver Fig. 3.A.).

Las vesículas endocíticas migran hasta los endosomas primarios y se funden con ellos. El pH ligeramente ácido del endosoma hace que los RLDLs liberen las partículas que habían unido en la superficie celular. El receptor libre es vehiculizado hasta la membrana plasmática mediante vesículas, cuya cubierta inicial se cree que es de clatrina, mientras que las lipoproteínas son dirigidas hacia los lisosomas (Brown & Goldstein, 1976). Estos procesos se pueden ver esquematizados en la Fig. 3.A.

### **I.2.5. Actividad del RLDL y Regulación del Colesterol en la Célula.**

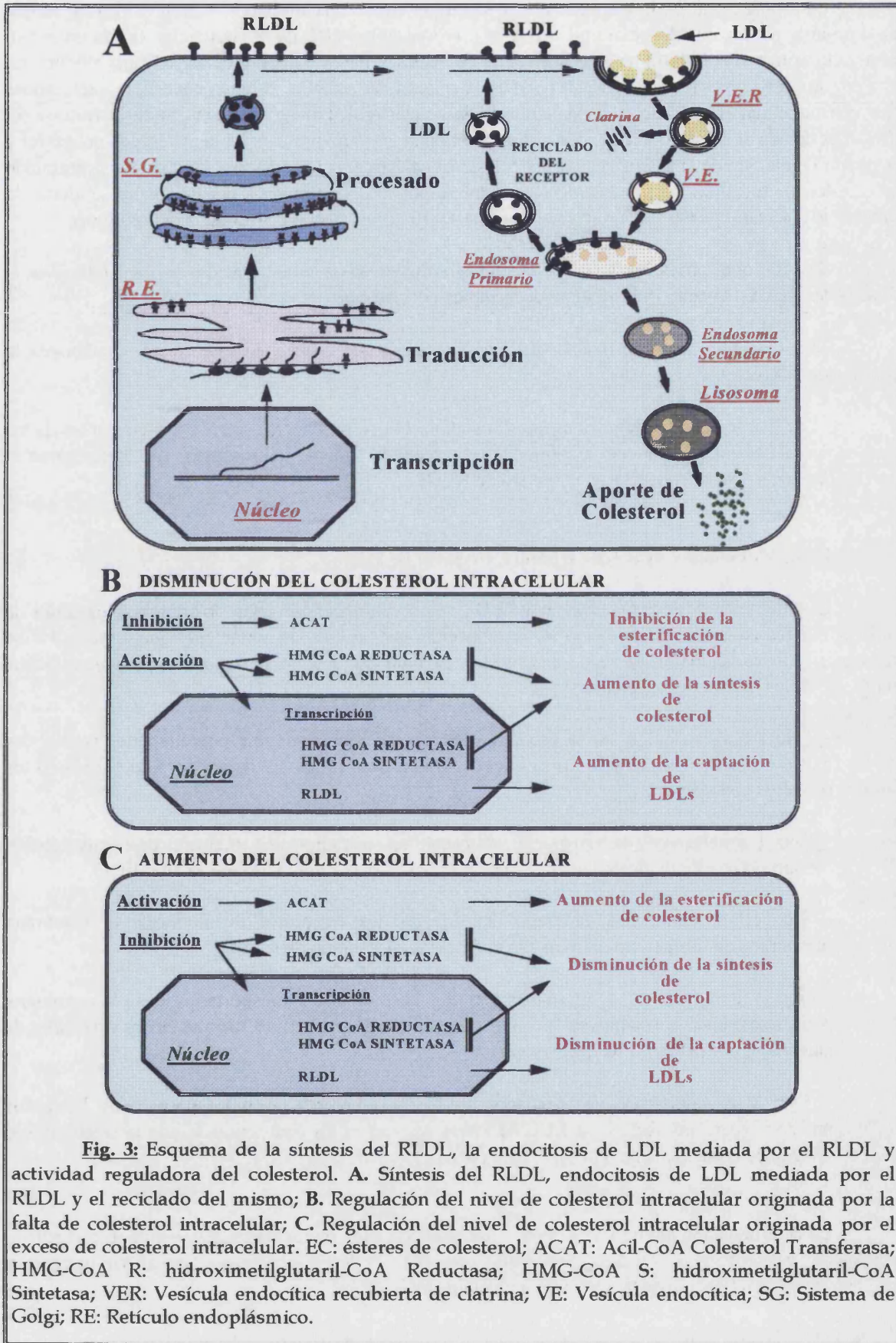
La internalización de las LDL se puede regular mediante diferentes sistemas que afectan a la actividad del receptor y a la síntesis del mismo, principalmente a nivel de la transcripción de su mRNA.

La actividad del receptor puede estar modulada por la presencia o ausencia de LDL en el medio. Se ha propuesto que los RLDLs pueden asociarse entre sí formando dímeros en ausencia de LDL, lo que originaría un aumento en la afinidad por las LDL (van Driel *et al.*, 1987; Gavigan *et al.*, 1988), la presencia de estas partículas inhibiría la unión de los receptores entre sí. Por otro lado, existe una serina en la posición 883 (dominio citosólico) que puede ser fosforilada, si bien la relación entre fosforilación y la actividad del receptor no está clara (Kisimoto *et al.*, 1987).

La carencia de colesterol induce la síntesis de mRNA del RLDL y la activación de la síntesis de colesterol, activando la hidroximetil-glutaril-CoA reductasa y la sintetasa (HMG-CoA-R y HMG-CoA-S, respectivamente) (ver Fig. 3.B), mientras que el exceso de colesterol supone la inhibición de la síntesis del RLDL y del colesterol, a la vez que se activa la esterificación del colesterol libre (activando la Acil-CoA Colesterol Transferasa, ACAT) (ver Fig. 3.C.).

La síntesis de mRNA del RLDL está regulada, en células cultivadas, por los niveles de LDL-C y de colesterol libre, siendo los inhibidores más potentes los oxisteroles, que pueden ser realmente los agentes activos en la célula en lugar de ser el propio colesterol (Soutar & Knigth, 1990). A nivel molecular, la regulación de la transcripción del gen RLDL pueden verse en el Apartado I.2.2. (Pag. 8).





La captación de las LDL, mediante el RLDL, es especialmente importante en el hígado, ya que es el órgano responsable del aclaramiento de la mayoría de las LDL de la circulación (hasta un 80%). El hígado utiliza el colesterol para la formación de ácidos biliares y lipoproteínas (Myant, 1990b). En este órgano se ha observado que la variación en la síntesis del receptor es muy pequeña, manteniéndose casi constante aún en presencia de exceso de LDL y colesterol. La escasa variación en la síntesis del RLDL es debida al efecto amortiguador que proporcionan la gran variación en la síntesis de colesterol y la rápida regulación de la esterificación del colesterol en este órgano, esto supone que la concentración de colesterol intracelular es prácticamente constante, por lo que la síntesis del RLDL no se altera (la síntesis de colesterol puede sufrir variaciones de hasta 10 veces, siendo constante la del receptor).

Se sabe que varias hormonas y efectores influyen en la incorporación de las LDL y en la síntesis del RLDL (Myant, 1990b), algunos ejemplos podrían ser:

- La disminución de hormonas tiroideas y agentes que provoquen este efecto, disminuyen la producción del receptor.

- Las hormonas esteroideas y agentes que aumenten su producción, insulina, bloqueantes de los canales de calcio, antagonistas de la calmodulina, ésteres de formol, cicloeximida, etc. incrementan la síntesis del mRNA y, en consecuencia, el nivel de RLDL.

#### **I.2.6. Mutaciones en el Gen RLDL Causantes de HF.**

Las mutaciones presentes en el gen RLDL se pueden clasificar según los criterios generales de tamaño, cambio en la secuencia, efecto en la traducción, etc., si bien las mutaciones que originan HF se han clasificado tradicionalmente según un criterio funcional (ver Fig. 4), por el que se proponen (Hobbs *et al.*, 1990) los cinco tipos siguientes:

- Tipo I o alelos nulos: no se produce proteína inmunoprecipitable por diferentes causas (no existe transcripción del gen, no se inicia la traducción, presencia de codones de parada en los primeros codones, etc.).

- Tipo II o mutaciones de transporte: los receptores son deficientes en el transporte intracelular, bloqueado en el retículo endoplásmico (Tipo IIA) ó en el sistema de Golgi (Tipo IIB).

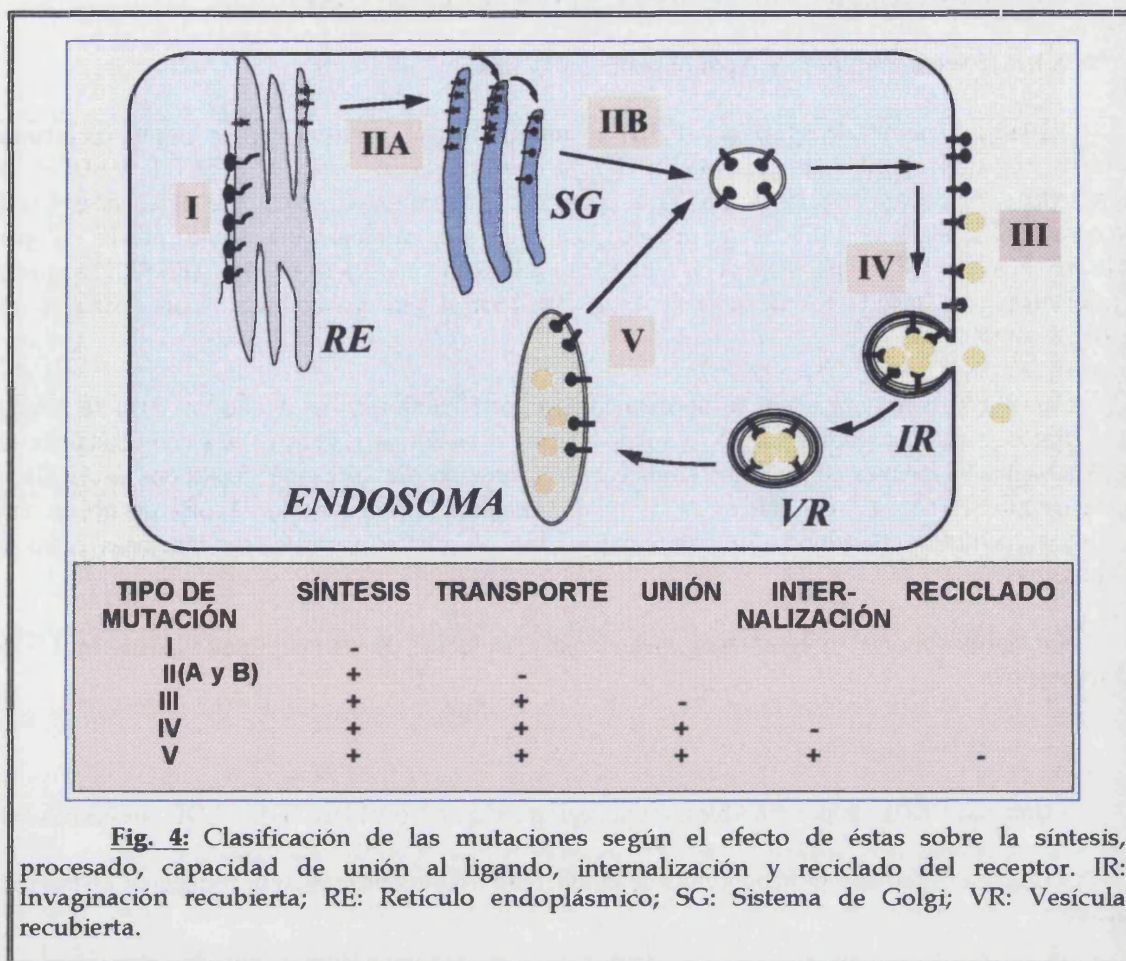
- Tipo III o mutaciones de unión del ligando: los receptores llegan hasta la membrana plasmática de forma normal, pero son deficientes en la unión de las LDL.

- Tipo IV o mutaciones de internalización: los receptores son transportados hasta la membrana plasmática, unen normalmente las LDL pero no se agrupan en las invaginaciones revestidas de clatrina y, por tanto, no se internalizan.

- Tipo V o mutaciones de reciclado: producen receptores normales para todos los pasos anteriores pero no liberan las LDL de forma normal en los endosomas y, por lo tanto, no son reciclados correctamente a la superficie celular.

La determinación del tipo de receptor que ocasiona cada mutación se debe estudiar mediante el análisis del receptor *in vivo*, si bien, en algunas ocasiones se puede proponer el tipo al que pertenecen mediante la caracterización de la mutación a nivel de DNA.





**Fig. 4:** Clasificación de las mutaciones según el efecto de éstas sobre la síntesis, procesado, capacidad de unión al ligando, internalización y reciclado del receptor. IR: Invaginación recubierta; RE: Retículo endoplásmico; SG: Sistema de Golgi; VR: Vesícula recubierta.



### 1.3. OTRAS HIPERCOLESTEROLEMIAS CON FENOTIPO IIA.

#### 1.3.1. Defecto Familiar de Apolipoproteína B-100.

El defecto familiar de ApoB-100 (FDB) es una enfermedad que tiene, esencialmente, las mismas características clínicas y bioquímicas que la HF, ya que origina un incremento del CT y LDL-C en sangre y tiene como manifestaciones clínicas la aparición de depósitos xantomatosos en tendones y piel, arco corneal, arteriosclerosis precoz que provoca la aparición de cardiopatía isquémica precoz, al igual que la HF. Pero la FDB, a diferencia de la HF, es causada por la mutación ApoB<sub>3500</sub> (R3500E, según la nomenclatura recomendada por Beaudet & Tsui, 1993) en el gen que codifica ApoB (Soria *et al.*, 1989).

ApoB-100 tiene una masa de aproximadamente 550.000 Da, de la que un 10% se debe a carbohidratos y está compuesta por 4536 aminoácidos (en su forma madura). Está codificada por un gen (ApoB) que se localiza en 2p24 del cromosoma 2, formado por 29 exones repartidos en 43 Kb, y origina un mRNA de 14.5 Kb (Chen, *et al.*, 1986; Blackhart *et al.*, 1986). ApoB-100 no es muy conocida estructuralmente debido a su gran tamaño si bien se conocen varias de sus funciones, entre las que sobresalen:

- Papel importante en la síntesis, ensamblaje y secreción de las lipoproteínas ricas en TG de síntesis hepática.
- Componente estructural de las VLDL, IDL y LDL.
- Unión al RLDL, imprescindible para la degradación de las VLDL, IDL y LDL por las células.
- Unión a heparina y proteoglicanos de la pared arterial implicados en la formación de la placa de ateroma.

La mutación ApoB<sub>3500</sub>, responsable de FDB, se localiza en una región implicada en el reconocimiento entre el RLDL y ApoB-100. La alteración ocasionada en esta región supone la disminución de la afinidad entre ambas proteínas, por lo que las VLDL, IDL y LDL son aclaradas con menos eficacia de lo normal y, como consecuencia, se acumulan las LDL en sangre .

Como ya se ha comentado, los síntomas de la FDB son idénticos a los de la HF (Schuster *et al.*, 1990; Myant *et al.*, 1991), por lo que su diagnóstico preciso debe realizarse a nivel de proteína, mediante anticuerpos monoclonales para identificar la proteína mutada (Weisgraber *et al.*, 1988), o analizar la unión de las VLDL y LDL a receptores normales; también puede hacerse a nivel genético, detectando la presencia o ausencia de la mutación ApoB<sub>3500</sub>, si bien no se puede descartar la existencia de otras mutaciones en este gen que tengan el mismo efecto, ya que se han detectado individuos con niveles de aclaramiento de VLDL y LDL bajos que no presentan la mutación ApoB<sub>3500</sub> y poseen un RLDL normal (Vega & Grundig, 1992); así, recientemente, se han descrito dos mutaciones, ApoB<sub>3531</sub> (Pullinger *et al.*, 1995) y ApoB<sub>3480</sub> (Nissen *et al.*, 1995), localizadas en la misma región de la secuencia de ApoB y que tienen los mismos efectos que ApoB<sub>3500</sub>, pero presentan una frecuencia mucho menor (Pullinger *et al.*, 1995; Nissen *et al.*, 1995).

### **I.3.2. Hipercolesterolemia Poligénica.**

La hipercolesterolemia poligénica (HP) es la forma más frecuente de las hiperlipidemias primarias con fenotipo IIA ya que supone el 80% de las mismas. Dentro de este grupo se debe incluir a los individuos con LDL colesterol superior al percentil 95 correspondiente a su edad y sexo pero en los que no se pueda demostrar una herencia monogénica (Bierman & Glomset, 1985).

Sus mecanismos patogénicos no son bien conocidos. Parece probable que exista una heterogeneidad de las LDL que altere su reconocimiento y unión al receptor, lo que dificultaría su aclaramiento plasmático y daría lugar a su concentración en sangre. En estos sujetos se ha demostrado que los receptores de LDL son normales (Brown *et al.*, 1981).

La HP se manifiesta a partir de los 20 años de edad siendo infrecuente la aparición de xantomas tendinosos y de arco corneal. Sólo un 10% de los familiares de primer grado presentan hipercolesterolemia a diferencia de lo que ocurre con las formas monogénicas. En todo caso, el riesgo de cardiopatía isquémica precoz es también elevado.

En resumen, se trata de un proceso heterogéneo poco conocido que incluye a individuos con una gran variabilidad en la concentración plasmática de colesterol ante las modificaciones dietéticas y de otros factores exógenos (Carmena, 1990).

#### **I.4. DIAGNÓSTICO CLÍNICO-BIOQUÍMICO DE LA HF.**

El diagnóstico de la HF se basa esencialmente en la aparición de niveles elevados de CT y LDL-C, permaneciendo normales los de TG y VLDL-C y ligeramente reducidos los de HDL-C. Se considera niveles elevados de CT y LDL-C aquellos que superan el percentil 95 de la población. En la población estudiada se han utilizado niveles basales de CT de 275 mg/dl para mujeres y 285 mg/dl para hombres y niveles de LDL-C de 189 mg/dl para mujeres y 193 mg/dl para hombres como valores mínimos indicativos de enfermedad en adultos; en niños y adolescentes se aplicaron los niveles corregidos para edad y sexo según el estudio DRECE (Gutiérrez *et al.*, 1993).

Los síntomas clínicos, como aparición de arco corneal, xantomas, xantelasmas y cardiopatía isquémica, ayudan al diagnóstico de la enfermedad, siempre que exista una comprobación analítica de la alteración lipídica.

Por otro lado, el diagnóstico se debe realizar descartando otras alteraciones como causa de los síntomas de la enfermedad. Así, se deben excluir (por historia familiar y por datos analíticos) como causa de la hipercolesterolemia tipo IIA otras hiperlipidemias, diabetes mellitus, hipotiroidismo, síndrome nefrítico, colestasis, la toma de determinados medicamentos, etc. Además, deben existir antecedentes familiares de hipercolesterolemia (aproximadamente el 50 % de los familiares consanguíneos debe presentar síntomas y, al menos, un progenitor con hipercolesterolemia) y, principalmente, la existencia de niños con fenotipo IIA en la familia confirma fuertemente el diagnóstico.

Una vez se ha diagnosticado un caso de HF, y basándonos en el concepto de “probabilidad *a priori*” de padecer una enfermedad, no podemos definir de igual forma un sujeto afecto, atendiendo a sus niveles de CT o de LDL colesterol, si procede de la población general o de una familia con un caso índice detectado (en población general, la probabilidad de ser un heterocigoto es aproximadamente de 0,2%, mientras que siendo familiar de primer grado de un caso índice, esta probabilidad asciende a un 50%). De aquí se deduce que se deben establecer unos criterios rígidos para definir un caso índice, ya que al estudiar a sus familiares, las probabilidades de acierto diagnóstico basadas sólo en criterios bioquímicos serán más elevadas si el diagnóstico inicial es correcto, incluso bajando los límites de CT y LDL-C utilizados en el diagnóstico (Williams *et al.*, 1995; Tesis Doctoral de J. Real).

##### **I.4.1. Limitaciones Clínicas.**

Los parámetros clínicos característicos de la HF, tales como la presencia de arco en menores de 40 años de edad o de xantomas, no son patognomónicos de la enfermedad. Aunque la aparición de los mismos es muy sugestiva, su frecuencia según diferentes estudios es muy variable, pudiendo llegar al 70% en mayores de 20 años y sólo al 10% en niños (Kwiterowich *et al.*, 1974). El 50% de los sujetos que presentan xantelasmas tienen niveles normales de CT por lo que tampoco éste es un dato definitivo (Carmena, 1990).

Las manifestaciones de cardiopatía isquémica precoz no son exclusivas de la enfermedad, puesto que se dan también en otras dislipemias primarias e, incluso, en pacientes sin dislipemias pero con otros factores de riesgo cardiovascular.

#### I.4.2. Limitaciones Bioquímicas

Los valores de CT o de LDL-C deben definir una hiperlipidemia IIA, estos valores se toman de forma arbitraria teniendo en cuenta el grado de riesgo coronario. Si consideramos el nivel de colesterol como cualquier parámetro biológico, se consideran cifras anormalmente altas aquellas que sobrepasan un límite de referencia dado por el valor medio de la distribución en población general más dos desviaciones estándar o bien el percentil 95 de la distribución en dicha población (Heiss *et al.*, 1980).

El límite superior de CT para la normalidad oscilaría, en poblaciones occidentales, entre 180-220 mg/dl para adolescentes y 260-300 mg/dl para adultos de ambos sexos, con lo que sólo un 5% de la población sería hipercolesterolemica.

Los datos bioquímicos junto con la historia familiar establecen, dentro del grupo de las hiperlipidemias familiares IIA, si se trata de una HP ó de una HF. Por otro lado, la hipercolesterolemia combinada es más fácil de clasificar por el fenotipo cambiante del sujeto afecto (IIA, IIB o IV) y por la presencia de familiares de primer grado afectados con diferentes fenotipos.

Para diagnosticar un caso aislado de hipercolesterolemia familiar heterocigota nos basaremos en la presencia de niveles elevados de CT y LDL-C. La media de los niveles de colesterol en estos sujetos es de 360 mg/dl con un rango entre 250 mg/dl y 550 mg/dl (Stone *et al.*, 1974), lo que indica la gran variabilidad en cuanto a los niveles lipídicos de los pacientes afectados. Esta variabilidad dificulta y confiere cierta inseguridad al diagnóstico clínico-bioquímico.

La distribución de los niveles de CT y de LDL-C es continua, tanto en población sana como en pacientes definidos como heterocigotos. Esto hace que exista un grado de solapamiento entre las dos distribuciones, por lo que en este punto no podremos saber si se trata de un heterocigoto o de un sujeto hipercolesterolemico por otras causas. Incluso el grado de solapamiento entre afectados por HF y HP es aún mayor, lo que dificulta su diagnóstico diferencial. Por lo que resulta difícil realizar un diagnóstico seguro de la patología en cada enfermo.

Si calculamos desde el punto de vista teórico, atendiendo a las distribuciones de los niveles de LDL colesterol, un valor que dé una mayor rentabilidad diagnóstica, como por ejemplo utilizando el percentil 90 de CT y LDL-C como valor mínimo indicativo de la enfermedad, el 10% de los afectados queda por debajo (falsos negativos), mientras que el 7% de los sanos queda por encima de este valor (falsos positivos). Si lo calculamos para el CT, que es la medida habitual de despistaje, nos encontraremos que serán mal clasificados un 27% de los individuos estudiados (Kwiterowich *et al.*, 1993). Por lo tanto, siempre se debe ser consciente de que basándonos sólo en un nivel elevado de CT o de LDL-C es imposible un diagnóstico de certeza (Koivisto *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1993, 1995).

Un problema adicional lo suponen los niños y adultos jóvenes heterocigotos (menores de 18 años) puesto que la expresión fenotípica de la enfermedad es incompleta. Sólo un 10% de los pacientes en este grupo de edad tienen xantomas tendinosos y ninguno de ellos presenta sintomatología de cardiopatía isquémica. En teoría, la HF es una enfermedad que se debe expresar desde el nacimiento y, por lo que, los recién nacidos heterocigotos deben tener niveles superiores al percentil 95 de CT y de LDL colesterol. Si se miden en cordón umbilical los niveles de LDL-C nos encontraremos que el 20% de los afectados no superan el percentil 95 y, por ello, no serán diagnosticados (Kwiterowich *et al.*, 1973); además, existe una zona de solapamiento entre la población infantil sana y la población de heterocigotos, lo que originará que algunos de los pacientes sean mal clasificados (Kwiterowich *et al.*, 1974). Por otro lado, la expresividad clínico-bioquímica cambia en la adolescencia, siendo bien conocido que los valores lipídicos descienden durante este periodo de vida, lo que puede llevar a falsos negativos en el diagnóstico (Streja *et al.*, 1978).

Si tomamos como valor diagnóstico el percentil 95 para LDL-C, el 5% de los niños en la población general estarían afectados. Como la frecuencia de la hipercolesterolemia familiar heterocigota es de 1/500, sólo 1 de cada 25 niños con LDL-C elevado será un heterocigoto, en los otros 24, esta elevación se deberá a factores exógenos o a otras patologías genéticas (Kwiterowich *et al.*, 1986).

Siempre hay que tener en cuenta que la diferenciación entre HF y DFB no es posible, como ya se ha comentado en el Apartado I.3.1, por lo que se puede suponer que siempre se comete un porcentaje de errores en el diagnóstico de las hipercolesterolemias tipo IIA, al incluirse como HF las DFB. Además, se desconoce la frecuencia de la DFB en la población española.

Por lo mencionado anteriormente, podemos afirmar que el diagnóstico de sujetos con HF basado en criterios clínico-bioquímicos es difícil, sobre todo en adultos jóvenes, niños y afectados de otras hipercolesterolemias, dada la elevada cantidad de falsos positivos, negativos y casos dudosos que se han encontrado. La posibilidad de realizar un diagnóstico correcto aumenta si el estudio se hace en un contexto familiar y con criterios bioquímicos estrictos (Williams *et al.*, 1995); sin embargo, insisto, es imposible distinguir la DFB de la HF puesto que presentan igual fenotipo.

#### I.4.3. Tratamiento.

Los problemas (principalmente cardiopatía isquémica) originados por los altos niveles de CT y LDL-C, se pueden presentar desde edades tempranas. Por lo que se debe instaurar, lo antes posible, el tratamiento adecuado para disminuir su riesgo de aparición.

El objetivo terapéutico es conseguir que los pacientes mantengan unos niveles de LDL-C menores de 130-160 mg/dl en la prevención primaria y de 100 mg/dl en la prevención secundaria (Illingworth, 1993). El tratamiento de HF, al igual que en otras hipercolesterolemias con fenotipo IIA, se basa en:

- Tratamiento dietético. Principalmente requiere la disminución de la ingesta de colesterol, la sustitución de ácidos grasos saturados por monoinsaturados o polinsaturados, consumo de las calorías necesarias para el mantenimiento de un peso correcto, etc.

- Control de otros factores de riesgo no lipídicos. Se deben detectar, informar y controlar otros factores de riesgo cardiovascular en estos pacientes. Por ejemplo, se deben controlar otras patologías como la diabetes mellitus, la hipertensión, etc.; se debe promover el abandono de hábitos que aumentan el riesgo de padecer enfermedades coronarias (tabaquismo, sedentarismo, etc.) y favorecer hábitos saludables.

- Tratamiento farmacológico. Principalmente se utilizan resinas de intercambio aniónico e inhibidores de la HMG-CoA R.

- Otros procedimientos. Los principales procedimientos son la aféresis de LDL, trasplante hepático y terapia génica (en fase de experimentación en estos pacientes), que se utilizan en casos extremos, quedando reservada su aplicación casi exclusivamente a los homocigotos.

## 1.5. DIAGNÓSTICO GENÉTICO.

El análisis del DNA puede ser utilizado como una vía para la confirmación/exclusión de numerosas enfermedades de origen genético. Para realizar el diagnóstico genético de una enfermedad se utilizan dos aproximaciones diferentes: 1- Diagnóstico genético indirecto, que se basa en el seguimiento de haplotipos o de marcadores genéticos polimórficos del gen responsable de la enfermedad que indican la presencia o la ausencia del alelo patológico, 2- Diagnóstico directo, basado en la detección de la mutación responsable de la enfermedad en un individuo.

En la HF se ha utilizado el diagnóstico indirecto (Humphries *et al.*, 1985; Taylor *et al.*, 1988; etc.) y el directo (Tolleshaugh *et al.*, 1982; 1983; Goldstein *et al.*, 1995) en diferentes poblaciones, debido a que existen numerosos problemas en el diagnóstico de HF mediante características clínicas y bioquímicas en individuos HF heterocigóticos, como ya se ha comentado en el Apartado anterior. Un diagnóstico basado exclusivamente en parámetros clínicos-bioquímicos puede provocar que cierto porcentaje de individuos sean mal clasificados o permanezcan como individuos de "diagnóstico clínico dudoso".

Dado que la HF en heterocigosis es una enfermedad con elevado riesgo de cardiopatía isquémica y existe un tratamiento eficaz para reducirlo, es necesario desarrollar nuevos criterios o métodos para conseguir un diagnóstico precoz, seguro y, a poder ser, presintomático. Esta posibilidad la ofrece actualmente el diagnóstico genético, ya sea indirecto o directo.

### 1.5.1. Diagnóstico Genético Indirecto.

El diagnóstico genético indirecto se basa en el estudio de la segregación, en una familia, de diferentes polimorfismos ubicados en las proximidades o en el locus del gen responsable de la enfermedad (interesa que los polimorfismos no estén alejados del gen, dado que con la distancia aumenta el porcentaje de recombinación y, por tanto, la posibilidad de cometer un error en el estudio de la segregación de la enfermedad aumenta). Si se utilizan diferentes polimorfismos localizados en el gen a estudiar, la fracción de recombinación ( $\theta$ ) tiende a 0 (Cooper & Krawczack, 1993) y, posiblemente, una recombinación en el gen se podría detectar si los polimorfismos están distribuidos a lo largo del mismo. Mediante el estudio de la segregación de estos polimorfismos en una familia se pueden construir los haplotipos de los diferentes miembros de la misma para los polimorfismos estudiados y se puede relacionar la presencia de un determinado haplotipo con la presencia de la enfermedad (cosegregación).

En el diagnóstico genético indirecto o familiar son útiles aquellos polimorfismos que presentan una mayor informatividad (representada, generalmente, como índice de heterocigosidad y valor PIC) (Botstein *et al.*, 1980), es decir, aquellos polimorfismos con los cuales se puede hacer un seguimiento del gen en el mayor número de casos posible; este valor viene determinado por la frecuencia de los alelos del polimorfismo. En un polimorfismo con dos alelos la máxima información se obtendrá cuando la frecuencia de cada uno sea 0.5.

Para calcular la informatividad de un polimorfismo se utilizan normalmente:

- El índice de heterocigosidad, que representa la probabilidad de que un individuo cogido al azar sea heterocigoto para el polimorfismo y, por tanto, potencialmente informativo.

- El valor PIC, que representa la probabilidad de que conociendo el genotipo de los padres y de la descendencia se pueda deducir cual de los dos alelos ha recibido la descendencia del progenitor afecto.



Cuando se estudian varios polimorfismos, un factor a tener en cuenta es el desequilibrio de ligamiento que existe entre ellos. En nuestro caso, hemos utilizado  $\Delta$  como medida del desequilibrio de ligamiento (Chakravarti *et al.*, 1984), ya que es el más utilizado en la bibliografía sobre HF;  $\Delta$  se podría definir como la medida de la asociación existente entre los diferentes polimorfismos, diciéndose que dos polimorfismos se encuentran en desequilibrio de ligamiento cuando la asociación que existe entre ellos es mayor que la debida al azar. De ésto se deduce el interés de que los polimorfismos no estén en desequilibrio de ligamiento, ya que, por ejemplo, conforme aumenta el valor de  $\Delta$  (en términos absolutos) para dos polimorfismos, la información obtenida mediante el estudio de ambos disminuye, consiguiéndose al final prácticamente la misma información cuando se estudian los dos polimorfismos que cuando se estudia el más informativo de ellos.

Estudiando los haplotipos construidos mediante varios polimorfismos podemos calcular el PIC acumulado; éste valor nos indica la probabilidad de conocer la procedencia de los alelos en la descendencia, al menos por un polimorfismo y, por tanto, nos indica la probabilidad de realizar un diagnóstico utilizando esos polimorfismos. Si este cálculo se realiza de tal forma que se aumenta de uno en uno el número de polimorfismos y se toman las combinaciones más informativas para cada número de polimorfismos, obtendremos así el orden de máxima informatividad o el orden teórico en el que se deben utilizar los polimorfismos para obtener el máximo grado de diagnóstico utilizando el menor número posible de polimorfismos (inicialmente se toma el polimorfismo que presenta un mayor PIC, luego se le añade el polimorfismo que, junto con el anterior, presente un mayor PIC acumulado; posteriormente se seleccionaría el polimorfismo que presenta el mayor PIC acumulado, junto con los polimorfismos anteriormente seleccionados; este proceso se realizaría hasta completar la lista de polimorfismos o hasta que el valor PIC acumulado no aumentase).

Afortunadamente, se han descrito un gran número de polimorfismos, la mayoría son RFLPs, a lo largo del gen del RLDL, algunos se pueden observar en la Fig. 5. (Leitersdorf *et al.*, 1989; Berkman *et al.*, 1992), lo que permite la realización del diagnóstico familiar de esta enfermedad con relativa facilidad.

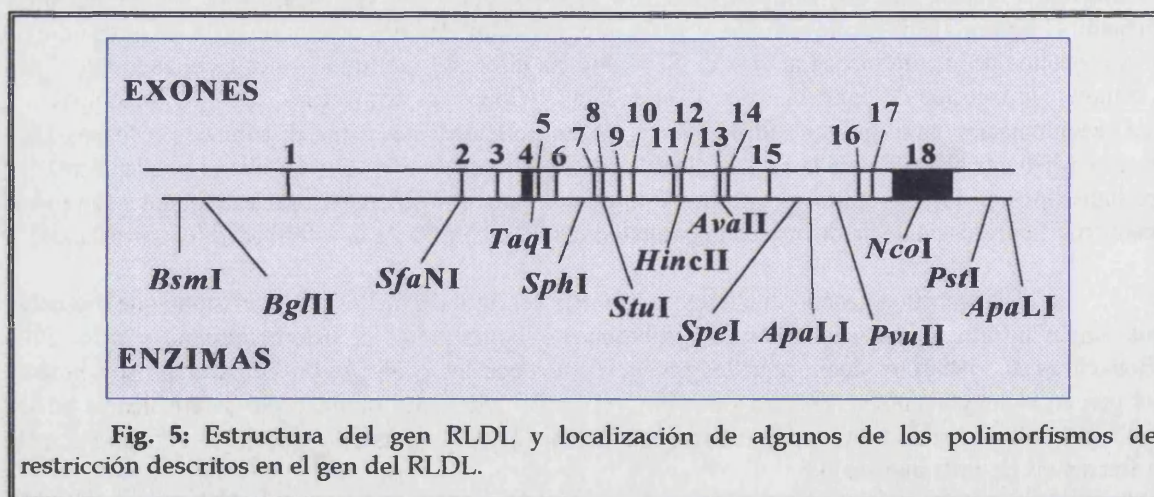


Fig. 5: Estructura del gen RLDL y localización de algunos de los polimorfismos de restricción descritos en el gen del RLDL.

Hasta donde nosotros sabemos, no se habían estudiado las características de los polimorfismos del gen RLDL en población española. El estudio en cada población o en grupos de poblaciones diferenciadas se debe realizar si se quiere obtener el diagnóstico de la forma más sencilla posible; ésto tiene su origen en la variación de la frecuencia y el valor  $\Delta$  que se puede presentar entre poblaciones (Cooper & Clayton, 1988; Miserez *et al.*, 1993, 1994a). Ya que los marcadores utilizados en nuestro trabajo son intragénicos y se extienden a lo largo de todo el gen, o están muy próximos al mismo, la frecuencia de recombinación entre los marcadores y la mutación responsable de la enfermedad es tan baja que se puede despreciar, sobre todo si escogemos los polimorfismos adecuadamente.

Este estudio genético ofrece la posibilidad de realizar un diagnóstico seguro en las familias que presentan casos dudosos. El diagnóstico genético indirecto requiere, para ser fiable, que las familias sean grandes y no exista recombinación meiótica. Al basarse en la cosegregación de un haplotipo con el fenotipo HF permite, cuando es posible realizarlo, la confirmación del diagnóstico clínico y clasificar un individuo dudoso como portador o no del alelo mutado.

Por otro lado, la gran heterogeneidad de las mutaciones responsables de HF en poblaciones abiertas (Hobbs *et al.*, 1990, 1992; Goldstein *et al.*, 1995), como la española, hace que sea muy recomendable la utilización del diagnóstico indirecto, debido a la gran cantidad de trabajo que se precisa para detectar la mutación responsable de la enfermedad en una familia dada, principalmente sin un estudio previo de las mutaciones más prevalentes en la población objeto del estudio, y a la posibilidad de no localizar la mutación causante de la enfermedad en algunos individuos o familias mediante las técnicas actuales (Leitersdorf *et al.*, 1990; Goldstein *et al.*, 1995).

### **I.5.2. Diagnóstico Genético Directo.**

Este sistema de diagnóstico se basa en la detección y caracterización de la mutación responsable de la enfermedad en una familia o en un individuo. La posibilidad de realizar el diagnóstico mediante la detección de la mutación responsable de la enfermedad nos permite el estudio de individuos aislados, sin recurrir al estudio familiar.

Se han encontrado numerosas mutaciones responsables de HF a lo largo de todo el gen RLDL (Hobbs *et al.*, 1990; Leitersdorf, *et al.*, 1990; Soutar, 1990; Goldstein *et al.*, 1995) en diferentes poblaciones. En poblaciones endogámicas, una o unas pocas mutaciones son responsables de la enfermedad y, por ello, el diagnóstico directo es fácil de aplicar. No ocurre lo mismo en poblaciones no endogámicas, aunque la identificación de mutaciones en las mismas con una prevalencia entre el 2 y el 10 % puede ayudar en el rastreo preliminar. Dado que la población española no es endogámica, cabe esperar que las mutaciones responsables de la HF en la misma se extiendan al azar a lo largo de todo el gen.

Es interesante la identificación de las mutaciones presentes en una población debido a que su conocimiento puede facilitar el diagnóstico directo en futuros pacientes. Además, la caracterización de tales mutaciones puede permitir el diseño de tratamientos específicos para las mismas. En el caso de que un individuo pertenezca a una familia en la que la mutación es conocida, el diagnóstico se realiza de forma directa, mediante el estudio de la presencia o ausencia de la mutación, mientras que si se trata de un individuo aislado, el estudio podría simplificarse ya que conociendo las diferentes mutaciones más frecuentes en la población es posible hacer un rastreo para las mismas y, si el resultado es positivo, soslayar el estudio completo del gen.

El diagnóstico genético directo también permite solucionar los casos dudosos en familias donde se conoce la mutación y estudiar la segregación de la enfermedad rápidamente.





# ***OBJETIVOS***



Debido a las limitaciones que presenta el diagnóstico clínico-bioquímico de la HF y la conveniencia de dar un tratamiento a los individuos portadores de la enfermedad lo antes posible, el diagnóstico genético se presenta como un instrumento valioso a la hora de confirmar o establecer la presencia de la enfermedad. Por ello, en nuestro laboratorio hemos desarrollado una investigación destinada a facilitar el diagnóstico genético de la HF en población española y proporcionar mayor conocimiento sobre las bases moleculares de esta enfermedad, su expresión en nuestra población y su influencia en el desarrollo de la arteriosclerosis y la cardiopatía isquémica. Los objetivos concretos de esta Tesis han sido:

1. Diseñar y optimizar los procedimientos adecuados para el análisis molecular del gen RLDL que permitan hacer un diagnóstico genético de la HF de forma sencilla, rápida e inócua.

2. Analizar los diferentes polimorfismos distribuidos por el locus RLDL de forma que podamos establecer las combinaciones más útiles para el diagnóstico genético indirecto de la HF en población española.

3. Iniciar la identificación de las mutaciones responsables de la HF en nuestra población. Esto permitirá el diagnóstico directo de los familiares de los probandos y hacer un cribado inicial en pacientes de nueva captación, lo que puede facilitar el diagnóstico de la enfermedad en estos individuos. Por otra parte, la identificación de las mutaciones en el gen RLDL puede proporcionar una información valiosa en el estudio de las relaciones genotipo-fenotipo y gen-gen, cruciales para entender aspectos relativos a la expresividad y penetrancia de la HF en España.

4. Valorar la utilidad del análisis genético en el diagnóstico de la HF en nuestra población.

## OBJETIVOS

---

***MATERIAL***  
***Y***  
***MÉTODOS***



### III.1. MATERIAL.

#### III.1.1. Casas Comerciales.

Los proveedores habituales de los reactivos y aparatos utilizados en nuestro trabajo fueron:

Agar Scientific Ltd., Stansted, Essex, Reino Unido.  
Agfa, Gevaert, Bélgica.  
Amersham International, Amersham, Bucks, Reino Unido.  
B. Braun Medical S.A., Barcelona, España.  
Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, Estados Unidos.  
Becton-Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos.  
Bio 101, La Jolla, CA, Estados Unidos.  
Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, Estados Unidos.  
Bioprobe Systems, Montreuil Sous Bois, France.  
Boehringer, Mannheim, Alemania.  
Difco Laboratories, Detroit, MI, Estados Unidos.  
Eastman Kodak, Rochester, NY, Estados Unidos.  
Edwards, Bournemouth, Reino Unido.  
FMC BioProducts, Rockland, ME, Estados Unidos.  
Fluka, Buchs, Suiza.  
Gibco-BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, Estados Unidos.  
GATC, Konstanz, Alemania.  
Heraeus Sepatech, Osterode, Alemania.  
Hewlett Packard, Palo Alto, CA, Estados Unidos.  
Hyttest, Turku, Finlandia.  
LKB-Pharmacia, Uppsala, Suecia.  
Merck, Darmstadt, Alemania.  
Millipore Corporation, Bedford, MA, Estados Unidos.  
Milton Roy, Berkshire, Reino Unido.  
New England Biolabs, Beverly, MA, Estados Unidos.  
NBI, Plymouth, MN, Estados Unidos.  
OWL Scientific, Inc., Woburn, MA, Estados Unidos.  
Panreac, Barcelona, España.  
Perkin Elmer, Buckinghamshire, Reino Unido.  
Pharmacia Biotech., Sollentuna, Suecia.  
Philips, Eindhoven, Holanda.  
Polaroid, St. Albans, Reino Unido.  
Promega Corp., Madison, WI, Estados Unidos.  
Qiagen, Inc., Chatsworth, CA, Estados Unidos.  
Riedel-de Haën, Seelze, Alemania.  
Schleicher and Schuell, Dassel, Alemania.  
Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos.  
Stratagene, La Jolla, CA, Estados Unidos.  
Techne, Cambridge, Reino Unido.  
Whatman International Ltd., Maidstone, Reino Unido.



### III.1.2. Instrumental General.

Los aparatos e instalaciones (balanzas, pHmetros, centrifugas de mesa, aparatos de electroforesis, transiluminador de ultravioleta, etc.) utilizados fueron los habituales en laboratorios de Biología y Genética Molecular.

La medición de la concentración y la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm del DNA se realizó mediante un espectrofotómetro "Spectronic III", Pharmacia Biotech.

La secuenciación semiautomática se ha realizado en el secuenciador "GATC 1500-System" (GATC) y la secuenciación automática en el sistema "ALF DNA Sequencer" (Pharmacia Biotech).

### III.1.3. DNAs.

El plásmido pLDL-R3 (ATCC Nº 57004), que contiene el cDNA del gen RLDL (Yamamoto *et al.*, 1984), fue obtenido de "American Type Culture Collection" (Rockville, MD, Estados Unidos).

Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR fueron sintetizados por diferentes casas comerciales: Boehringer Mannheim, Pharmacia Biotech, Promega, NBI, etc.

### III.1.4. Enzimas de Restricción.

Las distintas enzimas de restricción utilizadas (*Bam*HI, *Bgl*II, *Sfa*NI, *Apa*LI, *Taq*I, *Stu*I, *Hind*II, *Ava*II, *Pvu*II, etc.) procedían de las casas Amersham, Boehringer Mannheim, New England Biolabs y Promega.

### III.1.5. Transferencia Southern.

Las membranas utilizadas, a las que se transfería el DNA para la realización de transferencias Southern, fueron "Nylon Membranes Positively Charged" (Boehringer Mannheim).

El marcaje de sondas se realizó mediante la incorporación de digoxigenina-11-desoxiuracilo-5'-trifosfato (DIG-dUTP) (Boehringer Mannheim) mediante "DIG DNA Labeling Kit" (Boehringer Mannheim) o mediante PCR, para el cual se utilizaron los reactivos utilizados para los PCR, descritos en el Apartado siguiente, además de DIG-dUTP.

Para la detección de la sonda se empleó "DIG DNA Luminescent Detection Kit" (Boehringer Mannheim) y la exposición de la membrana se realizó en autorradiografías "X-OMAT S Film" (Kodak).

El Tween-20, la N-laurilsarcosina eran de Sigma Chemical Co., la formamida era de Riedel-de Haën y el dodecil sulfato sódico (SDS) de Bio-Rad Laboratories.

El resto de reactivos empleados fueron todos ellos de la mejor calidad analítica disponible.

### **III.1.6. PCR.**

Como ya se ha mencionado, los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados por diferentes casas comerciales.

Principalmente se han utilizado dNTPs procedentes de Pharmacia Biotech., las Taq DNA polimerasas y los tampones empleados procedían de Promega, Bioprobe Systems (denominada BioTaq) o Hytest.

Los termocicladores empleados han sido “DNA Thermal Cycler” de Perkin-Elmer, “GeneE” y “Progene” de Techne.

Para la amplificación mediante PCR largo se empleó “Expand Long Template Kit” (Boehringer Mannheim) y dNTPs de Pharmacia Biotech o Perkin Elmer. Los oligonucleótidos y los nucleótidos empleados eran los mismos que los empleados en el PCR estándar.

### **III.1.7. Análisis de SSCPs.**

Los SSCP se formaron utilizando formamida (Riedel-de Haën) desionizada, EDTA (Sigma), azul de bromofenol y xilencianol (Bio-Rad).

Se emplearon para la formación de los geles acrilamida de Riedel-de Haën, y bis-acrilamida, TEMED y APS de Bio-Rad. Cuando se incluía un porcentaje de glicerol, éste procedía de Riedel-de Haën.

Se emplearon las cubetas de electroforesis vertical OWL “Penguin” (OWL Scientific) refrigeradas mediante un baño de agua de temperatura regulable (0 a 100 ° C).

La tinción de plata se realizó con nitrato de plata (Sigma Chemical Co.), etanol, ácido acético, formaldehído y carbonato cálcico (Riedel-de Haën).

### **III.1.8. Secuenciación.**

#### **III.1.8.1. Secuenciación Manual.**

La secuenciación mediante PCR y tinción de plata de los geles de electroforesis se realizó con el sistema “DNA Silver Sequencing Kit” de Promega y utilizando los reactivos de tinción mencionados en el Apartado anterior.

La secuenciación con digoxigenina, precisó oligonucleótidos marcados en 5' con esta molécula. Para realizar este marcaje se utilizaron oligos 5'-amino de Boehringer Mannheim y se utilizaba como reactivo el ácido DIG-3-0-metilcarbamil-ε-aminocaproico-N-ester hidroxisuccinimida (DIMAEH) (Boehringer Mannheim); también se utilizaron oligonucleótidos marcados con digoxigenina por las mismas empresas de síntesis de oligos.

Las reacciones de secuenciación se realizaron con “DIG DNA Sequencing Kit” de Boehringer Mannheim.

Para la electroforesis se utilizaron cubetas de electroforesis convencionales y como soporte sólido, al que se transfería el DNA, las membranas "Nylon Membranes Positively Charged" de Boehringer Mannheim. La detección de los fragmentos se realizó mediante "DIG Luminescent DNA Detection Kit" y la visualización se realizó en autoradiografías "X-OMAT S Film"(Kodak).

### **III.1.8.2. Secuenciación Semiautomática.**

Se empleó el sistema semiautomático "GATC 1500-System" (GATC) utilizando membranas "Direct Blotting Membranes" (GATC). La detección se realizó utilizando los mismos reactivos que en el Apartado anterior.

### **III.1.8.3. Secuenciación Automática.**

Para esta secuenciación se utilizaron oligonucleótidos marcados en 5' con fluoresceína, sin marcar, Fluoro-Green (Amersham), dNTPs (Boehringer Mannheim y Pharmacia Biotech), BioTaq (Bioprobe Systems) y ddNTPs (Pharmacia Biotech o Amersham).

Los reactivos utilizados para formar el gel de secuenciación fueron los mismos ya mencionados en el Apartado III.1.7., Pag. 31 (sin utilizar glicerol).

El secuenciador automático utilizado fue un modelo "ALF DNA Sequencer" (Pharmacia Biotech).

## III.2. MÉTODOS.

### III.2.1. Selección de Probandos HF y de Controles Normolipidémicos.

Hemos estudiado el gen RLDL en 61 controles normolipidémicos y 58 probandos HF, 3 de los cuales son heterocigotos compuestos para la enfermedad, no relacionados y de ascendencia española. La construcción de haplotipos HF y sanos se realizó en las familias de 21 probandos compuestas por 197 individuos. Los probandos fueron seleccionados según los siguientes criterios: niveles de CT y LDL-C superiores al percentil 95, corregido para edad y sexo según el estudio DRECE (Gutierrez-Fuentes *et al.*, 1993), con niveles totales de triglicéridos inferiores a 200 mg/ml y dos de los siguientes: a) xantomas tendinosos, b) enfermedad coronaria prematura en el probando o en un familiar de primer grado y c) niños hipercolesterolémicos en la familia; mientras que los controles debían poseer niveles de triglicéridos y CT inferiores a 200 mg/dl y carecer de antecedentes personales o familiares de hiperlipidemias o de enfermedad coronaria. En el estudio familiar fueron clínicamente diagnosticados como dudosos los individuos adultos que presentaban niveles de CT entre 220 y 280 mg/dl y, de LDL-C, entre 160-180 mg/dl. También fueron clasificados como dudosos los niños con niveles de CT entre 180 y 200 mg/dl, y de LDL-C entre 130 y 160 mg/dl.

### III.2.2. Extracción de DNA.

La extracción del DNA genómico de los individuos a estudiar se realizó a partir de 5-10 ml de sangre total siguiendo el método descrito por Tilzer *et al.* (1989).

Los DNAs plasmídicos utilizados se obtuvieron con los sistemas "Plasmid Kit" de Qiagen.

### III.2.3. Obtención y Marcaje de Sondas.

Se emplearon la sonda 2HH1 y las sondas correspondientes a cada exón y a las que se les denominó como "E" más el número del exón al que corresponden.

La sonda 2HH1 tiene un tamaño de 2.0 Kb y comprende desde el nucleótido 1449 al 3461 que incluye los exones 11 a 18, según la numeración de Yamamoto *et al.* (1984) del DNA codificante correspondiente al gen RLDL. La sonda se obtiene fácilmente mediante digestión con *Bam*HI de pLDLR-3 y posterior purificación. Para obtener la sonda libre de los demás fragmentos originados, se separan estos mediante electroforesis en agarosa. Una vez separado el fragmento de DNA correspondiente a la sonda se recupera mediante electroelución, extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol-acetato sódico (Sambrook *et al.*, 1989) El DNA, se resuspende en agua. El marcaje de la sonda 2HH1 se realizó siguiendo las instrucciones de finalmente de los sistemas de marcaje "DIG DNA Labeling Kit" de Boehringer Mannheim.

Todas las demás sondas empleadas proceden de la reamplificación de los exones con cuyo nombre se designan. El marcaje se realizó utilizando las mismas condiciones de amplificación por PCR, pero utilizando la mitad de nucleótidos (habiéndose sustituido un tercio de dTTP por dUTP-DIG) y, como molde, 0.5  $\mu$ l de amplificado. Cuando el amplificado original presentaba bandas diferentes a la esperada se recogía un fragmento de la banda correcta de un gel (las condiciones de electroforesis se encuentran descritas en el Apartado III.2.5) y se depositaba en la mezcla de reacción. Posteriormente, se verificaba la correcta amplificación del fragmento, mediante electroforesis de 5  $\mu$ l del producto en un gel como el anterior y su marcaje, mediante el retraso del amplificado respecto al no marcado.

### III.2.4. Transferencia Southern.

Para la realización de las transferencias Southern (digestión de DNA, electroforesis y transferencia a membrana y fijación a ella mediante luz UV) se siguieron, básicamente, las instrucciones de Sambrook *et al.*, 1989. La hibridación se realizó con sondas marcadas con DIG-dUTP y la detección siguiendo las instrucciones del sistema "DIG Luminescent Detection Kit".

### III.2.5. Amplificación por PCR.

La amplificación mediante PCR del promotor, de cada uno de los exones y fragmentos del gen RLDL analizados y de la región del gen ApoB donde se localiza las mutaciones ApoB<sub>3480</sub>, ApoB<sub>3500</sub> y ApoB<sub>3531</sub> (región Apo3500), se realizó utilizando los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 2, las mezclas y las condiciones de amplificación se encuentran descritas en las Tabla 3 y 4 (el volumen final en las reacciones de amplificación fue, normalmente, de 15 µl).

**Tabla 2.** Oligonucleótidos empleados en la amplificación de los diferentes fragmentos de DNA analizados en el laboratorio.

NONBRE	EXON/FRAG.	SECUENCIA	Tm
LOL	Apo3500	GGG TGG CTT TGC TTG TAT G	59.1
UOL	Apo3500	GAC CAC AAG CTT AGC TTG G	59.1
P-1	E8 (5')	CCA AGC CTC TTC CTC TCT CTC TTC CA	66.6
P-2	E8 (3')	CCA CCC GCC GCC TTC CCG TGC TGA	74.9
P-3	E13 (5')	GCC TGT TTA GGA CAA AGT ATT GG	61.5
P-4	E13 (3')	CCC CCT TAC CTC TTG GTC GGG TGA G	71.4
P-7	E12 (5')	CTA GAT CTC CTC AGT GGC CGC	66.0
P-8	E12 (3')	CAC ACC TCA AAG ACG GCC AAG	64.0
P-9	E1 (5')	CAT TGA AAT GCT GTA AAT GAC GTG G	61.5
P-10	E1 (3')	TTC TGG CGC CTG GAG CAA GCC TTA C	69.7
P-14	E18-R3' (3')	GAG GCA CCC CAG AGG CAA TAA CCC	64.6
P-15	I4 (3')	CAG CCA ACT TCA TCG CTC ATG TCC	66.4
P-16	I4 (5')	AGC TTC CAG TGC AAC AGC TCC ACC	68.1
P-17	E18L (5')	TCC TGA ACT CAA GTG ATC CAG C	62.4
P-18	E18L (3')	TCG AGA CCA TCC TGG CTA ACA A	62.4
P-21	E18H (5')	CAC CTA GTC CTT CCA CTT CTA	60.1
P-22	E18H (3')	TCC CGT CAA ACG ATC CAG ACT	62.0
P-23	E2 (5')	CCT TTC TCC TTT TCC TCT CTC TCA G	64.8
P-24	E2 (3')	AAA ATA AAT GCA TAT CAT GCC CAA A	56.6
P-27	E6 (5')	TCC TTC CTC TCT CTG GCT CTC ACA G	68.1
P-28	E6 (3')	GCA AGC CGC CTG CAC CGA GAC TCA C	73.0
P-31	E3 (5')	TGA CAG TTC AAT CCT GTC TCT TC	60.9
P-32	E3 (3')	ATA GCA AAG GCA GGG CCA C	61.3
P-33	E4 (5')	TGG TCT CGG CCA TCC ATC CCT G	68.0
P-34	E4 (3')	ACG CCC CGC CCC CAC CCT G	72.1
P-39	PROM (5')	GAG TGG GAA TCA GAG CCT TCA CGG G	69.7
P-40	PROM (3')	CCA CGT CAT TTA CAG CAT TTC AAT G	61.5
P-41	E5 (5')	CAA CAC ACT CTG TCC TGT TTT C	60.5
P-42	E5 (3')	GGA AAA CCA GAT GGC CAG CG	63.7
P-43	E9 (5')	CCT GAC CTC GTC TTT CGG ACC	71.8
P-44	E9 (3')	GGC TGC AGG CAG GGG CGA CG	71.9
P-45	E11 (5')	CAG CTA TTC TCT GTC CTC CCA CC	66.2
P-46	E11 (3')	TGG CTG GGA CGG CTG TCC TG	67.8
P-47	E14 (5')	CCT GAC TCC GCT TCT TCT GCC CCA G	71.4
P-48	E14 (3')	ACG CAG AAA CAA GGC GTG TGC CAC	68.1
P-55	E4-R3' (5')	CGA CTG CGA AGA TGG CTC GGA	66.0
P-56	E4-R3' (3')	GGG ACC CAG GGA CAG GTG ATA GGA C	71.4

E, I y PROM indican que la región amplificada es un exón, un intrón o la región promotora, respectivamente. R3' indica que se utiliza para la amplificación de la región 3' del exón indicado.

MATERIAL Y MÉTODOS

La verificación de las amplificaciones se realizaba cargando 5 µl de la reacción en geles horizontales cuyo porcentaje dependía del tamaño del producto esperado, para tamaños inferiores a 300 pb se utilizaron geles 2% NuSieve (FMC), 1% Agarosa (Sigma) en 1 X TEB disminuyendo el porcentaje de agarosa conforme aumentaba el tamaño del fragmento hasta llegar al 1% de agarosa para fragmentos de 1000 pb. El DNA se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio y exposición a luz UV.

**Tabla 3:** Mezclas de reacción utilizadas para un volumen final de 50 µl. Los reactivos se encuentran en las siguientes concentraciones: oligonucleótidos, 10 µM; el Cl<sub>2</sub>Mg, 25 mM; dNTPs, 2.5 mM cada uno; tampón 10X correspondiente a la enzima empleada; Taq Polimerasa, 5 uni/µl. En todos los casos se empleaba 1 µl de DNA genómico (0.1-0.3 µg/µl) como molde.

Fragmento	Apo3500	Prom.	E1	E2	E3	E4	E4-R3	I-4	E5	E6
(OLIGO) µl	(LOL) 3	(P-39) 4	(P-9) 3	(P-23) 4	(P-31) 4	(P-33) 4	(P-55) 5	(P-15) 4	(P-41) 4	(P-27) 3
(OLIGO) µl	(UOL) 3	(P-40) 4	(P-10) 3	(P-24) 4	(P-32) 4	(P-34) 4	(P-56) 5	(P-16) 4	(P-42) 4	(P-28) 3
Cl <sub>2</sub> Mg	3	4	2	3	4	3	3	2	4	3
dNTPS	2	4	3	4	3	4	3	3	4	3
10XTampón	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Taq	0.2	0.25	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.25	0.25
AGUA		28	31	29	29	29	28	31	28	30

Fragmento	E9	E11	E13	E14	E18-L	E18-H
(OLIGO) µl	(P-43) 4	(P-45) 4	(P-3) 4	(P-47) 4	(P-17) 3	(P-21) 3
(OLIGO) µl	(P-44) 4	(P-46) 4	(P-4) 4	(P-48) 4	(P-18) 3	(P-22) 3
Cl <sub>2</sub> Mg	4	4	3	5	2	3
dNTPS	4	4	3	4	3	2
10XTampón	5	5	5	5	5	5
Taq	0.25	0.25	0.2	0.2	0.2*	0.2*
AGUA	28	28	30	27		

Fragmento indica la región de DNA amplificada (ApoB3500 y distintas regiones del gen RLDL); entre paréntesis se indica el nombre de los oligonucleótidos empleados en cada amplificación; E18-L son los oligonucleótidos diseñados en el laboratorio para amplificar la región que contiene el polimorfismo NcoI y E18-H son los descritos por Humpries *et al.* (1993) para amplificar la misma región (\* indica que es importante utilizar Taq Polimerasa de Hytest).

**Tabla 4.** Ciclos de amplificación para los fragmentos estudiados en este trabajo.

FRAG.	Apo3500	Prom.	E1	E2	E3	E4	E4-R3	I-4	E5	E6
<b>Termociclador GeneE (Techne)</b>										
Paso inicial 94 °C durante 150 seg.										
	°C seg.	°C seg.	°C seg.	°C seg.	°C seg.	°C seg.	°C seg.	°C seg.	°C seg.	°C seg.
1	94—30	94—30	94—30	94—30	94—30	94—30	94—30	94—30	94—30	94—30
2	55—30	66—60	68—60	64—60	50—30	64—60	68—60	68—150	60—15	67—30
3	72—30				72—30	72—60			72—30	
Nº ciclos	35	35	40	35	35	35		35	35	25
4	72—300			72—300				72—300		
<b>Termociclador 480 (Perkin)</b>										
Paso inicial 94 °C durante 150 seg.										
	°C—Seg.	°C—Seg.	°C—Seg.	C—Seg.	°C—Seg.	°C—Seg.	°C—Seg.	°C—Seg.	°C—Seg.	°C—Seg.
1	94—30	94—30	94—30	94—30	94—30			94—30	94—30	94—30
2	55—30	66—60	68—60	64—60	55—30			71—150	60—15	67—30
3	72—30				72—30				72—30	
Nº ciclos	35	35	40	35	35			35	35	25
4	72—300			72—300				72—300		

1, 2 y 3 indican los pasos de cada ciclo que son repetidos tantas veces como indica el Nº de ciclos.  
4 indica la aplicación de un tiempo final de extensión.

**Tabla 4 (Continuación):** Ciclos de amplificación para los fragmentos estudiados en este trabajo.

FRAG.	E9	E11	E13	E14	E18-5'	E18-L	E18-H
<b>Termociclador GeneE (Techne)</b>							
Paso inicial 94° durante 150 seg.							
	°C—Seg.	°C—Seg.	°C—Seg.	°C—Seg.	°C—Seg.	°C—Seg.	°C—Seg.
1	94—30	94—30	94—30	94—30	94—30	94—30	94—30
2	60—15	60—15	66—60	60—15	64—60	69—105	64—135
3	72—30	72—30		72—30			
Nº ciclos	35	35	35	35	30	35	35
4						72—300	72—300
<b>Termociclador 480 (Perkin)</b>							
Paso inicial 94° durante 150 seg.							
	°C—Seg.	°C—Seg.	°C—Seg.	°C—Seg.	°C—Seg.	°C—Seg.	°C—Seg.
1	94—30	94—30	94—30	94—30	94—30	94—30	94—30
2	60—15	60—15	66—60	60—15	64—60	69—135	64—135
3	72—30	72—30		72—30			
Nº ciclos	35	35		35	30	35	35
4						72—300	72—300

1, 2 y 3 indican los pasos de cada ciclo que son repetidos tantas veces como indica el Nº de ciclos.  
4 indica la aplicación de un tiempo final de extensión.

### III.2.6. PCR Largo.

Para la amplificación de fragmentos mayores de 2 Kb se siguieron las condiciones descritas en el sistema "Expand Long Template Kit" (Boehringer Mannheim).

Los fragmentos amplificados, los oligonucleótidos y las condiciones de amplificación utilizadas están descritos en el Apartado V.3.4. (Resultados).

La verificación de las amplificaciones se realizó mediante la electroforesis, de 1 a 3 µl de la reacción, en geles del 0.6 % de agarosa y 1 x TEB. La visualización se realizó mediante tinción con bromuro de etidio.

### III.2.7. Análisis de Restricción de Productos de PCR.

Las digestiones de restricción se realizaron siguiendo las indicaciones de cada fabricante para cada enzima. Los sitios de restricción y los exones o intrones donde se localizan los diferentes RFLPs se pueden ver en la Fig. 5.

Una vez digeridos los fragmentos amplificados, se cargaron en geles de agarosa o bien en NuSieve-agarosa, de distintos porcentajes en función de los tamaños esperados (aumentando el porcentaje de NuSieve hasta el 2% y de agarosa hasta el 1%, para los fragmentos de 50-100 pb hasta 300 pb). La visualización de los fragmentos de DNA se realizó mediante tinción con bromuro de etidio.

### III.2.8. Análisis Mediante SSCPS.

El análisis de los exones y del promotor del gen RLDL, así como de la región donde se localiza la mutación ApoB<sub>3500</sub> del gen ApoB, se realizó con dos objetivos:

- Detectar los polimorfismos de secuencia que se encuentran en algunos de estos fragmentos de DNA. Para ello, se optimizaron las condiciones en las cuales se reconocían fácilmente dichos polimorfismos (estas condiciones se describen en Resultados en el Apartado IV.3.1., Pag. 52).



- Detectar la presencia de mutaciones. Para ello, se realizaron análisis y electroforesis en diferentes condiciones para cada exón (las condiciones empleadas para el análisis de cada uno de los fragmentos analizados se describen en Resultados en el Apartado IV.5.3., Pag. 118.

El método utilizado para el análisis de SSCPs fue el siguiente:

- Mezclar 4µl de tampón de carga (1% azul de bromofenol y xilencianol, 10 mM EDTA en formamida desionizada) y 1-2 µl de producto amplificado.
- Desnaturalizar 2 minutos a 95 °C y depositar en hielo-agua rápidamente.
- Cargar 1-2 µl de la mezcla en el gel que, previamente, se ha refrigerado durante un mínimo de 15 minutos a la temperatura deseada para la electroforesis.
- Correr el gel a voltaje constante (entre 300 y 400 voltios).

Una vez concluida la electroforesis, se tiñe el gel con plata siguiendo básicamente el procedimiento descrito por Beidler *et al.* (1982), si bien, este protocolo fue abreviado considerablemente quedando de la siguiente forma:

- Sumergir 5 minutos el gel en 10% etanol (v/v).
- Sumergir 3 minutos en ácido nítrico 1% (v/v).
- Incubar, en agitación, 20 minutos en nitrato de plata 2% (p/v).
- Lavar con agua durante 30 segundos dos veces.
- Lavar 30 segundos con el revelador, consistente en una solución acuosa con 2.5% (p/v) de carbonato cálcico y 0.45 % (v/v) de formaldehido estabilizado (37% formaldehido estabilizado con 10% metanol), retirarlo cuando tome color marrón.
- Añadir, de nuevo, revelador y dejar actuar hasta la intensidad deseada.
- Detener la reacción con 5% ácido acético, lavando una vez durante 5 minutos.
- Lavar con agua varias veces.

Los geles conservaron en agua o bien secados mediante calor entre papeles de celofán. La reproducción de estos geles se realizó mediante "Electrophoresis Duplicating Paper" (Kodak), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### III.2.9. Métodos Estadísticos.

Las frecuencias alélicas de cada RFLP se obtuvieron por conteo mediante la fórmula:

$$p = \frac{2AA + AB}{N} \qquad q = \frac{2BB + AB}{N}$$

siendo *AA* y *BB* el número de homocigotos para cada alelo, *AB* el número de heterocigotos y *N* el número de individuos.

Para cada RFLP se comprobó que las frecuencias genotípicas obtenidas tanto en la muestra Control como en la HF estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg. En el equilibrio de Hardy-Weinberg, las frecuencias genotípicas permanecen constantes de generación en generación, en ausencia de mutación, migración y deriva. Para un locus con dos alelos, y suponiendo que la frecuencia de alelo es la misma en machos y hembras y que el apareamiento es al azar, las frecuencias genotípicas, siendo *p* y *q* las frecuencias alélicas, vienen dadas por

$$AA = p^2 \qquad BB = q^2 \qquad AB = 2pq$$



por lo tanto, el número de homocigotos  $AA$  es  $p^2N$ , siendo  $N$  el tamaño de la muestra. De la misma forma, el número de heterocigotos  $AB$  y de homocigotos  $BB$  es  $2pqN$  y  $q^2N$ , respectivamente.

Para comprobar que las frecuencias genotípicas obtenidas en nuestras muestras cumplieran el equilibrio de Hardy-Weinberg se utilizó un test  $\chi^2$  con  $n-1$  grados de libertad, siendo  $n$  el número de alelos, de la siguiente forma:

observados	$AA$	$AB$	$BB$
esperados	$p^2N$	$2pqN$	$q^2N$

y donde 
$$\chi^2 = \sum \frac{(Obs - Esp)^2}{Esp}$$

para 1 grado de libertad y  $P < 0.05$ ,  $\chi^2_{1} = 3.84$  luego si para un RFLP  $\chi^2 > \chi^2_{1}$  concluimos que sus frecuencias génicas no están en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tras comprobar que las frecuencias génicas de cada RFLP seguían el equilibrio de Hardy-Weinberg se procedió a verificar si había diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de cada RFLP para las muestras Control y HF. Para ello se utilizó un test de contingencia  $\chi^2$  con  $n-1$  grados de libertad, siendo  $N$  el número de alelos del RFLP, de la siguiente manera:

Observados		A	B	totales	Esperados		A	B
	control	$X_{11}$	$X_{12}$	$Y_1$		control	$(Z_1/N) \cdot Y_1$	$(Z_2/N) \cdot Y_1$
	FH	$X_{21}$	$X_{22}$	$Y_2$		FH	$(Z_1/N) \cdot Y_2$	$(Z_2/N) \cdot Y_2$
	totales	$Z_1$	$Z_2$	$N$				

si para un RFLP  $\chi^2 > \chi^2_{1}$  (para 1 grado de libertad y  $P < 0.05$ ,  $\chi^2_{1} = 3.84$ ) concluimos que las frecuencias alélicas de las muestras control y HF difieren de forma significativa. Este mismo procedimiento se utilizó para averiguar si existen diferencias significativas entre nuestra población y otras poblaciones descritas en la literatura.

Tras el test de contingencia de cada RFLP para las muestras Control y HF, se calculó el valor informativo individual de cada marcador, o valor PIC, así como la heterocigosidad que presenta. También fue calculado el desequilibrio de ligamiento tomando los marcadores de 2 en 2. Tanto el valor PIC como el desequilibrio de ligamiento dan una idea del grado de información que proporciona un marcador y, por lo tanto, de la utilidad que tiene ese marcador en el análisis de ligamiento del gen del RLDL.

Hay dos medidas del grado de informarividad de los marcadores en una población que son de uso común: el valor PIC y la heterocigosidad. El valor PIC, o contenido de información de un polimorfismo, viene dado por la fórmula (Botstein *et al.*, 1980):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 q_j^2$$

donde  $p_i$  es la frecuencia alélica del alelo  $i$ -ésimo. La fórmula viene derivada de la situación dada en una familia nuclear, con un alelo defectuoso dominante y marcadores codominantes. El valor PIC es la probabilidad de que, conocido el genotipo de los miembros de una familia, se pueda deducir cuál de los dos alelos ha recibido la descendencia del progenitor afecto.

La heterocigosidad, o probabilidad de que un individuo de la población sea heterocigoto para un marcador y, por lo tanto, potencialmente informativo para el análisis, es

$$H = 1 - \sum p_i^2$$

El desequilibrio de ligamiento existente entre los marcadores de una población se calculó según el método de Chakravarti & Buetow (1985).

El orden en que debían escogerse los RFLPs del gen RLDL para obtener el mayor grado de información empleando el menor número de polimorfismos y, por tanto, el menor trabajo posible, se determinó utilizando el algoritmo de Chakravarti & Buetow (1985). Para ello, se construyeron todos los haplotipos independientes presentes en la muestra (19 familias de probandos con diagnóstico clínico de HF, con un total de 180 miembros), tanto en individuos afectados como en individuos clínicamente sanos. En la determinación de haplotipos defectuosos, el criterio seguido fue la presencia del haplotipo en el probando de cada familia y cosegregación del haplotipo en los demás individuos afectados. Los haplotipos sanos se determinaron en base a su presencia bien en los individuos no afectados en la familia o en los individuos afectados cuando éstos tenían hijos sanos. La aplicación del algoritmo mencionado se realizó con los haplotipos sanos independientes encontrados.

En el cálculo del orden de máxima informatividad el primer marcador será el que tenga mayor PIC individual; para establecer el marcador que ocupará el segundo lugar se determinan los haplotipos formados por el primer marcador y el resto de marcadores analizados, tomando éstos individualmente y calculándose su frecuencia y valor PIC. El marcador escogido en segundo lugar será el que esté presente en la pareja con mayor valor PIC. Para establecer el marcador que ocupará el tercer lugar se repite la operación fijando los marcadores ya seleccionados. Se determinan los haplotipos formados por el resto de marcadores agrupados individualmente con los dos primeros y el resto de los polimorfismos formando grupos de tres, calculándose la frecuencia y valor PIC. El tercer marcador será el que esté presente en el grupo de tres con mayor valor PIC. Esta operación es repetida con los  $n$  marcadores, determinándose finalmente el orden de informatividad que presentan los distintos marcadores del gen del RLDL. Para realizar estas operaciones se ha diseñado un programa de Excel 5.0 (Microsoft) en nuestro laboratorio que facilita el proceso. El proceso para calcular el orden de los polimorfismos en función de la heterocigosidad es el mismo que el empleado para calcular el PIC, pero calculando la heterocigosidad en su lugar.

### **III.2.10. Obtención de DNA para Secuenciación.**

#### **III.2.10.1. Amplificación de DNA para Secuenciar.**

La secuenciación se realizó a partir de productos de PCR procedentes de la amplificación del DNA genómico de cada individuo o a partir de la reamplificación de bandas de SSCP, este último paso sirve para obtener un amplificado que contiene el alelo mutado exclusivamente. Para la reamplificación de bandas de SSCP primero se cortaban éstas de los geles de SSCP y se incubaban con 20  $\mu$ l de agua durante 4 horas a 42 °C y después se añadía 1  $\mu$ l de esta solución por cada 50  $\mu$ l de mezcla para la amplificación del exón.

#### **III.2.10.2. Purificación del DNA.**

La reacción de secuenciación precisa DNA molde de gran pureza y libre de oligonucleótidos y dNTPs. Para obtener el DNA en estas condiciones se utilizaron diferentes protocolos, según la calidad original de cada producto amplificado, estos procedimientos fueron:

A- Cuando las amplificaciones rendían solamente el fragmento esperado, se precipitaba el fragmento según el siguiente protocolo:

- Añadir 100 µl de cloroformo y agitar vigorosamente.
- Centrifugar a 13000 rpm durante 3' y temperatura ambiente.
- Recoger el sobrenadante y depositar en un tubo de 1.5 ml.
- Añadir 0.4 volúmenes de acetato amónico 10 M.
- Añadir 2 volúmenes de isopropanol.
- Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12-13000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Decantar el sobrenadante.
- Añadir un 1 ml de etanol al 70 % a -20 ° C.
- Centrifugar a 12-13000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Decantar el sobrenadante y secar con vacío.
- Resuspender el DNA en un volumen de agua entre 1/2 y 1/4 del volumen inicial.

B- Si las amplificaciones producen más de una banda o existe "smear" en la amplificación.

- Primero se separan las bandas mediante electroforesis en un gel apropiado.
- Se corta la banda correspondiente al fragmento que deseamos secuenciar, recuperando el mínimo posible del gel.
- Se extrae el DNA de la agarosa, para ello se utilizaron dos sistemas comerciales para la obtención de las bandas (siguiendo las instrucciones de los fabricantes), "GeneClean II" y "Qiaquick Band Extraction Kit" (Qiagen), y un sistema manual de extracción de agarosas de bajo punto de fusión (Sambrook *et al.* 1989).

### III.2.11. Secuenciación.

Las condiciones de las reacciones de secuenciación y las condiciones de electroforesis utilizadas se encuentran explicadas en Resultados, Apartado IV.5.2.2.

#### III.2.11.1. Sistemas Manuales.

Para realizar la secuenciación de nuestras muestras se experimentó con los siguientes procedimientos manuales de secuenciación:

A- Mediante PCR y tinción de Plata, utilizando el sistema "DNA Silver Sequencing Kit" de Promega con ligeras modificaciones y al cual aplicamos el protocolo de tinción con plata utilizado para visualizar los SSCP (ver Apartado III.2.8.).

B- Mediante PCR y con oligonucleótidos marcados en 5' con digoxigenina; para lo cual se empleó "DIG DNA Sequencing Kit" de Boehringer Mannheim (siguiendo las indicaciones del fabricante con ligeras modificaciones). Con este sistema se utilizaron oligonucleótidos marcados con digoxigenina por Boehringer Mannheim y con el extremo 5'-amino, a los cuales incorporábamos una molécula de digoxigenina unida mediante un brazo carbonado.

En la reacción de marcaje del oligo se hicieron reaccionar 5 nmoles de oligo con 0.3 mg de DIMAEH (Boehringer Mannheim), siguiendo las instrucciones del fabricante pero sin realizar la purificación del oligo marcado mediante HPLC. Los resultados obtenidos con los oligos marcados de



esta forma fueron semejantes a los obtenidos con los oligos marcados por quienes habían sintetizado el oligo y posteriormente lo habían purificado por HPLC.

Tras la reacción de secuenciación, procedíamos con la electroforesis y transferencia a una membrana (según las indicaciones del fabricante del sistema de secuenciación) donde eran detectados mediante “DIG DNA Luminescent Kit” de Boehringer Mannheim.

### **III.2.11.2. Sistema Semiautomático.**

En este sistema la única diferencia respecto al anterior radica en que en lugar de transferir el DNA desde el gel a la membrana de forma manual, la cubeta de electroforesis es quien realiza este proceso deslizándose una membrana en la parte inferior del gel, siendo el procedimiento de secuenciación utilizado el descrito anteriormente.

Para esta secuenciación, utilicé el sistema semiautomático “GATC 1500-System” (GATC), en el cual se realizaban las electroforesis y la transferencia de los fragmentos de DNA (siguiendo las instrucciones del fabricante) a membranas “Direct Blotting Membranes” (GATC). La detección del marcaje, y por tanto del DNA, se realizó mediante el sistema “DIG DNA Luminescent Kit” y la exposición a autoradiografías “X-OMAT S Film”(Kodak).

### **III.2.11.3. Sistema Automático.**

La secuenciación automática fue llevada a cabo utilizando el secuenciador automático “ALF DNA Sequencer” de Pharmacia Biotech.

La composición de las soluciones utilizadas, reactivos, la mezcla de reacción y las condiciones de secuenciación se encuentran detalladas en Resultados, Apartado V.5.2.2.



# ***RESULTADOS***



### IV. RESULTADOS.

El diagnóstico genético de la HF en la población española requiere conocer las combinaciones de RFLPs más informativas e identificar las mutaciones que originan esta enfermedad en nuestra población, ya que no ha sido previamente estudiada. Los sistemas experimentales que se utilicen, para realizar tal diagnóstico, deben permitir la obtención de resultados inequívocos de forma rápida y ser lo más inocuos posible. Por ello en esta Tesis, además de estudiar los RFLPs del gen RLDL y las mutaciones causantes HF en España, se ha puesto un énfasis especial en el diseño de sistemas experimentales que reúnan las condiciones citadas. Para el desarrollo del trabajo hemos seguido el esquema indicado en la Fig. 6.

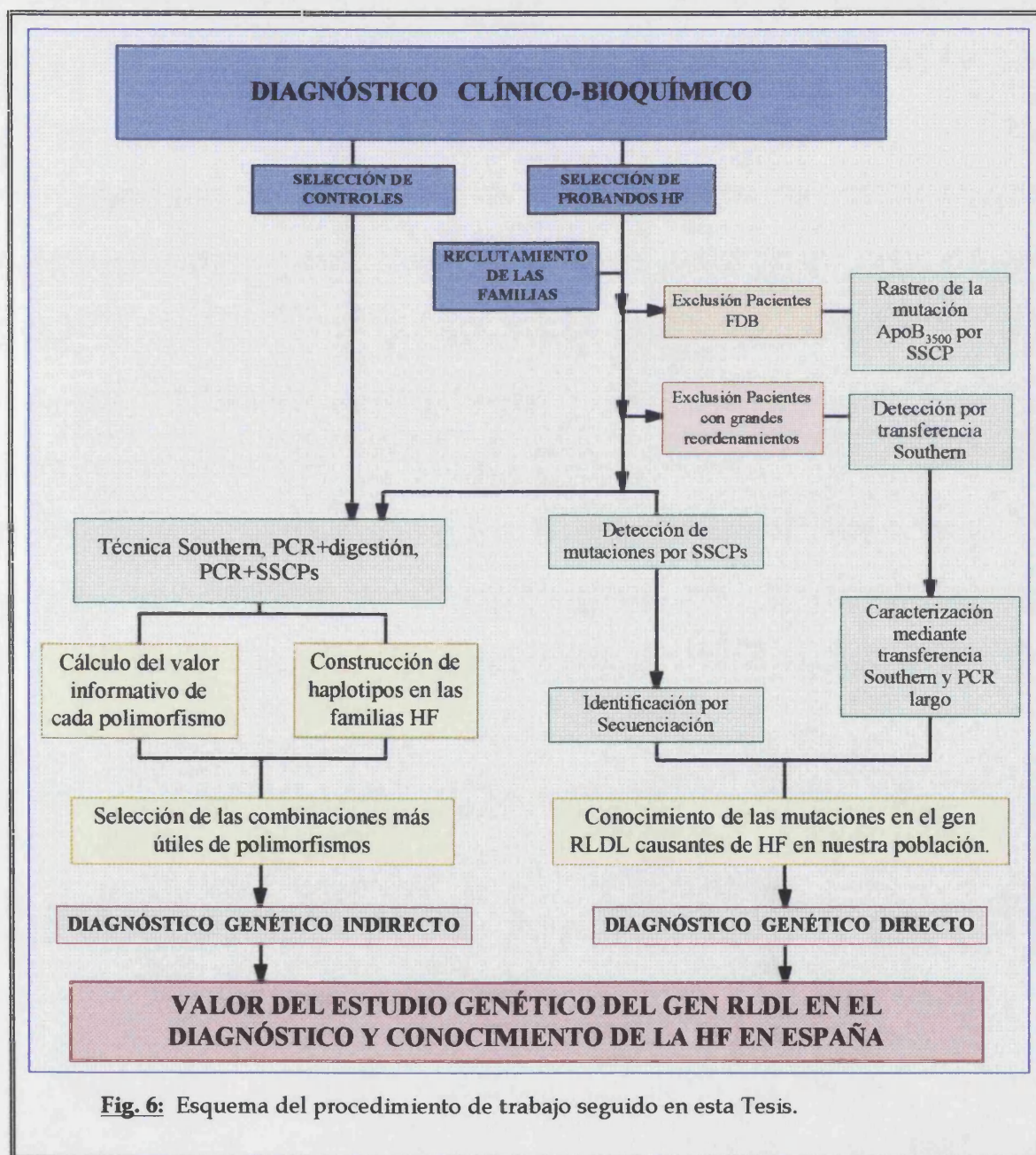


Fig. 6: Esquema del procedimiento de trabajo seguido en esta Tesis.



## RESULTADOS

---

**IV.1. CRIBADO DE PACIENTES PORTADORES DE LA MUTACIÓN ApoB<sub>3500</sub> EN LA MUESTRA HF.**

El diagnóstico clínico-bioquímico empleado para diagnosticar HF no permite la discriminación entre pacientes DFB y pacientes HF, ya que los síntomas y signos que presentan ambas enfermedades son muy similares. En varias poblaciones estudiadas se ha encontrado que hasta un 5% de los pacientes diagnosticados como HF son realmente portadores de la mutación ApoB<sub>3500</sub> (Schuster *et al.*, 1990; Myant *et al.*, 1991; Defesche *et al.*, 1993). En consecuencia, a la hora de analizar las frecuencias de los polimorfismos en el gen RLDL en población española y antes de acometer el análisis del gen RLDL en familias HF es importante, para trabajar rigurosamente, que no haya portadores de ApoB<sub>3500</sub> en nuestra muestra.

El rastreo de la mutación ApoB<sub>3500</sub> se realizó mediante análisis de SSCPs de la región del gen ApoB donde se localiza esta mutación. Para ello, se amplificó un fragmento de 340 pb del exón 26 del gen que codifica ApoB delimitado por los oligos LOL y UOL (Schuster *et al.*, 1992) (ver Materiales y Métodos, III.2.5, Pag. 34), utilizando como control positivo el DNA de un heterocigoto para ApoB<sub>3500</sub> cedido por Dr. H. Funke.

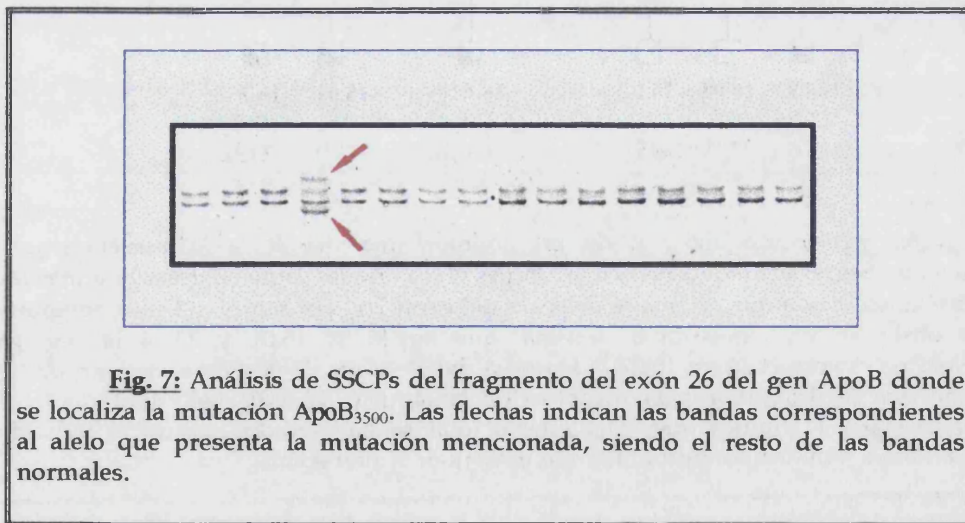
El fragmento anteriormente mencionado se analizó bajo diferentes condiciones de electroforesis para determinar si nuestros pacientes presentaban la mutación ApoB<sub>3500</sub> u otras mutaciones en la región estudiada. Las condiciones de electroforesis que permitían diferenciar fácilmente entre las bandas correspondientes a la mutación y las bandas normales (ver Fig. 7) fueron:

Composición del gel

12 % acrilamida 29:1  
5 % glicerol  
1 X TEB

Condiciones de electroforesis

350 V (constantes) durante 3 horas  
8 °C  
1 X TEB

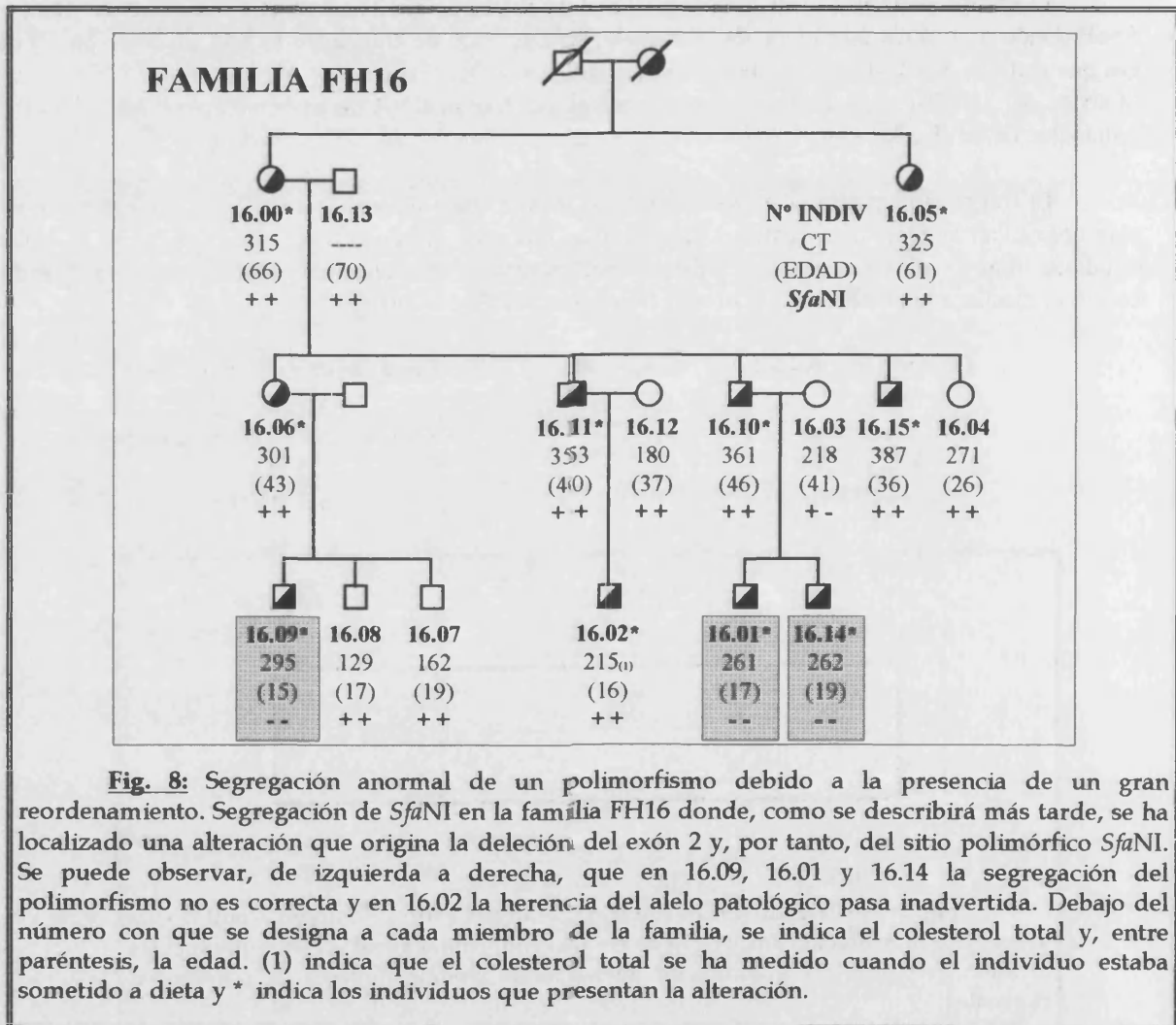


**Fig. 7:** Análisis de SSCPs del fragmento del exón 26 del gen ApoB donde se localiza la mutación ApoB<sub>3500</sub>. Las flechas indican las bandas correspondientes al alelo que presenta la mutación mencionada, siendo el resto de las bandas normales.

En 58 pacientes HF y en 6 individuos de sus familias (que no son consanguíneos de los probandos y de los que no se tiene diagnóstico de HF pero presentan niveles elevados de colesterol, mayor de 250 mg/dl), no se encontró la mutación ApoB<sub>3500</sub>, ni se detectaron otras mutaciones en la zona del exón 26 de ApoB seleccionada.

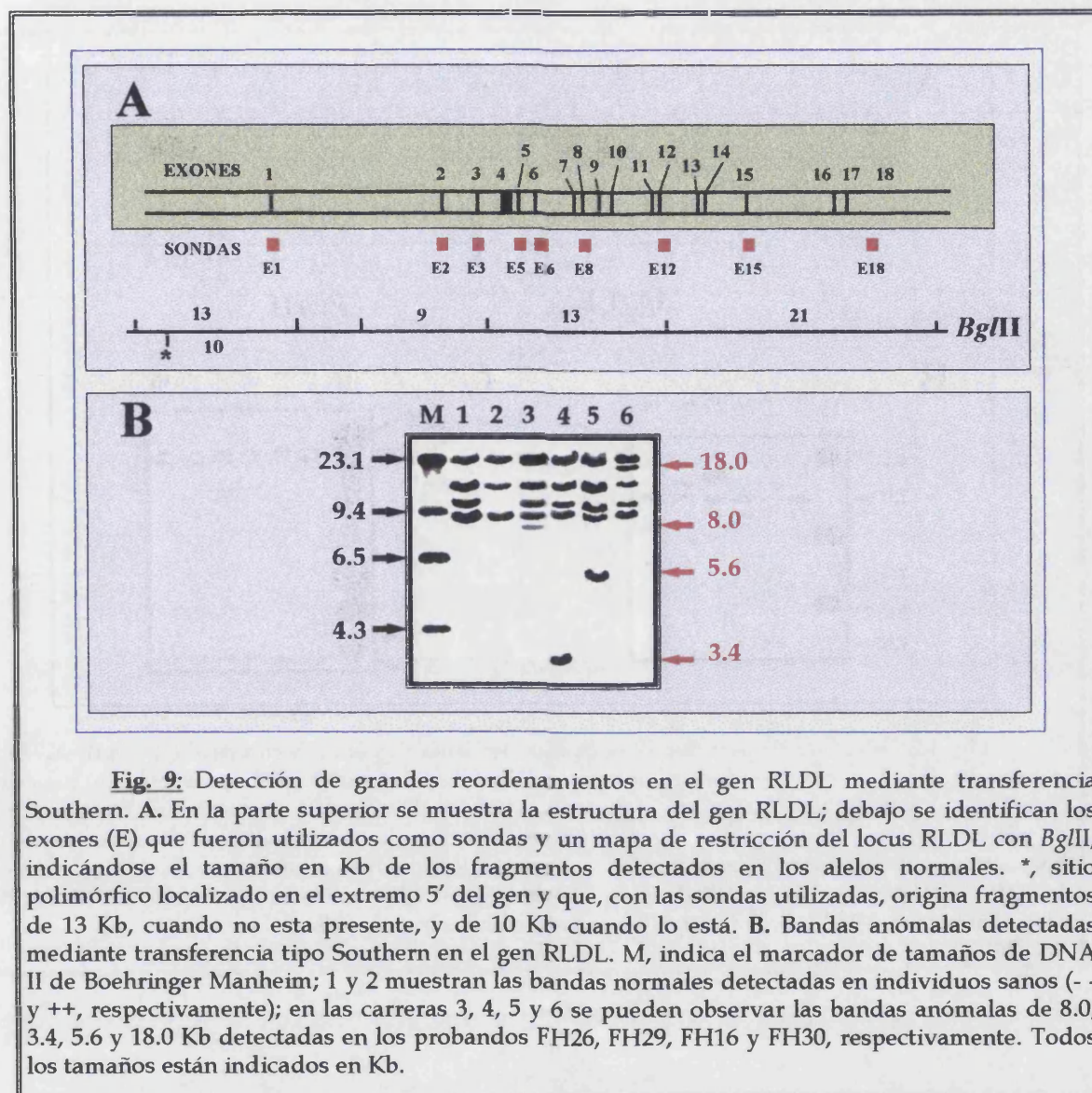
**IV.2. CRIBADO DE PACIENTES HF PORTADORES DE GRANDES ALTERACIONES EN EL GEN RLDL.**

Las grandes alteraciones que afectan al gen RLDL suponen entre un 5 y un 10% de los casos HF, en otras poblaciones estudiadas (Südhof *et al.*, 1985; Sun *et al.*, 1992). Este tipo de mutaciones implica la deleción o duplicación de algunos de los polimorfismos cuya frecuencia se pretende averiguar en este trabajo. La presencia de este tipo de alteraciones en las familias, donde se realiza el estudio de segregación del gen RLDL mediante la determinación de haplotipos, podría inducir a error en el diagnóstico de la enfermedad e incluso se podrían obtener resultados "imposibles" en la segregación de los haplotipos en estas familias (ver Fig. 8). Por tanto, para trabajar rigurosamente y para evitar posibles errores es importante, en primer lugar, detectar los portadores de grandes reordenamientos en la muestra que se va analizar.

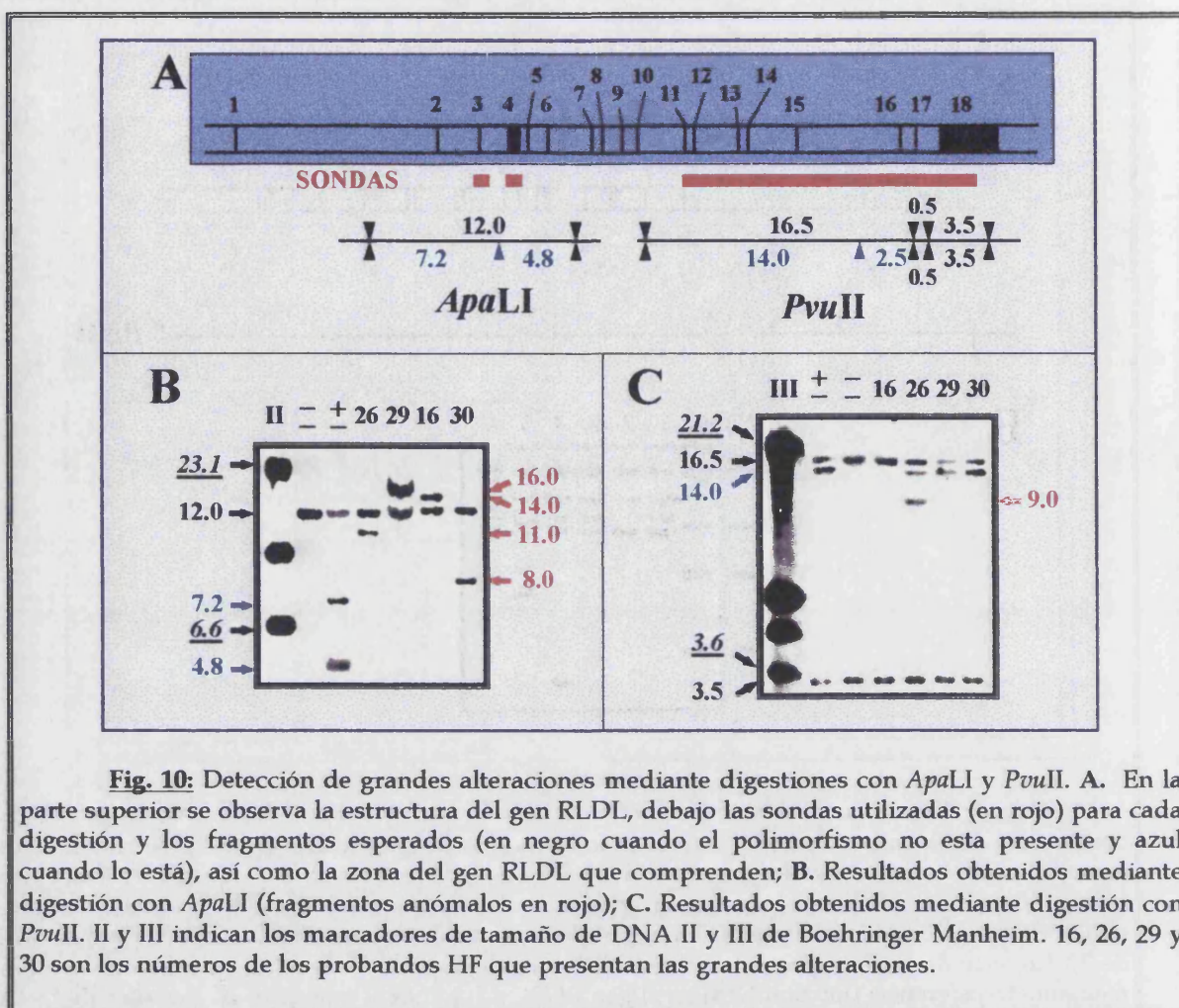


La detección de las grandes alteraciones, en los pacientes estudiados, se realizó mediante transferencia Southern, utilizando la digestión Bg/II del DNA genómico y una mezcla de los exones 1, 2, 3, 5, 6, 8, 12, 15 y 18, marcados con digoxigenina, como sondas (ver Apartado III.2.3., Pag. 33). La digestión Bg/II proporciona fragmentos de restricción que cubren todo el gen al ser hibridados con las sondas propuestas (ver Fig.9.A).





Se detectaron bandas anómalas en 4 probandos (FH16, FH26, FH29 y FH30) de los 58 analizados. Se verificó que estas bandas correspondían a alteraciones en el gen y no a alteraciones en los sitios de restricción mediante digestiones del DNA genómico con *Apa*LI y *Pvu*II e hibridación con diferentes sondas; estas condiciones permitieron observar fragmentos anómalos en estos individuos (ver Fig. 10) y localizar aproximadamente la mutación; así, pudimos deducir que FH16, FH29 y FH30 tenían alteraciones en la mitad 5' del gen RLDL mientras que FH26 era portador de una alteración que afectaba a gran parte del mismo pues se detectaban fragmentos anómalos tanto con sondas de la región 5' como de la región 3' del gen. Posteriormente, estas alteraciones fueron caracterizadas más extensamente utilizando diversas digestiones del DNA genómico con otras enzimas y amplificación con PCR largo (ver Apartado IV.5.1., Pag. 102).



### IV.3. DIAGNÓSTICO GENÉTICO INDIRECTO.

En el diagnóstico genético indirecto, como ya se ha indicado, son útiles aquellos polimorfismos que presentan un PIC y una heterozigosidad elevados y que, además, no se encuentran en desequilibrio de ligamiento entre si. El conocimiento y la utilización de los polimorfismos de mayor informatividad permite realizar el diagnóstico indirecto de forma más rápida (Chakravarti & Buetow, 1985), al ser necesario el uso de un menor número de polimorfismos.

Previamente a este trabajo no se tenían datos sobre la frecuencia, heterozigosidad, valor PIC y desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos localizados en el *locus* RLDL en población española; por tanto, resultaba interesante analizar qué polimorfismos podían ser más útiles para realizar el diagnóstico genético indirecto en nuestra población y comparar los datos de nuestra población con los publicados para otras poblaciones con el fin de aportar información sobre el gen RLDL y su evolución (Chaves *et al.*, 1996; Puig *et al.*, 1996).

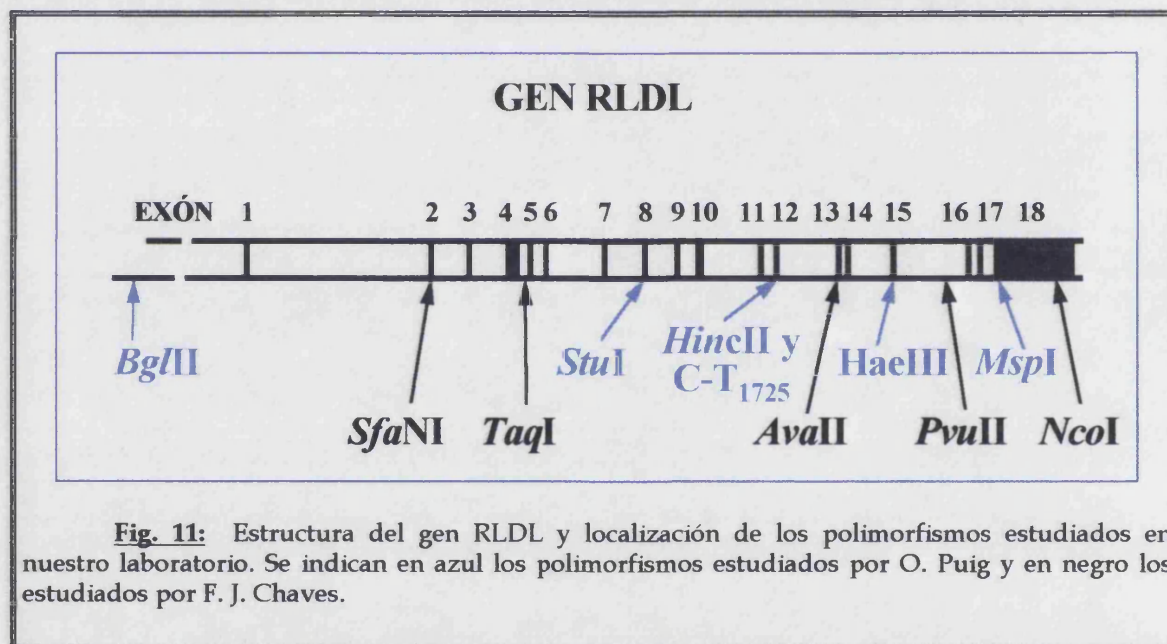
En este apartado se exponen los resultados obtenidos al analizar diferentes polimorfismos del gen RLDL y se describen los procedimientos más relevantes e innovadores que hemos desarrollado y optimizado para dicho análisis.



### IV.3.1. Polimorfismos del Gen RLDL y Metodología para su Estudio.

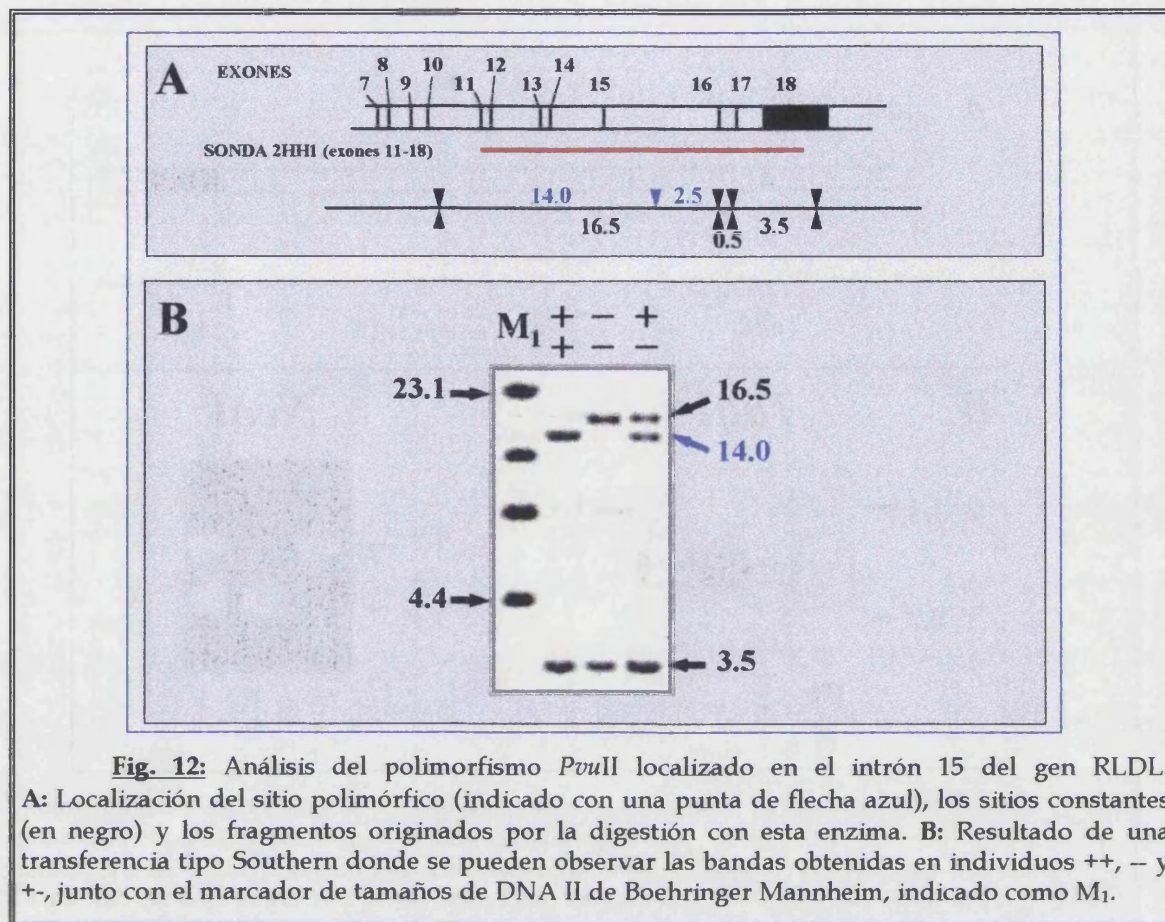
El uso de polimorfismos de DNA para realizar un diagnóstico familiar precisa: un estudio previo de éstos para determinar el grado de información que ofrecen (dependiente de su frecuencia y del desequilibrio de ligamiento existente entre ellos) y el diseño de métodos para su análisis que proporcionen resultados totalmente fiables. Además, es deseable que estos procedimientos proporcionen una gran cantidad de información utilizando el mínimo número de experimentos, requieran el mínimo tiempo y trabajo posible y simplifiquen al máximo la realización de este trabajo.

El análisis de los polimorfismos se realizó en los probandos y familias HF que no presentaron grandes alteraciones y en los controles reclutados para este estudio. En este punto (dentro de la distribución de trabajo en nuestro grupo de investigación) me encargué del análisis de los polimorfismos *Sfa*NI, *Taq*I, *Ava*II, *Pvu*II y *Nco*I, localizados en el exón 2, intrón 4, exón 13, intrón 15 y exón 18, respectivamente. Estos polimorfismos forman parte de un estudio más completo realizado en nuestro laboratorio utilizando otros cinco polimorfismos, cuyo nombre y localización puede verse en la Fig. 11.



El polimorfismo *Pvu*II se estudió mediante transferencia Southern, hibridando el DNA genómico digerido con *Pvu*II con la sonda 2HH1, marcada con digoxigenina, y detección luminiscente en placa fotográfica. La sonda 2HH1 comprende los exones del 11 al 18 del gen RLDL y permite detectar un fragmento constante de 3.5 Kb y otro fragmento de 16.5 Kb cuando no está presente el sitio *Pvu*II que se fracciona en dos de 14.0 y 2.5 Kb cuando sí lo está (ver Fig. 12).

Los sitios *Taq*I y *Nco*I se estudiaron mediante amplificación por PCR del intrón 4 y de parte de la región no traducida del exón 18, respectivamente, seguida de digestión con la enzima correspondiente (Fig. 13).



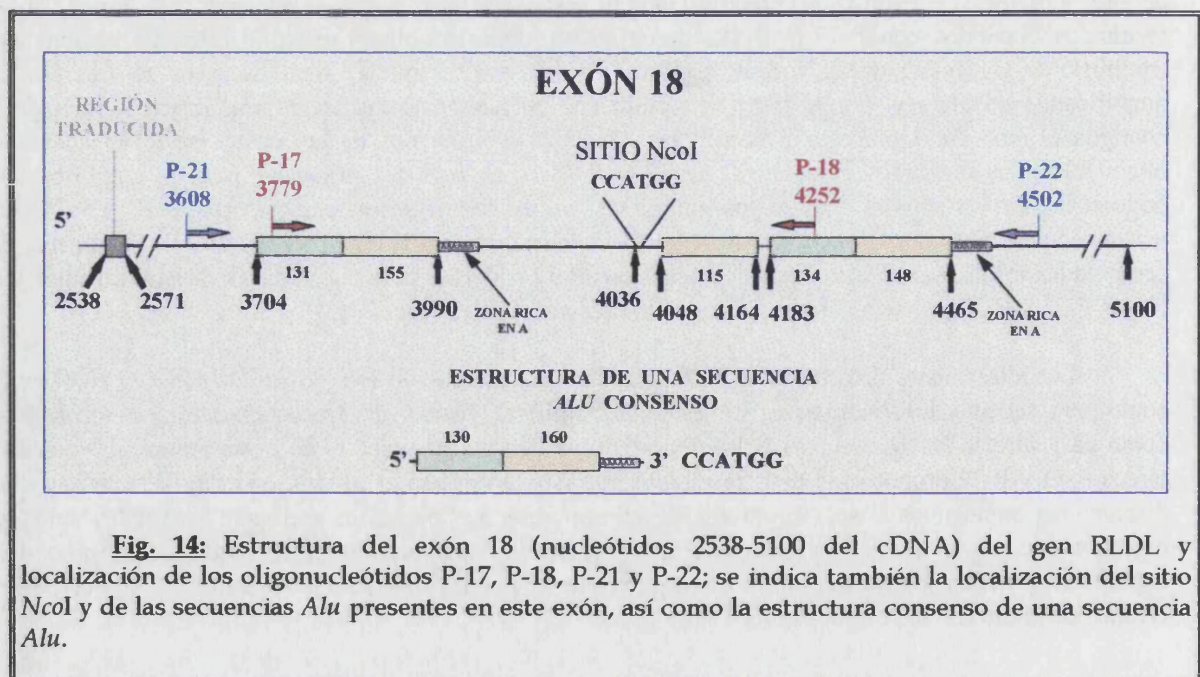
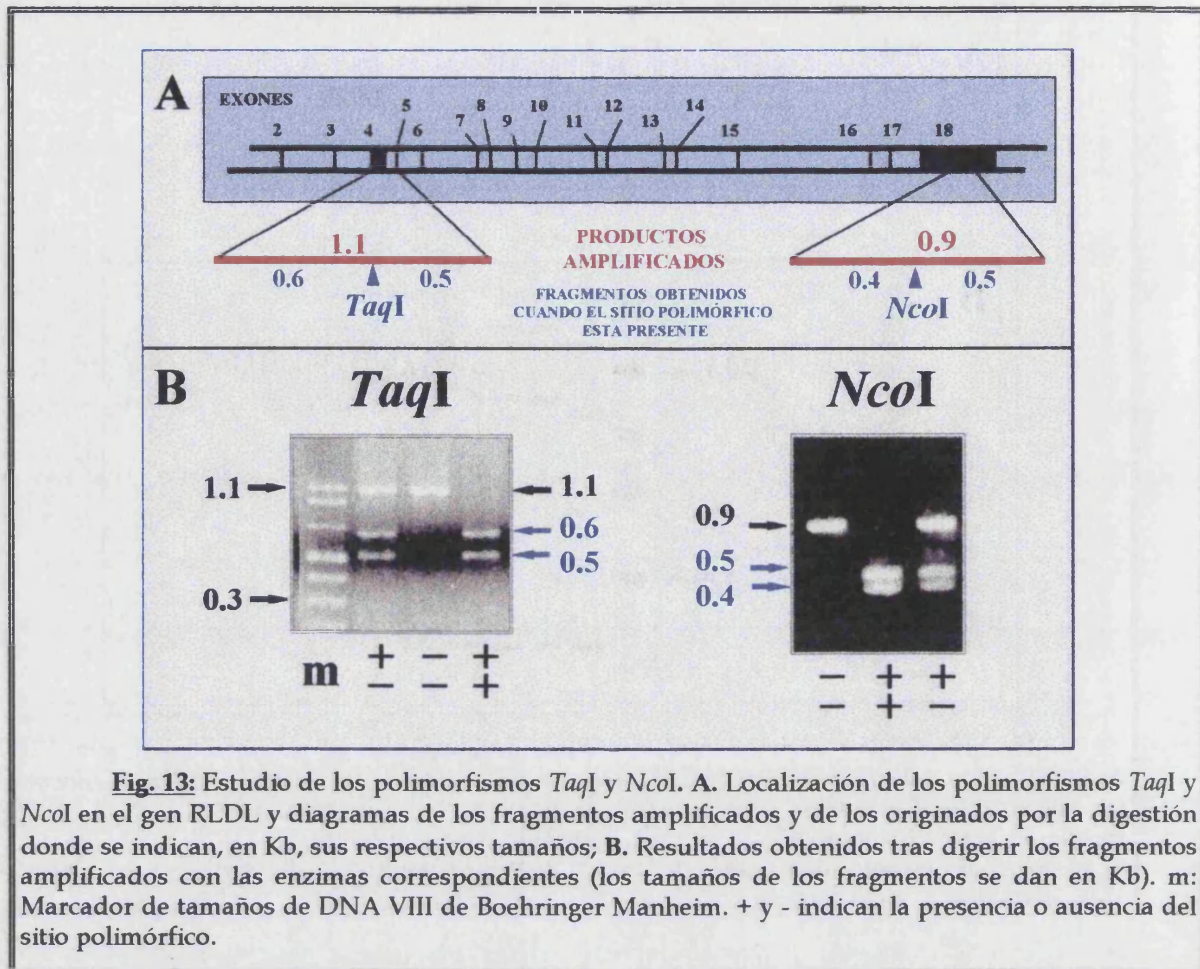
**Fig. 12:** Análisis del polimorfismo *PvuII* localizado en el intrón 15 del gen RLDL.

**A:** Localización del sitio polimórfico (indicado con una punta de flecha azul), los sitios constantes (en negro) y los fragmentos originados por la digestión con esta enzima. **B:** Resultado de una transferencia tipo Southern donde se pueden observar las bandas obtenidas en individuos ++, -- y +/-, junto con el marcador de tamaños de DNA II de Boehringer Mannheim, indicado como M<sub>1</sub>.

Previamente al estudio realizado del polimorfismo *NcoI* mediante amplificación con los oligonucleótidos P-21 y P-22, se realizó un estudio con los oligonucleótidos P-17 y P-18; la localización de estos 4 oligos en el exón 18 así como del sitio de restricción *NcoI* se puede observar en la Fig. 14. Los resultados obtenidos con P-17 y P-18 fueron desestimados al observarse que éstos no estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que, pensamos, podía indicar que en algunos casos sólo se estaba amplificando un alelo y, por lo tanto, detectábamos un número excesivo de homocigotos. La región contigua al sitio *NcoI* presenta 3 secuencias *Alu* (Fig. 14), en dos de las cuales se localizaban los oligonucleótidos utilizados inicialmente (P-17 y P-18). Las regiones utilizadas para la amplificación podrían incluir variaciones que, en los portadores, impedirían el reconocimiento por P-17 ó P-18; de hecho se ha descrito la presencia de variantes alélicas en esta región (Orita *et al.*, 1990). Finalmente, y como ya hemos dicho, desestimamos el análisis con P-17 y P-18 y para el estudio de *NcoI* utilizamos los oligos P-21 y P-22 que se localizan fuera de las regiones *Alu* (ver Fig. 14).

Las alteraciones detectadas en las secuencias *Alu* aunque no eran lo suficientemente frecuentes como para ser muy informativas en los estudios familiares, tenían una frecuencia suficientemente alta como para alterar las frecuencias del polimorfismo de forma apreciable. El posterior estudio con los oligos P-21 y P-22 proporcionó unos resultados que sí se ajustaban al equilibrio Hardy-Weinberg y que discrepaban en algunos casos, como era de esperar, con los obtenidos mediante la amplificación y digestión iniciales (el número total de alelos que presentan estas alteraciones no se puede conocer con los experimentos realizados, ya que en los homocigotos no se puede diferenciar entre un resultado correcto o erróneo obtenido con los oligos P-17 y P-18).





Inicialmente, el estudio del polimorfismo *AvaII* se realizó mediante amplificación por PCR y restricción con la enzima *AvaII* (ver Fig.15, panel C). A lo largo del estudio se observó que, en ocasiones, se producían digestiones parciales de los productos amplificados, pese a dejar las digestiones más de 16 horas y con exceso de enzima. Este problema disminuye la fiabilidad de esta técnica y, por tanto, del diagnóstico familiar realizado mediante su utilización. Como consecuencia, se decidió buscar las condiciones para detectar este polimorfismo, y posteriormente *SfaNI*, mediante análisis de SSCP (ver Fig. 15, panel B).

El estudio de *AvaII* y *SfaNI* se realizó, finalmente, mediante amplificación por PCR y análisis de SSCPs (previa comparación de los patrones de bandas de SSCP con los resultados obtenidos por digestión con la enzima correspondiente de cada fragmento amplificado). Los fragmentos se amplificaron según las condiciones dadas en el Apartado III.2.5 y el análisis de SSCP se realizó bajo las siguientes condiciones de electroforesis:

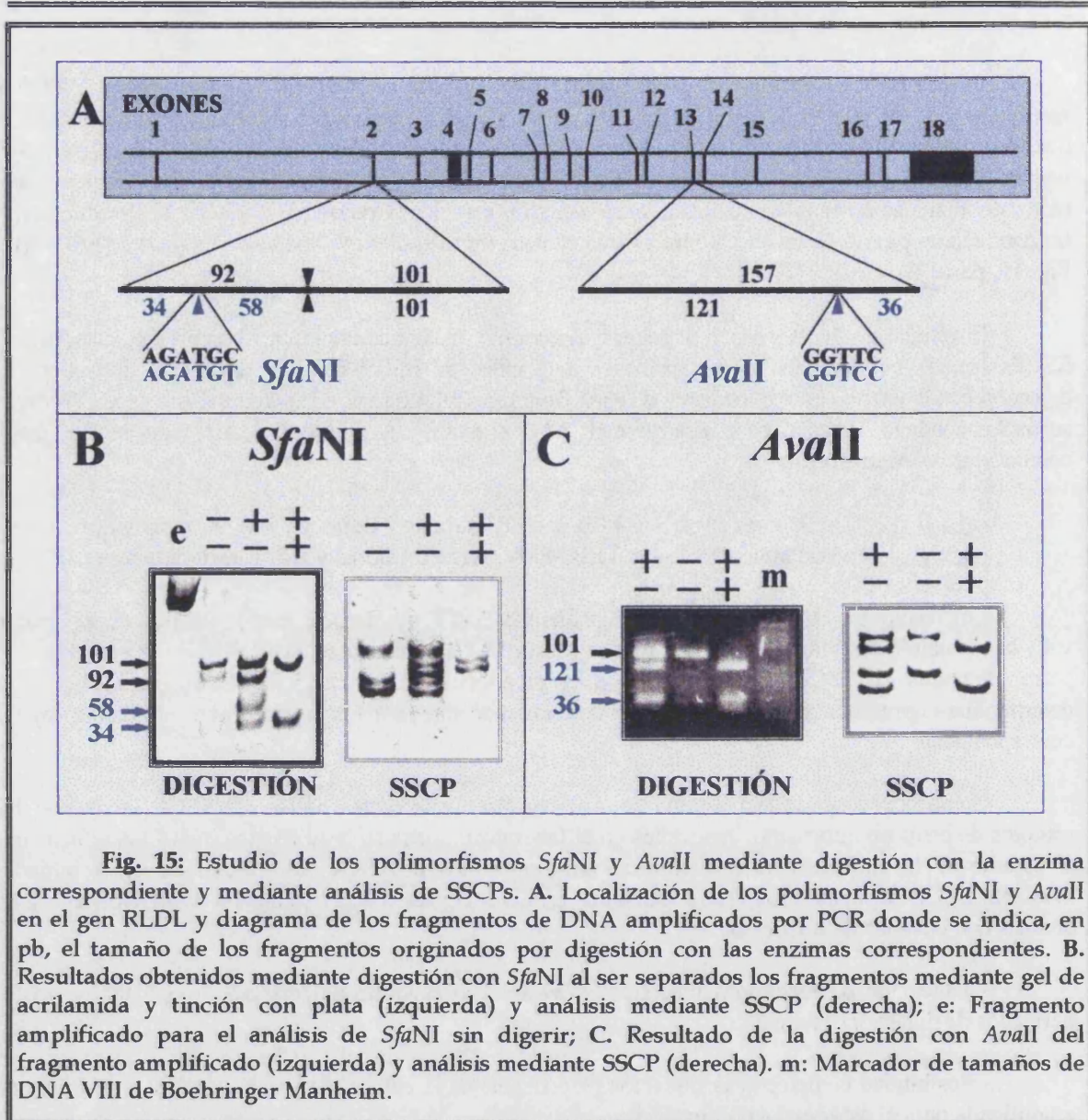
- *AvaII*: 12 % acrilamida 29:1, 1 x TEB, a 350V durante 2 horas y a 2 °C de temperatura.
- *SfaNI*: 17 % acrilamida 29:1, 1 x TEB, 400V durante 4 horas y a 2 °C de temperatura.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de SSCP no ofrecían dudas, ver Fig. 15, paneles B y C, exceptuando los individuos en los que se presentaba alguna mutación en el exón y se alteraba el patrón de bandas de SSCP correspondientes a los polimorfismos de restricción. Cuando esto sucedía se determinaba la presencia o ausencia del sitio de corte mediante la digestión del fragmento con la enzima correspondiente.

Como consecuencia del estudio de *AvaII* y *SfaNI* mediante análisis de SSCP, junto con los estudios de otros polimorfismos realizados en el laboratorio mediante esta técnica, podemos señalar que el estudio de los polimorfismos localizados en fragmentos de DNA susceptibles de ser estudiados mediante SSCP (principalmente los localizados en exones) presenta las siguientes ventajas frente a su análisis con enzimas de restricción:

- Obtención de resultados más fiables, ya que no se obtienen resultados confusos como los derivados de digestiones parciales.
- Posibilidad de detectar la mutación responsable de la enfermedad, si se encuentra en la región amplificada para el estudio del polimorfismo.
- Obtención de los resultados más rápidamente, realizándose el protocolo completo (una vez se ha obtenido el amplificado) en 4 horas aproximadamente, frente a más de las 16 horas aconsejables para obtener el resultado mediante restricción.





**IV.3.2 Frecuencia e Informatividad de los Polimorfismos *Sfa*NI, *Taq*I, *Ava*II, *Pvu*II y *Nco*I.**

Se analizaron 82 cromosomas en población HF y 112 en población Control, para los polimorfismos *Sfa*NI, *Taq*I, *Ava*II, *Pvu*II y *Nco*I mediante los procedimientos expuestos en el apartado anterior y siguiendo los cálculos estadísticos descritos en el Apartado III.2.9., Pag. 37. Las frecuencias de los polimorfismos estudiados se muestran en la Tabla 5. Se comprobó que las frecuencias obtenidas cumplían el equilibrio Hardy-Weinberg (mediante un test  $\chi^2$  con un grado de libertad y para un  $P < 0.05$ ) lo que indica que la frecuencia genotípica depende de la frecuencia alélica (para más información ver Gelehrter & Collins, 1990).

A partir de los datos de frecuencias alélicas de cada polimorfismo se calcula el grado de informatividad en base a dos parámetros relacionados entre sí: heterocigosidad y valor PIC, para cada polimorfismo en los dos grupos de población. La heterocigosidad es la probabilidad de que un individuo de la población, escogido al azar, sea heterocigoto para un marcador y, por lo tanto, potencialmente informativo para el análisis familiar con ese marcador. Mientras que el valor PIC es la probabilidad de que, conocido el genotipo de los progenitores y de la descendencia, se pueda deducir que alelo ha recibido un descendiente del progenitor afecto. La heterocigosidad y el valor PIC calculados se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5:** Frecuencia, heterocigosidad y valor PIC de los polimorfismos *Sfa*NI, *Taq*I, *Ava*II, *Pvu*II y *Nco*I.

POLIMORFISMO	GRUPO POBLACIÓN	FRECUENCIA DEL SITIO + (media $\pm$ error estándar)	HET.	VALOR PIC
<i>Sfa</i> NI	HF (n=82)	0.866 $\pm$ 0.038	0.232	0.205
	C (n=112)	0.848 $\pm$ 0.034	0.258	0.224
<i>Taq</i> I	HF (n=82)	0.073 $\pm$ 0.029	0.136	0.126
	C (n=112)	0.098 $\pm$ 0.028	0.177	0.161
<i>Ava</i> II	HF (n=82)	0.402 $\pm$ 0.054	0.481	0.365
	C (n=112)	0.375 $\pm$ 0.046	0.469	0.359
<i>Pvu</i> II	HF (n=82)	0.244 $\pm$ 0.047	0.369	0.301
	C (n=112)	0.223 $\pm$ 0.039	0.347	0.287
<i>Nco</i> I	HF (n=82)	0.549 $\pm$ 0.055	0.495	0.373
	C (n=112)	0.589 $\pm$ 0.046	0.484	0.370

n: número de cromosomas; HF: pacientes de hipercolesterolemia familiar; C: individuos control; HET: heterocigosidad.

De los resultados anteriores se deduce que *Nco*I, *Ava*II y *Pvu*II son los polimorfismos más informativos, con valores de PIC elevados (0.370, 0.359 y 0.287 en controles, respectivamente) y, por tanto, estos polimorfismos pueden ser adecuados para realizar el diagnóstico indirecto de las familias. Por el contrario, *Sfa*NI y *Taq*I son menos informativos, aunque su empleo puede ser útil en algunas familias.

La comparación entre los resultados obtenidos con cada polimorfismo en las muestras Control y HF nos indicó que no existían diferencias significativas entre ambos grupos, tal y como era de esperar al ser la población española una población abierta. Diferencias así solo se han encontrado en poblaciones que han permanecido aisladas y presentan un efecto fundador ((Kotze *et al.*, 1989, 1991).

**IV.3.3. Contenido Informativo y Desequilibrio de Ligamiento de los Polimorfismos Seleccionados.**

La utilidad de un marcador para el diagnóstico genético depende de dos factores: su informatividad, obtenida a partir de las frecuencias alélicas y representada por su heterocigosidad y el valor PIC, y el grado de desequilibrio de ligamiento que presenta este marcador con el resto de los marcadores utilizados.

La utilidad de dos o de un grupo de polimorfismos vendrá determinada por el valor de su PIC acumulado, que es la probabilidad de que al menos uno de ellos permita identificar qué alelo ha heredado un hijo de su progenitor afecto. El desequilibrio de ligamiento es la medida de la asociación entre un alelo de un polimorfismo con otro alelo de otro polimorfismo en toda la población, diciéndose que dos marcadores están en desequilibrio de ligamiento cuando el valor de la asociación entre los alelos es mayor que la probabilidad de asociación debida al azar. Como consecuencia de lo anterior, cuanto mayor sea el desequilibrio de ligamiento entre varios marcadores, menor será su PIC acumulado; es decir, si se utilizan dos polimorfismos en desequilibrio de ligamiento su PIC acumulado será menor que si los dos polimorfismos no están en desequilibrio de ligamiento.

El cálculo del desequilibrio de ligamiento puede realizarse de formas diversas; nosotros hemos utilizado el valor  $\Delta$  por ser el más empleado en la bibliografía relacionada con la HF. Para conocer la presencia o ausencia de desequilibrio se aplicó un test  $\chi^2$  con un grado de libertad (para  $P < 0.05$ ), que según la corrección de Leitersdorf *et al.* (1989), para nuestro estudio con 10 parejas y 194 cromosomas se obtiene un  $\Delta_{\text{límite}}=0.202$ ; por lo tanto, los valores absolutos de  $\Delta$  mayores que 0.202 indicaran la presencia de desequilibrio de ligamiento significativo entre los dos polimorfismos analizados. En la Tabla 6 se presenta el valor de  $\Delta$  de los RFLPs seleccionados en esta tesis, tomados de dos en dos, así como el valor PIC de las diferentes parejas formadas.

**Tabla 6:** Valor  $\Delta$  y PIC de los polimorfismos estudiados, tomados de dos en dos.

Polimorfismo	<i>Sfa</i> NI	<i>Taq</i> I	<i>Ava</i> II	<i>Pvu</i> II	<i>Nco</i> I	
Localización	exón 2	intrón 4	exón 13	intrón 15	exón 18	
<i>Sfa</i> NI		0.12	-0.06	0.13	0.21	$\Delta$
<i>Taq</i> I	0.34		-0.18	-0.14	-0.09	
<i>Ava</i> II	0.47	0.43		-0.23*	0.23*	
<i>Pvu</i> II	0.42	0.38	0.55		0.29*	
<i>Nco</i> I	0.47	0.44	0.66	0.55		
	PIC					

\* están en desequilibrio de ligamiento al superar  $\Delta$  el valor de  $\Delta_{\text{límite}}=0.202$ .

Las combinaciones más informativas (PIC más elevado) son *Nco*I-*Ava*II, *Nco*I-*Pvu*II y *Ava*II-*Pvu*II. Aunque el valor de PIC que presentan estas combinaciones hay que tomarlo con precaución ya que presentan un ligero desequilibrio de ligamiento.

**IV.3.4. Estudio de los Polimorfismos *AvaII*, *PvuII* y *NcoI* Mediante PCR Largo.**

La técnica de PCR largo permite amplificar regiones extensas de DNA, de hasta unas 20 Kb de DNA genómico humano, facilitando su estudio. Nos pareció, por ello, de interés probar la utilidad de esta tecnología en el análisis de RFLPs del gen RLDL ya que, si el resultado fuese positivo, facilitaría una rápida construcción de haplotipos y, en consecuencia, un diagnóstico de HF más rápido.

Con este objetivo, amplificamos una región de 17.5 Kb conteniendo los RFLPs *AvaII*, *PvuII* y *NcoI* (ver Fig. 15), polimorfismos que, de acuerdo con diversos estudios (Leitersdorf *et al.*, 1989; Miserez *et al.*, 1993 y 1994), son muy informativos para varias poblaciones caucásicas estudiadas y, más concretamente, para la española (Chaves *et al.*, 1996; esta Tesis).

La amplificación se realizó utilizando el kit "Expand Long Template PCR System" de Boehringer Mannheim, siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante y utilizando los oligonucleótidos P-7 y P-14, el tampón Nº 2 del sistema, 64 °C como temperatura de unión de los oligonucleótidos, 14 minutos 30 segundos como tiempo extensión inicial, durante 30 ciclos y aumentándose en 20 segundos el tiempo de extensión en cada ciclo, durante los últimos 20 ciclos (ver Tabla 7).

**Tabla 7: Condiciones de amplificación de DNA mediante PCR largo. Los diferentes reactivos se utilizaron según las instrucciones recomendadas por el fabricante.**

FRAGMENTO <sup>1</sup> (exones)	OLIGONUCLEÓ -TIDOS <sup>2</sup>	TAMAÑO <sup>3</sup> (Kb)	TAMPÓN <sup>4</sup>	TEMP. UNIÓN <sup>5</sup>	TIEMPO DE EXTENSIÓN <sup>6</sup>
2 al 7	P-23 y P-54	10.6	2	63	10' 30"
4 al 7	P-16 y P-54	5.0	1	63	5'
6 al 7	P-27 y P-54	3.8	1	63	5'
12 al 18	P-7 y P-14	17.5	2	64	14' 30"
13 al 18	P-1 y P-14	13.5	2	60	12'
15 al 16	P-50 y P-57	5.0	1	65	3' 30"

1- Indica los exones entre los que se amplifica el DNA genómico.

2- La secuencia de los oligonucleótidos utilizados se encuentra en la Tabla 2, Pag. 34.

3- Tamaño de los fragmentos amplificados.

4- Tampón del Kit.

5- Temperatura de unión expresada en °C.

6- En todos los casos se realizan 30 ciclos de amplificación, incrementando 20" el tiempo de extensión en los 20 últimos ciclos.

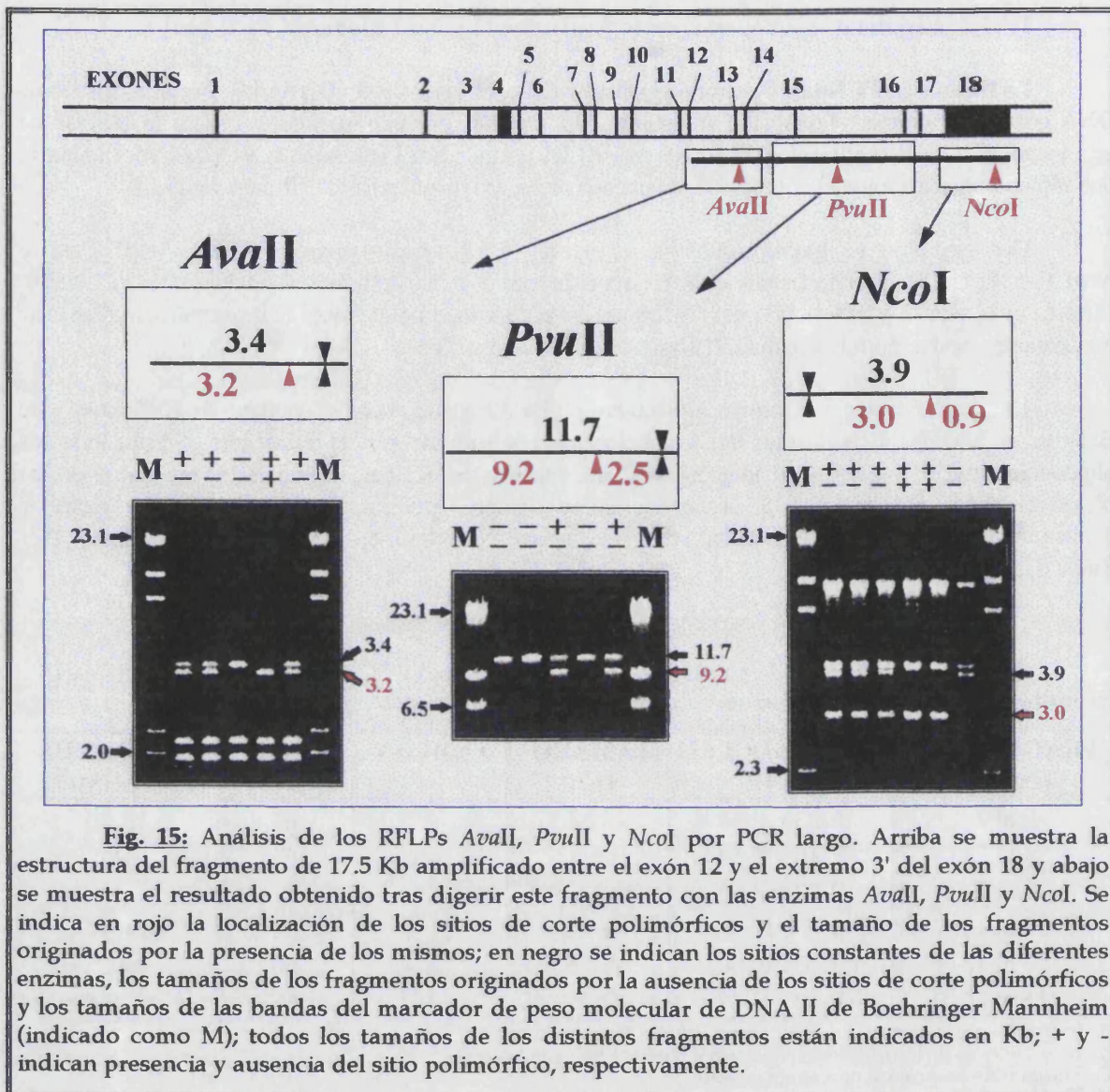
El análisis de restricción de este fragmento (ver Fig. 15) proporcionó los siguientes resultados:

- *AvaII*: se observa fácilmente la presencia o la ausencia del sitio de corte *AvaII* polimórfico, pese al gran número de fragmentos originados por esta digestión. Los fragmentos de restricción informativos son los de 3.2 y 3.4 Kb, que indican la presencia y la ausencia del sitio de corte *AvaII*, respectivamente.

- *PvuII*: se detecta fácilmente la presencia o la ausencia del polimorfismo por los fragmentos de 11.7 Kb (cuando *PvuII* no está presente en el intrón 15) y de 9.2 y 2.5 Kb (resultantes por la digestión del fragmento de 11.7 Kb cuando el sitio *PvuII* está presente).

- *NcoI*: Los fragmentos originados por la digestión con esta enzima y que permitían la detección del polimorfismo fueron de 3.0 y 0.9 Kb, cuando *NcoI* está presente, y de 3.9 Kb, cuando no lo está; se producen, además, dos fragmentos constantes de 9.0 Kb y 4.2 Kb.





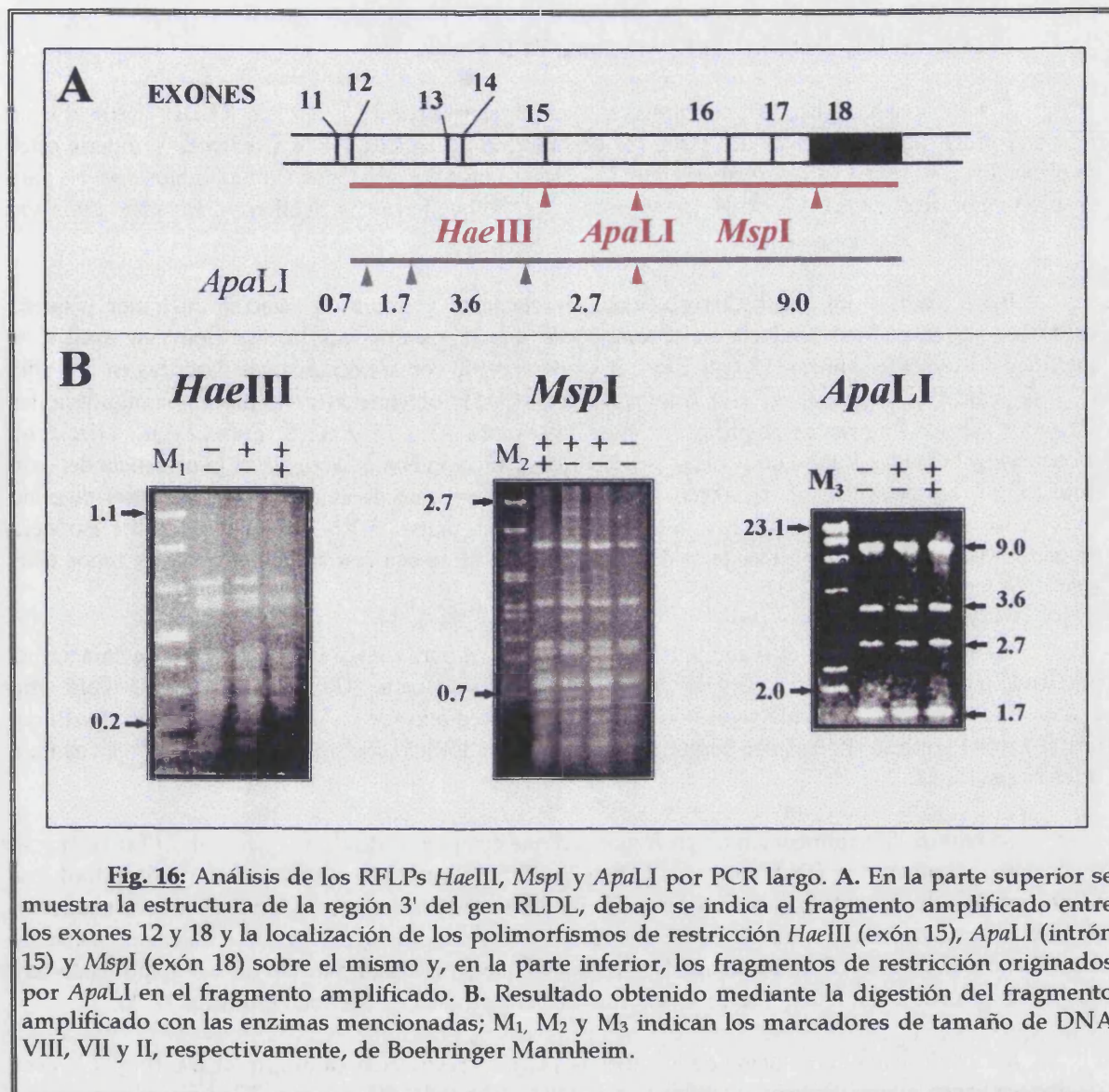
**Fig. 15:** Análisis de los RFLPs *Avall*, *PvuII* y *NcoI* por PCR largo. Arriba se muestra la estructura del fragmento de 17.5 Kb amplificado entre el exón 12 y el extremo 3' del exón 18 y abajo se muestra el resultado obtenido tras digerir este fragmento con las enzimas *Avall*, *PvuII* y *NcoI*. Se indica en rojo la localización de los sitios de corte polimórficos y el tamaño de los fragmentos originados por la presencia de los mismos; en negro se indican los sitios constantes de las diferentes enzimas, los tamaños de los fragmentos originados por la ausencia de los sitios de corte polimórficos y los tamaños de las bandas del marcador de peso molecular de DNA II de Boehringer Mannheim (indicado como M); todos los tamaños de los distintos fragmentos están indicados en Kb; + y - indican presencia y ausencia del sitio polimórfico, respectivamente.

En esta región del gen RLDL se encuentran también los RFLPs determinados por las enzimas *ApaLI* (en el intrón 15), *HaeIII* (en el exón 15) y *MspI* (en la región 5' del exón 18), por lo que parecía interesante analizar también estos polimorfismos en el mismo amplificado (ver Fig. 16). Para ello, se realizaron digestiones con las enzimas correspondientes, observándose que:

- *HaeIII* y *MspI*: no se puede determinar la presencia o ausencia de estos polimorfismos debido al gran número de fragmentos que originan estas enzimas y que impide la identificación clara de los mismos.

- *ApaLI*: todos los individuos estudiados parecen ser ++ para este polimorfismo, ya que siempre se observan los fragmentos de 2.7 y 9.0 Kb que se deberían originar por la presencia del sitio polimórfico del intrón 15. No hemos detectado, en ningún caso, el fragmento de 11.7 Kb que se esperaría obtener si este sitio de corte no estuviera presente (ver Fig. 16). Estos resultados no coinciden con los obtenidos mediante estudio por transferencia Southern en nuestro laboratorio (comparar el resultado obtenido con *ApaLI* en los paneles B.III y B.IV de la Fig. 17), ya que todos los alelos que mediante transferencia Southern aparecían como -, aparecen ahora como +. De hecho, la frecuencia calculada para la ausencia del sitio de corte es 47.3% y para la presencia 52.7%, cuando los resultados se obtienen por digestión de DNA genómico y transferencia Southern.





**Fig. 16:** Análisis de los RFLPs *HaeIII*, *MspI* y *ApaLI* por PCR largo. A. En la parte superior se muestra la estructura de la región 3' del gen RLDL, debajo se indica el fragmento amplificado entre los exones 12 y 18 y la localización de los polimorfismos de restricción *HaeIII* (exón 15), *ApaLI* (intrón 15) y *MspI* (exón 18) sobre el mismo y, en la parte inferior, los fragmentos de restricción originados por *ApaLI* en el fragmento amplificado. B. Resultado obtenido mediante la digestión del fragmento amplificado con las enzimas mencionadas;  $M_1$ ,  $M_2$  y  $M_3$  indican los marcadores de tamaño de DNA VIII, VII y II, respectivamente, de Boehringer Mannheim.

En el apartado siguiente, presentamos un estudio más detallado de esta aparente anomalía. Baste ahora decir que el polimorfismo *ApaLI* del intrón 15 no puede ser estudiado mediante amplificación por PCR largo y digestión del producto amplificado. Sin embargo, la digestión de este producto con *AvaII*, *PvuII* y *NcoI* proporciona una información altamente valiosa para el diagnóstico genético. De hecho, como explicaremos detalladamente más adelante (Apartado IV.4., Pág. 67), la utilización de estos polimorfismos (*AvaII*, *PvuII* y *NcoI*) en el diagnóstico de las 15 familias HF estudiadas permite el diagnóstico en 13 casos, con lo que el porcentaje de familias diagnosticadas es del 86.6%.

La aplicación de este sistema es, por lo tanto, muy útil para realizar de forma rápida y sencilla el diagnóstico familiar de HF, ya que los tres polimorfismos presentan un PIC elevado y permiten en nuestra muestra el diagnóstico del 86.6% de las familias estudiadas. La sustitución de la transferencia Southern, necesaria hasta el momento para detectar *PvuII*, por la técnica de PCR largo supone un adelanto importante por la facilidad y rapidez para conseguir resultados; además, la realización de una sola amplificación para estudiar tres polimorfismos supone una gran simplificación de los procedimientos y un ahorro importante en el trabajo que se precisa para obtener un resultado con un PIC similar.



#### IV.3.5. Análisis del Sitio *Apa*LI Mediante PCR Largo.

Como ya se ha indicado anteriormente, al amplificar la región 3' del gen RLDL, desde el exón 12 hasta prácticamente el final del exón 18, de nuestros probandos HF y Controles y digerir estos amplificados con *Apa*LI (o su isosquizómero *Alw44*I), se observa que todos los individuos son ++ para el sitio polimórfico *Apa*LI del intrón 15, mientras que en transferencias Southern estos individuos son ++, +- ó — para este polimorfismo.

Para verificar los resultados obtenidos previamente y tratar de detectar cualquier pequeña variación que se pudiese producir en el tamaño de los fragmentos tras la digestión con *Apa*LI, se amplificó únicamente el intrón 15 (ver Fig. 17.A), de acuerdo con las condiciones descritas en la Tabla 7, y se realizó la digestión de este fragmento con *Apa*LI, obteniéndose resultados similares a los obtenidos con los fragmentos amplificados entre los exones 12 ó 13 y el 18 (Fig. 17.A); es decir, no encontramos diferencias entre individuos y todos aparecen como homocigotos para la presencia del sitio *Apa*LI (++) . La amplificación del intrón 15 produce un fragmento de unas 5.0 Kb que al ser digerido con *Apa*LI originaría dos fragmentos de tamaños similares, unas 2.5 Kb cada uno si *Apa*LI estuviera presente. Mediante esta amplificación y digestión con *Apa*LI se analizaron 50 individuos y todos ellos aparecieron con un genotipo ++.

En el intrón 3 existe otro polimorfismo de restricción para *Apa*LI (Fig. 17.A) que se caracteriza por tener una baja frecuencia para la presencia del sitio de corte (Geisel *et al.*, 1988). Este sitio polimórfico puede ser analizado siguiendo los mismos procedimientos utilizados para el sitio *Apa*LI del intrón 15, por tanto su análisis nos permitiría conocer si lo sucedido con *Apa*LI del intrón 15 es común a otros sitios *Apa*LI.

Se realizó la amplificación de un fragmento que comprende desde el exón 2 al 7 (Tabla 7) y se digirió este fragmento de DNA con *Apa*LI. Esto permitió observar que el sitio polimórfico *Apa*LI se mantenía como había indicado la transferencia Southern (mayoritariamente - en nuestros probandos), pero se producían 4 fragmentos de DNA, frente a los 2 esperados según los datos obtenidos mediante transferencia Southern. De estos resultados se deduce que en el fragmento de 9.7 Kb amplificado hay dos sitios de restricción *Apa*LI que no se detectan mediante transferencia Southern (Fig. 17.A).

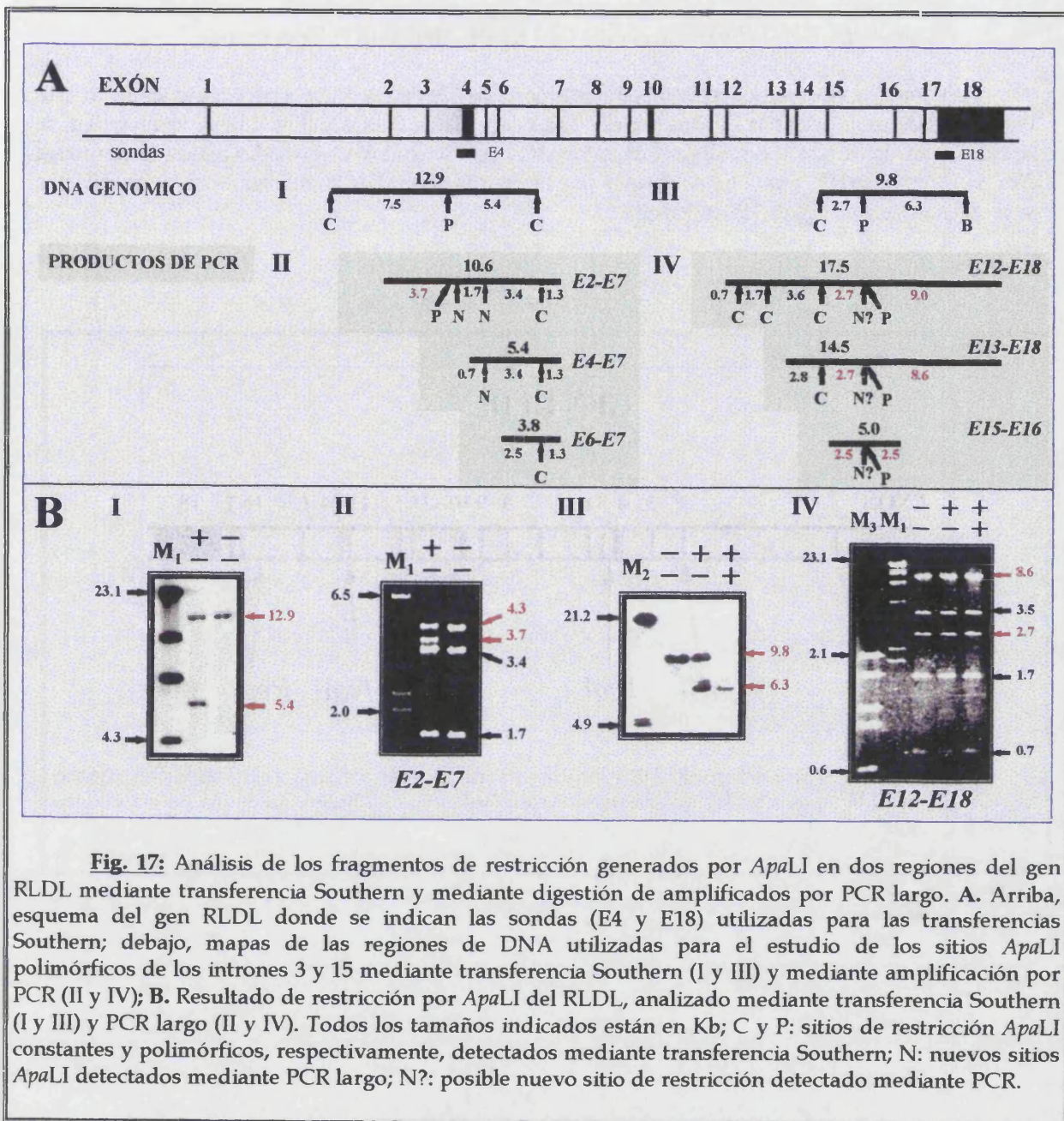
La localización aproximada de los nuevos sitios de restricción en el gen RLDL (Fig. 17.A) se realizó mediante la amplificación de diferentes regiones del gen RLDL comprendidas entre los exones 2 y 7 (Fig. 17.A; las condiciones de amplificación se encuentran en la Tabla 7) y su posterior digestión con *Apa*LI. Mediante este procedimiento se obtuvieron los resultados siguientes:

Fragmento amplificado E2-E7: la presencia del sitio *Apa*LI polimórfico originaba fragmentos con tamaños de 3.7 y 0.6 Kb y en su ausencia, de 4.3 Kb. Además, la presencia de otros sitios *Apa*LI constantes producía fragmentos de 3.4, 1.7 y 1.3 Kb (Fig.17.II).

Fragmento amplificado E4-E7: siempre se originaban fragmentos de 3.4, 1.3 y 0.7 Kb.

Fragmento amplificado E6-E7: se originaban solamente fragmentos de 2.5 y 1.3 Kb.

Estos resultados nos permitieron localizar aproximadamente los nuevos sitios de restricción *Apa*LI presentes en esta región, según lo expuesto en la Fig. 17.A.



**Fig. 17:** Análisis de los fragmentos de restricción generados por *Apa*LI en dos regiones del gen RLDL mediante transferencia Southern y mediante digestión de amplificados por PCR largo. A. Arriba, esquema del gen RLDL donde se indican las sondas (E4 y E18) utilizadas para las transferencias Southern; debajo, mapas de las regiones de DNA utilizadas para el estudio de los sitios *Apa*LI polimórficos de los intrones 3 y 15 mediante transferencia Southern (I y III) y mediante amplificación por PCR (II y IV); B. Resultado de restricción por *Apa*LI del RLDL, analizado mediante transferencia Southern (I y III) y PCR largo (II y IV). Todos los tamaños indicados están en Kb; C y P: sitios de restricción *Apa*LI constantes y polimórficos, respectivamente, detectados mediante transferencia Southern; N: nuevos sitios *Apa*LI detectados mediante PCR largo; N?: posible nuevo sitio de restricción detectado mediante PCR.

Los resultados discrepantes obtenidos según se emplee transferencia Southern o PCR largo pueden tener su origen en una modificación postreplicativa de algunos de los sitios *Apa*LI, presentes en el DNA genómico, dependiente de secuencias cercanas, o solapantes, a tales sitios; de esta forma los sitios modificados permanecerían ocultos para la enzima y aparecerían como sitios -, mientras que los sitios no modificados serían accesibles a la enzima y aparecerían como +. Dado que la modificación postreplicativa, propuesta en nuestra hipótesis, no ocurre in vitro, durante la amplificación por PCR, todos los sitios *Apa*LI presentes en el amplificado podrán ser reconocidos y cortados por la enzima.





**IV.3.7. Frecuencia, Heterocigosidad y Valor PIC de Once Polimorfismos Presentes en el Gen RLDL.**

El estudio de los once polimorfismos (ver Fig. 18) se ha realizado en 41 probandos y en 56 controles, el resultado del análisis (frecuencia, heterocigosidad y PIC) de los diferentes polimorfismos se puede observar en la Tabla 8.

**Tabla 8:** Frecuencia, heterocigosidad y valor PIC obtenidos al estudiar 11 polimorfismos del gen RLDL en la población española (Control y HF).

POLIMORFISMO	CROMOSOMAS	FRECUENCIA DEL SITIO + (media ± error estándar)	HET.	VALOR PIC
<i>Bgl</i> III	(HF) n=82	0.841 ± 0.040	0.267	0.231
	(C) n=112	0.893 ± 0.029	0.192	0.173
<i>Sfa</i> NI	(HF) n=82	0.866 ± 0.038	0.232	0.205
	(C) n=112	0.848 ± 0.034	0.258	0.224
<i>Taq</i> I	(HF) n=82	0.073 ± 0.029	0.136	0.126
	(C) n=112	0.098 ± 0.028	0.177	0.161
<i>Stu</i> I	(HF) n=82	0.976 ± 0.017	0.048	0.046
	(C) n=112	0.955 ± 0.020	0.085	0.082
<i>C-T</i> <sub>1725</sub>	(HF) n=82	0.146 ± 0.039	0.250	0.219
	(C) n=112	0.170 ± 0.035	0.282	0.242
<i>Hinc</i> II	(HF) n=82	0.537 ± 0.055	0.497	0.374
	(C) n=112	0.616 ± 0.046	0.473	0.361
<i>Ava</i> II	(HF) n=82	0.402 ± 0.054	0.481	0.365
	(C) n=112	0.375 ± 0.046	0.469	0.359
<i>Hae</i> III	(HF) n=82	0.793 ± 0.045	0.329	0.275
	(C) n=112	0.795 ± 0.038	0.326	0.273
<i>Pvu</i> II	(HF) n=82	0.244 ± 0.047	0.369	0.301
	(C) n=112	0.223 ± 0.039	0.347	0.287
<i>Msp</i> I	(HF) n=82	0.683 ± 0.051	0.433	0.339
	(C) n=112	0.661 ± 0.045	0.448	0.349
<i>Nco</i> I	(HF) n=82	0.549 ± 0.055	0.495	0.373
	(C) n=112	0.589 ± 0.046	0.484	0.370

n: número de cromosomas; HET.: Heterocigosidad; HF: grupo de población con hipercolesterolemia familiar; C: grupo control normolipidémico.

Según los datos anteriores los polimorfismos más informativos son *Hinc*II y *Nco*I, que presentan un PIC de 0.374 y 0.373 en HF y de 0.361 y 0.370 en Controles, respectivamente. Es de interés resaltar que en nuestro laboratorio hemos detectado un polimorfismo situado en el nucleótido 1725 del cDNA (presenta una T en el nucleótido 1725 en lugar de una C, polimorfismo *C-T*<sub>1725</sub>), separado tan solo 48 bp del polimorfismo *Hinc*II. El hecho de que ambos polimorfismos estén en el exón 12 facilita su estudio mediante análisis de SSCP, lo que supone que, en un solo ensayo, podemos obtener mucha más información que con el resto de los polimorfismos, ya que presentan una heterocigosidad y un PIC conjuntos de 0.620 y 0.541 para Controles y de 0.614 y 0.533 para HF, respectivamente.

En todos los casos se comprobó que las frecuencias obtenidas y el número de individuos heterocigotos y homocigotos cumplían el equilibrio Hardy-Weinberg. También se comprobó que no existían diferencias significativas entre las frecuencias obtenidas en Controles y en HF, como era de esperar al ser la población española una población abierta.

**IV.3.8. Desequilibrio de Ligamiento e Informatividad de los Polimorfismos Analizados.**

La medida del desequilibrio de ligamiento se realizó mediante el valor  $\Delta$  y la informatividad de las parejas de polimorfismos mediante el valor PIC, al igual que en los polimorfismos estudiados anteriormente. Los resultados obtenidos mediante este análisis se pueden ver en la Tabla 9, donde se indican las parejas que se encuentran ligadas para  $P < 0.05$ , 55 comparaciones, donde el  $\Delta_{\text{límite}}$  es de 0.24.

**Tabla 9:** Análisis de desequilibrio de ligamiento y valor PIC de los polimorfismos estudiados en nuestro laboratorio, tomados de dos en dos.

Polimorf.	<i>Bgl</i> III	<i>Sfa</i> NI	<i>Taq</i> I	<i>Stu</i> I	<i>C-T</i> <sub>1725</sub>	<i>Hinc</i> II	<i>Ava</i> II	<i>Hae</i> III	<i>Pvu</i> II	<i>Msp</i> I	<i>Nco</i> I
Localización	región 5'	exón 2	intrón 4	exón 8	exón 12	exón 12	exón 13	exón 15	intrón 15	exón 18	exón 18
<i>Bgl</i> III		-0.06	0.11	-0.07	0.13	-0.04	0.05	-0.14	0.15	0.06	0.20
<i>Sfa</i> NI	0.20		0.12	-0.07	0.15	0.10	-0.06	-0.13	0.13	-0.08	0.21
<i>Taq</i> I	0.32	0.34		0.06	-0.11	0.18	-0.18	0.13	-0.14	0.11	0.09
<i>Stu</i> I	0.25	0.26	0.21		0.08	-0.12	0.12	0.36*	-0.07	-0.10	-0.11
<i>C-T</i> <sub>1725</sub>	0.34	0.38	0.32	0.28		0.27*	-0.23	-0.09	0.25*	0.24	0.26
<i>Hinc</i> II	0.46	0.49	0.43	0.40	0.49		-0.83*	-0.24	0.21	-0.36*	-0.18
<i>Ava</i> II	0.45	0.47	0.43	0.39	0.49	0.43		0.23	-0.23	0.41*	0.23
<i>Hae</i> III	0.37	0.42	0.36	0.30	0.20	0.54	0.54		-0.40*	-0.20	-0.26*
<i>Pvu</i> II	0.39	0.42	0.38	0.30	0.21	0.55	0.55	0.24		0.27*	0.29*
<i>Msp</i> I	0.45	0.48	0.42	0.38	0.49	0.61	0.60	0.52	0.54		0.59*
<i>Nco</i> I	0.42	0.47	0.44	0.39	0.48	0.67	0.66	0.51	0.55	0.52	

$\Delta$

PIC

\* indica los polimorfismos que presentan desequilibrio de ligamiento según las condiciones indicadas en el texto.

En la Tabla anterior se puede observar que están en desequilibrio de ligamiento tanto polimorfismos que se encuentran próximos físicamente en el gen (por ejemplo *Hinc*II y *Ava*II, *Pvu*II y *Hae*III, *Msp*I y *Nco*I) como otros que se encuentran relativamente alejados (*Ava*II o *Hinc*II están en desequilibrio de ligamiento con *Msp*I). Posiblemente estos hechos encuentren su explicación en procesos de recombinación no uniforme a lo largo del gen y en la historia de la aparición de los diferentes polimorfismos y haplotipos (Chakravarti *et al.* 1984; Miserez *et al.*, 1993).

El resultado que puede parecer un poco ilógico es el observado entre el polimorfismo *C-T*<sub>1725</sub> e *Hinc*II, que pese a estar en desequilibrio de ligamiento, el valor de  $\Delta$  es mucho menor al obtenido entre *Hinc*II y *Ava*II aunque la distancia entre el polimorfismo *C-T*<sub>1725</sub> y *Hinc*II es de 48 pb y entre *Hinc*II y *Ava*II es de unas 3.0 Kb. Este resultado es consecuencia de la ausencia de individuos que presenten el polimorfismo *C-T*<sub>1725</sub> y no tengan el sitio de corte para *Hinc*II (individuos *Hinc*II T<sub>1725</sub>). La ausencia de este alelo incide en el cálculo de  $\Delta$ , disminuyendo su valor ya que  $\Delta$  es un valor del desequilibrio de ligamiento de las dos posibilidades de cada alelo con las otras dos del otro alelo (en el caso de los polimorfismos de restricción).

#### IV.4. ANÁLISIS FAMILIAR.

La segregación de los polimorfismos analizados anteriormente y la construcción de haplotipos se realizó en 18 familias compuestas por un total de 137 individuos. En estas familias se analizó la cosegregación de haplotipos con la enfermedad para confirmar/excluir el diagnóstico clínico-bioquímico de la misma.

Los resultados que se exponen a continuación muestran el análisis de segregación en las familias con los haplotipos construidos bien con los cinco polimorfismos, estudiados por mí, bien con el total de once polimorfismos estudiados hasta el momento en nuestro laboratorio. También se muestra el resultado de usar sólo tres de los polimorfismos, analizados mediante PCR largo. De esta forma se pueden comparar las posibilidades diagnósticas de cada una de estas combinaciones, sus ventajas y limitaciones.

A partir de los haplotipos obtenidos y de su frecuencia en población normolipidémica se puede calcular el orden de máxima informatividad para los polimorfismos analizados según Chacravarti & Buetow (1985). El orden de máxima informatividad es muy interesante para disminuir los costes en trabajo y tiempo, necesarios para realizar el diagnóstico genético indirecto, principalmente si se desea hacerlo de forma rutinaria, ya que proporciona la mayor información utilizando el mínimo número de polimorfismos. Este orden dependerá del contenido informativo de cada polimorfismo y del desequilibrio de ligamiento entre los diferentes polimorfismos, ya que los polimorfismos de bajo PIC o de desequilibrio de ligamiento elevado con otro polimorfismo más informativo supondrán un incremento pequeño del PIC acumulativo. El cálculo de este orden supone escoger la pareja de polimorfismos más informativa (que presenta el PIC acumulado más elevado de todas las parejas posibles); posteriormente, se añade a la pareja el polimorfismo que presente la máxima informatividad junto con los dos anteriores (el PIC acumulado de los tres polimorfismos debe ser el mayor de todos los tríos posibles) y así sucesivamente hasta que el PIC no se incremente al añadir más polimorfismos o se agote la lista de los mismos.

**IV.4.1. Análisis de las Familias.**

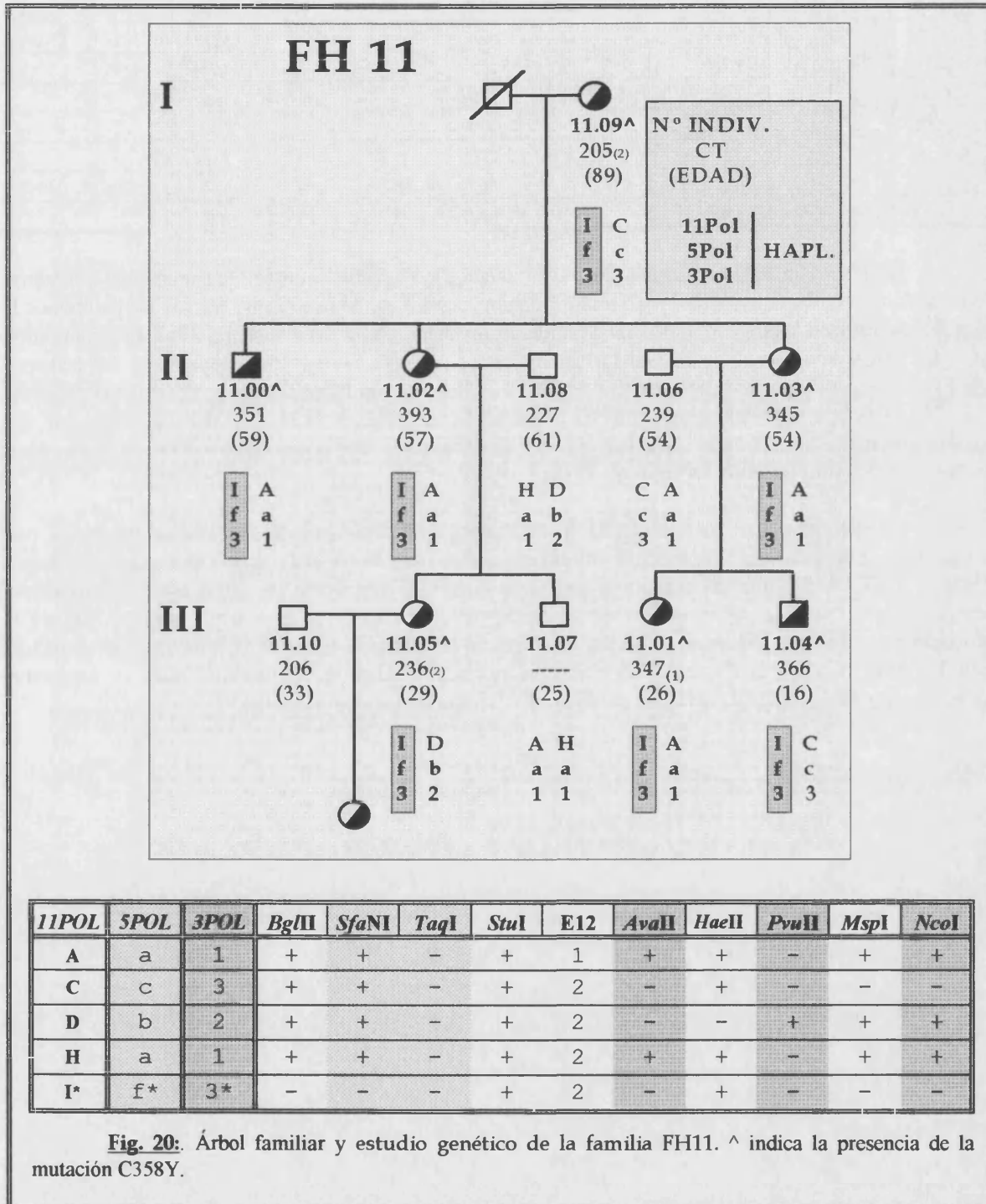
En las Figuras y Tablas correspondientes a las diferentes familias que se exponen a continuación se utilizarán las abreviaciones y símbolos indicados en la Tabla 10, a fin de facilitar su comprensión y simplificar las leyendas de las mismas.

**Tabla 10:** Abreviaciones y símbolos utilizados en el texto, Fig. y Tablas del Apartado IV.4.1.

FIGURAS:	TABLAS:
I, II, III, IV: indican el número de cada generación.	
*: indica el haplotipo patológico. ^ ó " : indica la presencia de una mutación que cosegrega con la enfermedad. &: indica la presencia de una mutación que no cosegrega con la enfermedad.	Mut.: nombre de la mutación, el número de un exón indica que se ha localizado un patrón anómalo de bandas de SSCP en ese exón, pero la mutación aún no ha sido caracterizada..
El subíndice (1): los datos bioquímicos han sido recogidos cuando el paciente se encontraba bajo dieta.	El subíndice (1): los datos bioquímicos han sido recogidos cuando el paciente se encontraba bajo dieta.
El subíndice (2): los datos bioquímicos han sido recogidos cuando el paciente se encontraba bajo dieta y tratamiento con fármacos.	El subíndice (2): los datos bioquímicos han sido recogidos cuando el paciente se encontraba bajo dieta y tratamiento con fármacos.
FH, C y ?: indican el diagnóstico clínico-bioquímico de enfermo, sano y los individuos cuyo diagnóstico clínico-bioquímico es dudoso: para mayores de 18 años entre 220 y 280 mg/dl de CT y entre 160 y 180 mg/dl de LDL-C y para menores de 18 años entre 180 y 200 mg/dl de CT y entre 130 y 160 mg/dl de LDL-C (ver Apartado III.2.1., Pag. 33), respectivamente.	FH, C y ?: indican el diagnóstico clínico-bioquímico de enfermo, sano o el diagnóstico es dudoso: para mayores de 18 años entre 220 y 280 mg/dl de CT y entre 160 y 180 mg/dl de LDL-C y para menores de 18 años entre 180 y 200 mg/dl de CT y entre 130 y 160 mg/dl de LDL-C (ver Apartado III.2.1., Pag. 33).
Nº Indiv.: indica el número de identificación de cada individuo. Los individuos numerados con X.00 son los probandos, si no se dice lo contrario.	Nº Indiv.: indica el número de identificación de cada individuo. Los individuos numerados con X.00 son los probandos, si no se dice lo contrario.
CT: Colesterol total en mg/dl.	CT: colesterol total, en mg/dl. TG: triglicéridos, en mg/dl.
Edad: indicada en años, entre paréntesis.	HDL-C: colesterol transportado en lipoproteínas de alta densidad, en mg/dl. LDL-C: colesterol transportado por lipoproteínas de baja densidad, en mg/dl. VLDL-C: colesterol transportado por lipoproteínas de muy baja densidad, en mg/dl. ND: no hay datos. Y: familiar no consanguíneo que presenta datos bioquímicos patológicos.
El diagnóstico genético viene dado por el haplotipo marcado como patológico (fondo gris) o la presencia de una mutación responsable de la enfermedad (^ ó " ).	Hap. Patol.: haplotipos patológicos o que cosegregan con la enfermedad.
11POL: haplotipos, en letras mayúsculas, contruidos con los 11 polimorfismos.	
5POL: haplotipos, en letras minúsculas, contruidos con los polimorfismos, indicados con fondo gris claro y oscuro.	
3POL: haplotipos, con designación numérica, contruidos con los 3 polimorfismos con fondo gris oscuro.	

IV.4.1.1. Familia FH11.

La Fig. 20 muestra la segregación de la enfermedad y de los haplotipos deducidos en la familia FH11. En esta familia se observa que la herencia de la enfermedad va unida a los haplotipos I, f y 3. En la Tabla 11 se pueden ver los datos bioquímicos de esta familia.





RESULTADOS

**Tabla 11:** Datos bioquímicos y genéticos de la familia FH11.

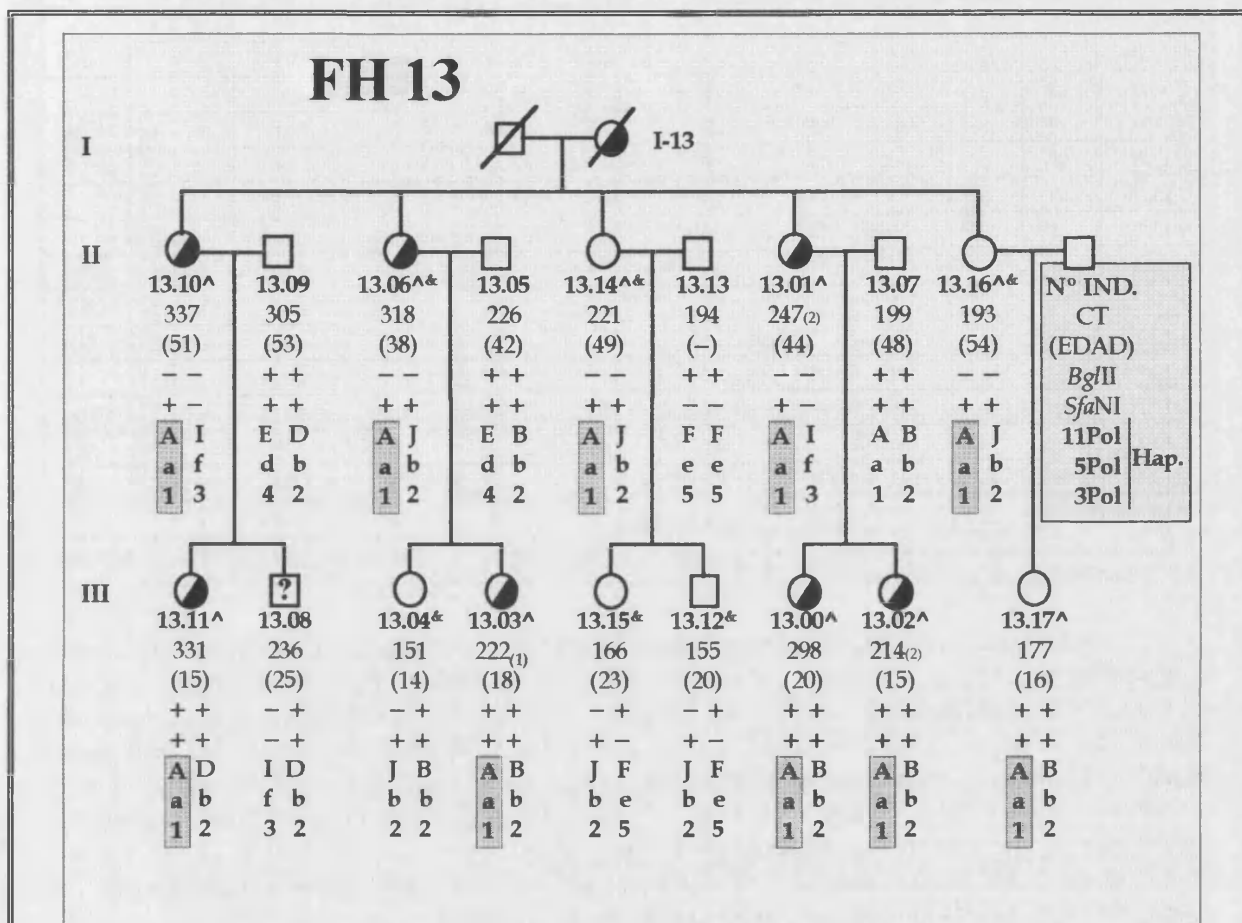
Nº Indiv.	edad (años)	sexo	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo AI (mg/dl)	Hap. Patol.	Mut.
FH 11.00	59	v	351	72	60	264	9	166	148	I, f, 3	C358Y
FH 11.01 <sub>(v)</sub>	26	m	347	63	59	275	16	161	154	I, f, 3	C358Y
FH 11.02	57	m	393	88	50	320	10	163	148	I, f, 3	C358Y
FH 11.03	54	m	345	92	65	248	14	155	150	I, f, 3	C358Y
FH 11.04	16	v	366	66	44	309	13	164	121	I, f, 3	C358Y
FH 11.05 <sub>(v)</sub>	29	m	236	81	48	172	16	118	97	I, f, 3	C358Y
C 11.06	54	v	239	109	74	144	21	114	163		
C 11.07	25	v	ND								
C 11.08	61	v	227	109	51	154	22	133	121		
FH11.09 <sub>(v)</sub>	89	m	205	91	51	136	18	109	127	I, f, 3	C358Y
C 11.10	33	v	206	148	52	125	29	103	109		

En la familia FH11 se puede realizar el diagnóstico genético indirecto en todos los individuos utilizando las combinaciones de 11 y 5 polimorfismos, cosegregando la enfermedad con los haplotipos I, f y 3. Si se utilizan los tres polimorfismos estudiados mediante PCR largo (sistema 3Pol, que comprende *AvaII*, *PvuII* y *NcoI*) no se podrá realizar el diagnóstico genético en la primera generación descendiente de FH11.09 y en la posible descendencia de FH11.04, ya que son homocigotos para estos marcadores. El resto de individuos puede ser diagnosticado mediante este sistema, exceptuando FH11.01 ya que sus padres presentan los genotipos 1-3 y 1-3, y FH11.01 presenta el mismo genotipo, por lo que no se puede saber de donde procede cada haplotipo.

En esta familia se ha encontrado la mutación C358Y que supone un cambio de cisteína por tirosina en el aminoácido 358, exón 8, ya que cambia la base 1146 de G a A y el codón pasa de ser TGT a TAT. Esta mutación cosegrega con la enfermedad, corrobora los datos obtenidos mediante diagnóstico indirecto y confirma el diagnóstico de HF en FH11.04, a la vez que permite realizar el diagnóstico directo de HF en esta familia. El efecto de la mutación sobre el receptor ha sido estudiado por O. Puig en su Tesis Doctoral. La mutación afecta al transporte del receptor hasta la membrana plasmática (mutación de Clase II) y a la unión de LDL (mutación de Clase III).

IV.4.1.2. Familia FH13.

El árbol de la familia FH13 y la segregación de los diferentes marcadores se puede observar en la Fig. 21, donde se indica especialmente la segregación anómala de *Bgl*III y la normal de *Sfa*NI, y los datos correspondientes a los miembros de la misma en la Tabla 12.



11P	5POL	3POL	<i>Bgl</i> III	<i>Sfa</i> NI	<i>Taq</i> I	<i>Stu</i> I	E12	<i>Ava</i> II	<i>Hae</i> III	<i>Pvu</i> II	<i>Msp</i> I	<i>Nco</i> I
A*	a*	1*	+	+	-	+	1	+	+	-	+	+
B	b	2	+	+	-	+	3	-	-	+	+	+
D	b	2	+	+	-	+	2	-	-	+	+	+
E	d	4	+	+	+	+	2	-	+	-	+	+
F	e	5	+	-	-	+	1	+	+	-	+	-
I	f	3	-	-	-	+	2	-	+	-	-	-
J	b	2	-	+	-	+	2	-	-	+	+	+

**Fig. 21:** Árbol familiar y haplotipos obtenidos en la familia FH13. <sup>^</sup> y <sup>&</sup>: indican la presencia de la alteración de la región 5' del gen RLDL y de la mutación N 619 N, respectivamente. El haplotipo que cosegrega con la enfermedad en esta familia no presenta el polimorfismo *Bgl*III (está deletado), por lo que el haplotipo "A" utilizado para designarlo no lo incluye. Cuando esta alteración está presente solamente se observa el resultado de *Bgl*III originado por el otro alelo. + y - indican la presencia y ausencia de los sitios polimórficos *Bgl*III ó *Sfa*NI.

RESULTADOS

Tabla 12: Datos bioquímicos y genéticos de la familia FH13.

	edad (años)	sexo	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo AI (mg/dl)	Hap. Patol.	Mut.
FH 13.00	20	m	298	51	67	216	10	132	157	A*, a, 1	^
FH 13.01 <sup>(2)</sup>	44	m	241	65	37	191	13	93	77	A*, a, 1	^
FH 13.02 <sup>(2)</sup>	15	m	214	72	31	169	14	81	74	A*, a, 1	^
FH 13.03 <sup>(2)</sup>	18	m	222	42	30	184	8	96	94	A*, a, 1	^
C 13.04	14	m	151	59	36	104	11	64	97		&
C 13.05	42	v	226	147	28	169	29	104	117		
FH 13.06	38	m	318	136	29	263	27	158	92	A*, a, 1	^, &
C 13.07	48	v	199	86	37	145	17	79	88		
? 13.08	25	v	236	174	26	176	34	147	107		
Y 13.09	55	v	305	168	29	243	33	140	128		
FH 13.10	51	m	337	55	56	270	17	148	110	A*, a, 1	^
FH 13.11	15	m	331	72	88	279	14	135	103	A*, a, 1	^
C 13.12	20	v	155	126	33	97	25	62	94		&
C 13.13		v	194	72	39	141	14	95	109		
C 13.14	49	m	221	171	34	145	34	100	131	A*, a, 1	^, &
C 13.15	23	m	166	79	40	110	16	72	109		&
C 13.16	54	m	193	62	53	128	12	70	88	A*, a, 1	^, &
C 13.17	16	m	177	56	52	114	11	63	78	A*, a, 1	^

^ y & indican la presencia de la mutación Valencia-5 y de la mutación N 619 N, respectivamente; Y: presenta alguna dislipemia que no hemos podido diagnosticar por carecer de datos adicionales.

El diagnóstico genético indirecto de la familia FH13 se puede realizar en todos los componentes de la tercera generación mediante el estudio de *Bg/III*, ya que este polimorfismo segrega de forma anómala al estar delecionada la región 5' del gen hasta el exón 1. Como consecuencia de la deleción, denominada Valencia-5, los portadores tendrán una copia totalmente afuncional. La segregación anómala del polimorfismo se observa en la pérdida de un alelo de *Bg/III* en algunos descendientes de la tercera generación (FH13.11, FH13.03, FH13.00, FH13.02 y C13.17). El exón 2 no se encuentra delecionado ya que existen heterocigotos para este polimorfismo como FH13.10 y 13.01, que son portadores de la alteración Valencia-5. El haplotipo "A\*" utilizado para indicar el haplotipo enfermo carece, por tanto, en esta familia del dato procedente del polimorfismo *Bg/III*.

En la tercera generación se puede realizar el diagnóstico genético indirecto en todos los individuos, mientras que en la segunda generación no se puede realizar claramente en un par de ramas familiares que presentan bajos niveles de CT (C13.14 y C13.16) y presentan el mismo haplotipo (A, a ó 1) procedente del antecesor enfermo que el resto de miembros de esta generación. En la familia solo se observa el haplotipo de un alelo del antecesor enfermo (indicado como I-13 en el árbol familiar) en todas las hermanas (FH13.10, FH13.06, C13.14, FH13.01 y C13.16). Esta situación se puede explicar suponiendo que todas llevan el alelo enfermo y algunas son asintomáticas o que el antecesor, I-13, era homocigoto para los marcadores utilizados y, por tanto, las hijas enfermas y sanas presentan el mismo haplotipo. C13.16 tiene una hija (C13.17) en la que se observa la pérdida de un alelo *Bg/III* (-) obligado, lo que indica que C13.16 es portadora de la alteración Valencia-5 y es asintomática para la enfermedad, ya que presenta un perfil lipídico normal, al igual que C13.17. Los dos descendientes de C13.14 han heredado el haplotipo sano de la madre (J, b, 2) y presentan niveles normales de CT y LDL-C, por lo que deben ser diagnosticados como sanos. En consecuencia, no podemos hacer un diagnóstico de 13.14 por la vía inversa (como habíamos hecho con 13.16).

La rama familiar de FH13.10 presenta un hijo enfermo HF (FH13.11) ya que ha heredado el haplotipo enfermo y presenta las características bioquímicas de tales enfermos, mientras que ?13.08 tiene unos niveles de CT dentro de los límites que indican un diagnóstico dudoso de HF. Esta persona no presenta el haplotipo patológico de la familia FH13, por lo que no puede ser diagnosticado como HF. Sin embargo, dado que su padre, Y13.09, presenta niveles patológicos de CT y LDL-C es posible que haya heredado de él algún factor genético responsable de su fenotipo.

En las ramas familiares de FH13.06 y FH13.01 se observa una herencia clara, presentando FH13.03, FH13.00 y FH13.02 el haplotipo patológico y pérdida aparente de un alelo *Bg/III* obligado, mientras que C13.04 carece de dicho haplotipo, es heterocigoto para *Bg/III* y presenta niveles normales de CT y LDL-C.

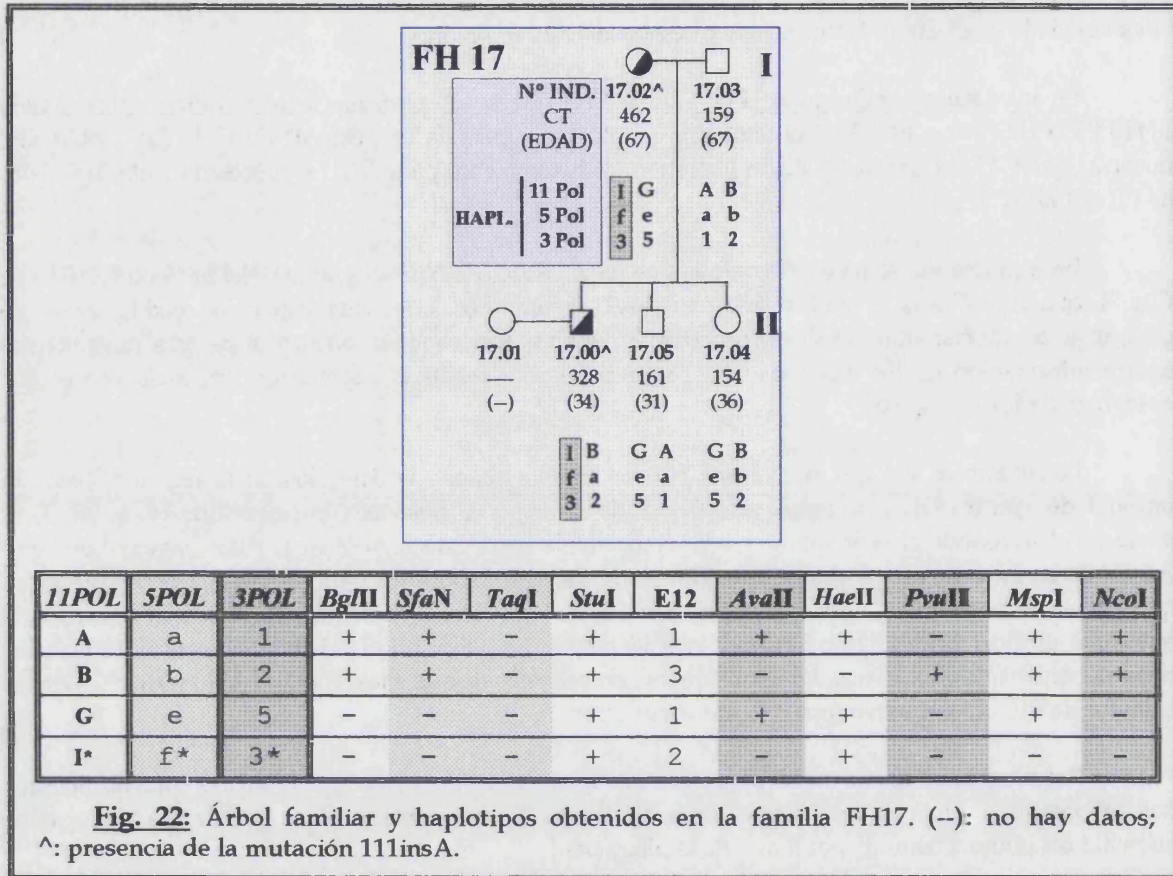
En esta familia se ha encontrado la mutación silenciosa N619N (cambio del nucleótido 1920 de C a T que transforma el codón AAC en AAT, ambos con la misma capacidad codificante) que cosegrega con el haplotipo (J, b, 2) procedente del antecesor sano. La presencia de esta mutación no aporta información en los casos dudosos, si bien permite seguir la segregación del alelo con el que cosegrega de forma rápida.

La alteración del gen encontrada en esta familia supone la deleción de la región 5' hasta el intrón 1 del gen RLDL y no había sido detectada mediante la búsqueda inicial realizada con *Bg/III* al presentar deleción el exón que se usaba como sonda (para esta región) en la transferencia Southern. Actualmente esta alteración está siendo caracterizada en el laboratorio, lo que nos ha permitido saber que C13.14 es portadora de esta alteración. Por otro lado, la detección de esta alteración ha determinado que (para unificar criterios) no hayamos considerado el probando en el cálculo de frecuencias génicas, mientras que haplotipos sanos, no relacionados, procedentes de esta familia si han sido utilizados en los cálculos de PIC acumulativo, orden de informatividad, etc.

Por último, un hecho señalable es que con el sistema 3Pol se obtiene la misma información que con los demás polimorfismos (si excluimos *Bg/III*, que en ocasiones permite detectar la segregación anómala del polimorfismo y, por tanto, de la alteración).

IV.4.1.3. Familia FH17.

En la familia FH17 se han podido estudiar 5 miembros, cuyas características se muestran en la Fig. 22 y en la Tabla 13.



El estudio de haplotipos de la familia FH17 indica que la enfermedad cosegrega con los haplotipos I, f ó 3. Este diagnóstico indirecto se confirmó al identificarse la mutación 111insA presente en esta familia y causante de la HF, pues supone la inserción de una adenina después del nucleótido 111 del cDNA. Esta inserción origina la ruptura de la pauta de lectura, lo que produce un codón de parada de la traducción 13 codones después de la inserción.

El diagnóstico genético indirecto mediante la formación de haplotipos se puede realizar utilizando simplemente el sistema 3Pol, aunque habiendo identificado la mutación responsable de la enfermedad es ahora posible hacer un diagnóstico directo en los miembros de esta familia.

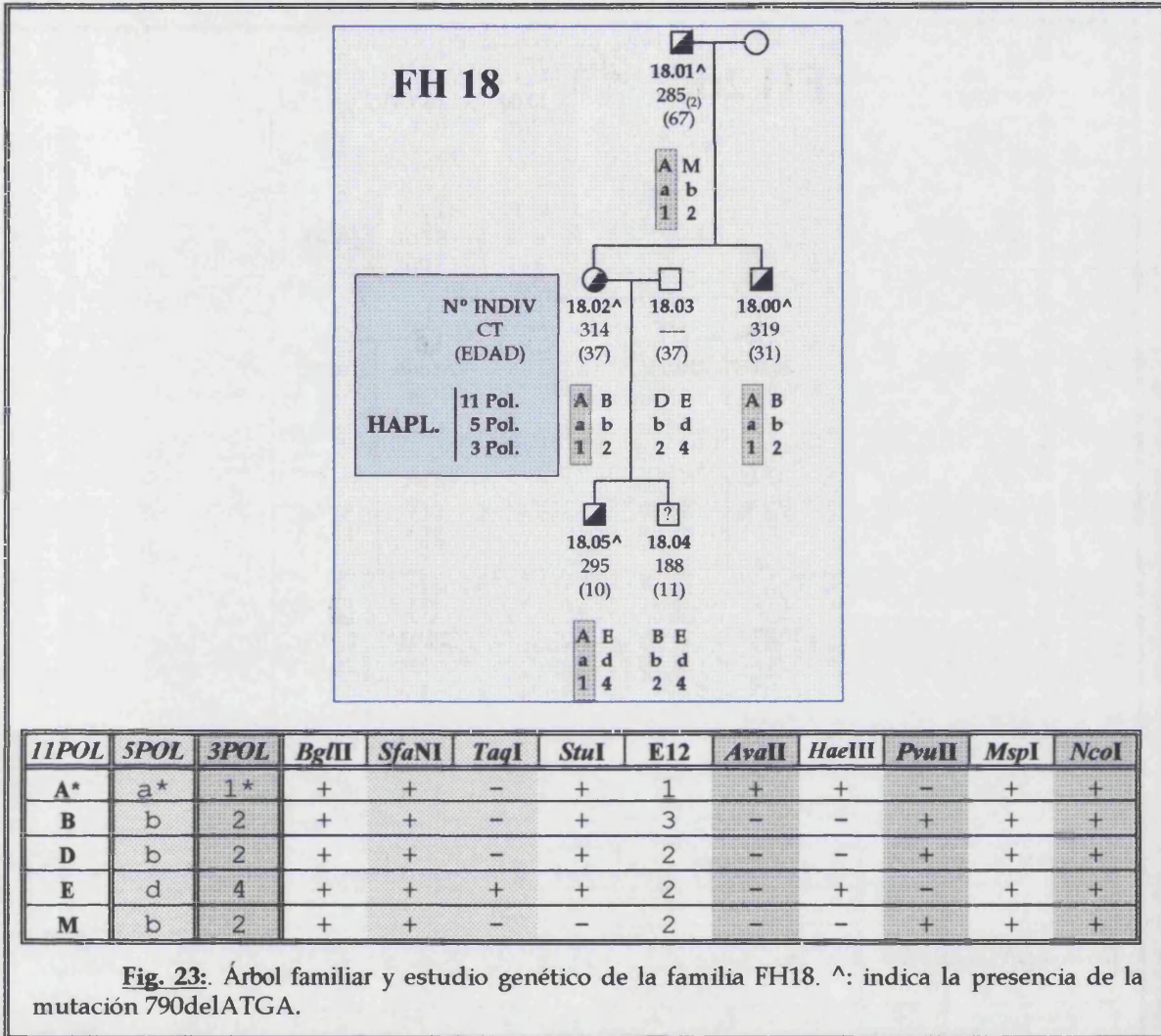
**Tabla 13:** Características de los miembros de la familia FH17.

	edad (años)	sexo	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo AI (mg/dl)	Hap. Patol.	Mut.
FH 17.00	34	v	328	87	28	289	18	132	92	I, f, 3	111insA
17.01		m									
FH 17.02	67	m	462	135	35	380	27	138	100	I, f, 3	111insA
C 17.03	67	v	159	89	38	103	18	59	108		
C 17.04	36	m	154	50	63	81	10	46	148		
C 17.05	31	v	161	98	41	141	20	59	138		



IV.4.1.4. Familia FH18.

La familia FH18 está formada por 6 miembros repartidos en 3 generaciones, cuyas características se pueden observar en la Fig. 23. y en la Tabla 14.



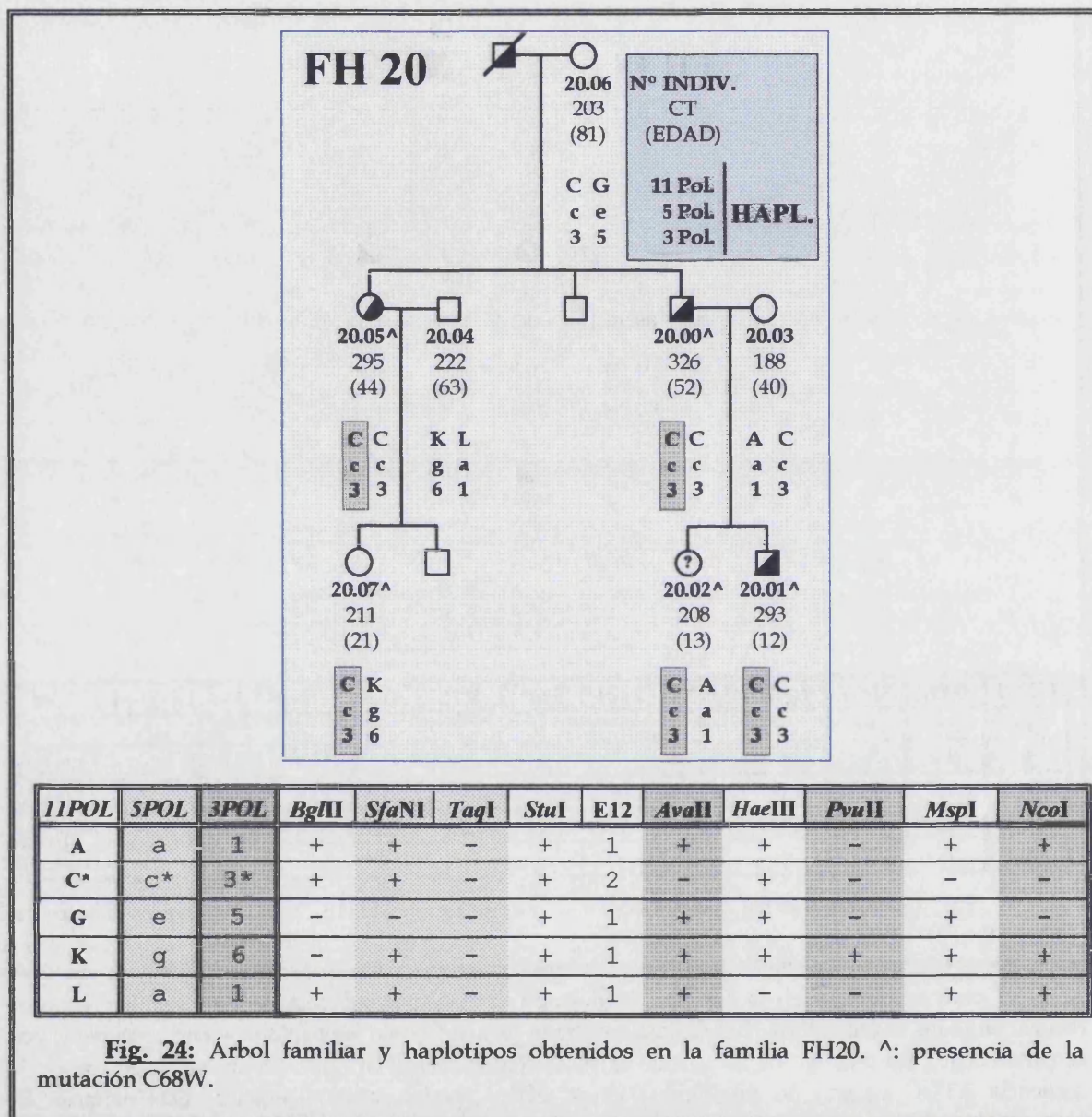
Como se observa en la Fig. 23, el diagnóstico genético indirecto de esta familia se puede realizar en todos sus miembros, habiéndose detectado A, a y 1 como los haplotipos que cosegregan con la enfermedad. Además, se ha localizado la mutación 790delATGC que supone la delección de la secuencia ATGC a partir del nucleótido 790 del cDNA, perteneciente al exón 5. Esta mutación es causante de la HF en esta familia ya que supone el cambio de pauta de lectura lo que origina un codón de parada 9 codones después de ella. El individuo ?18.04 no es portador de la alteración y, por lo tanto, no es portador de la enfermedad, al menos procedente del alelo alterado de la familia FH18.

Tabla 14: Datos clínicos y genéticos de la familia FH18.

Nº Indiv.	edad (años)	sexo	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo AI (mg/dl)	Hap. Pat.	Mutación
FH18.00	31	v	319	74	33	272	15	138	90	A, a, 1	790delATGA
FH18.01(2)	67	v	285	135	40	218	27	137	100	A, a, 1	790delATGA
FH18.02	37	m	314	73	42	257	15	139	93	A, a, 1	790delATGA
C18.03	37	v	ND								
?18.04	11	v	188	73	53	121	14	65	126		
FH18.05	10	v	295	35	58	230	7	110	125	A, a, 1	790delATGA

IV.4.1.5. Familia FH20.

La familia FH20 está formada por 10 individuos de los cuales se han podido estudiar 8, cuyos datos se pueden ver en la Fig. 24 y en la Tabla 15.



El diagnóstico genético indirecto de esta familia no se puede realizar con los polimorfismos estudiados, debido a que FH20.05 y FH20.00 son homocigotos para todos los marcadores y, por tanto, para los haplotipos deducidos en el estudio familiar. Los haplotipos que cosegregan con la enfermedad son C, c y 3, según se utilicen los sistemas 11Pol, 5Pol y 3Pol, respectivamente.

En esta familia se ha encontrado la mutación C68W que origina un cambio de cisteína por triptófano en el aminoácido 68 (debido al cambio de una C por G en el nucleótido 276), esta cisteína se encuentra en la segunda repetición del dominio de unión del receptor por lo que su efecto sobre la actividad del receptor parece ser importante; además, esta cisteína está presente en todas las repeticiones del dominio de unión. C68W se ha encontrado en un familiar de diagnóstico dudoso ?20.02 y uno sano C20.07, lo que indica que ambos son portadores de la enfermedad.

RESULTADOS

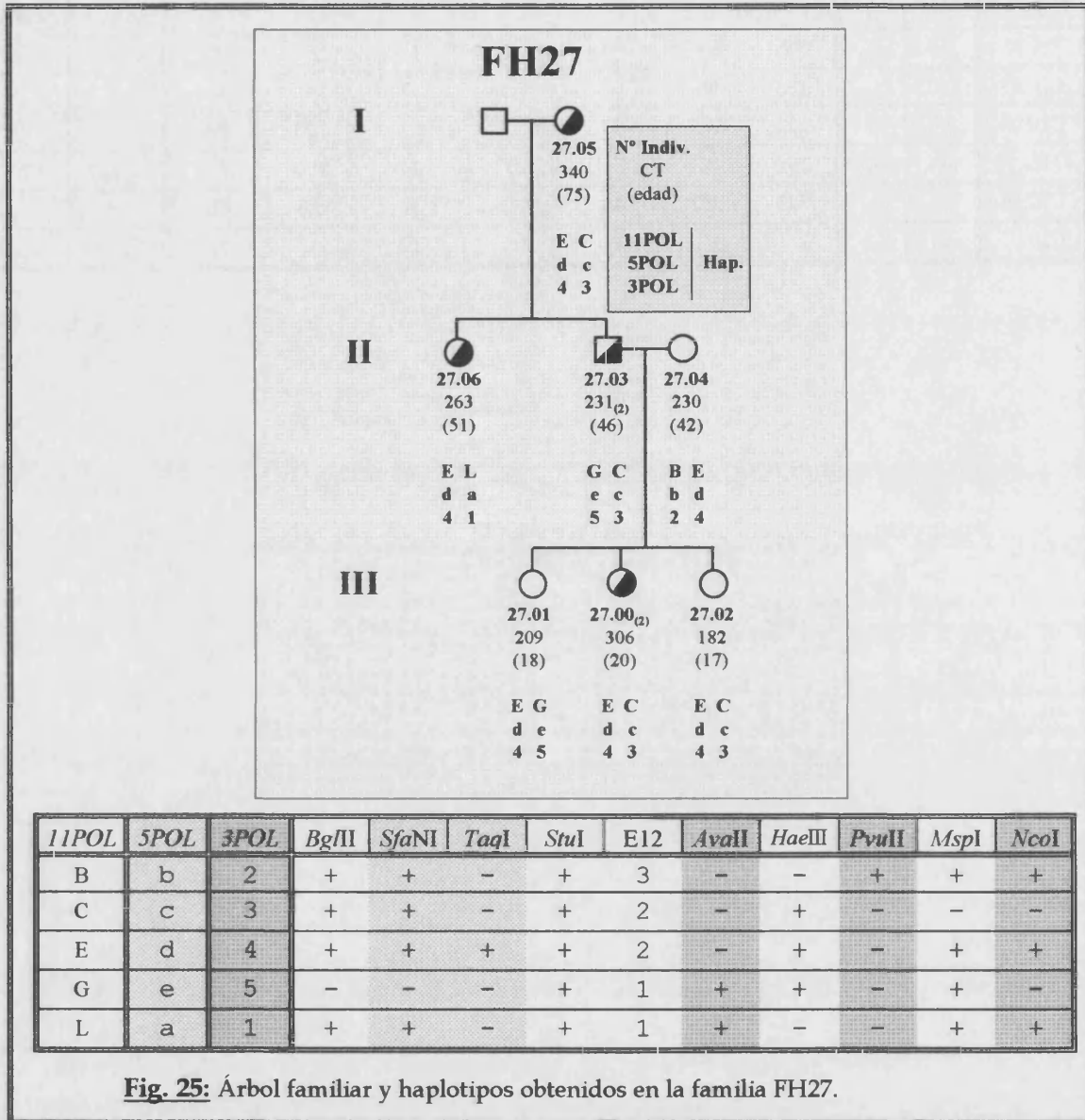
**Tabla 15:** Datos bioquímicos de los miembros de la familia FH20.

N° Indiv.	edad (años)	sexo	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo AI (mg/dl)	Hap. Pat.	Mut.
FH20.00	52	v	326	101	49	256	20	132	92	C, c, 3	C68W
FH20.01	12	v	293	78	63	214	15	130	90	C, c, 3	C68W
?20.02	13	m	208	64	40	156	12	77	97	C, c, 3	C68W
C20.03	40	m	188	88	56	115	17	60	182		
C20.04	63	v	222	138	53	142	27	126	200		
FH20.05	44	m	295	71	81	200	14	155	208	C, c, 3	C68W
C20.06	81	m	203	212	46	115	42	109	187		
C20.07	21	m	211	60	44	155	12	117	132	C, c, 3	C68W



IV.4.1.6. Familia FH27.

En la Fig. 25 se puede observar el árbol de la familia FH27, donde se muestran los haplotipos deducidos. En la Tabla 16 se exponen los datos de los miembros de esta familia.



**Tabla 16:** Características de los miembros de la familia FH27.

N° Indiv.	edad (años)	sexo	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo AI (mg/dl)	Hap. Pat.	Mutación
FH27.00 <sub>(2)</sub>	20	m	306	81	55	234	17	120	130		
C27.01	18	m	209	47	92	108	9	76	168		
C27.02	17	m	182	113	75	113	22	67	146		
FH27.03 <sub>(2)</sub>	46	v	231	116	76	132	23	116	146		
C 27.04	42	m	230	77	84	131	15	102	145		
FH27.05	75	m	340	168	34	270	36	150	116		
FH27.06	51	m	263	129	35	202	26	121	110		

En esta familia el diagnóstico genético no confirma el clínico, pues no hay un haplotipo particular que cosegregue con la enfermedad. Además, hasta ahora no hemos encontrado una mutación en el gen RLDL en los afectos de esta familia que pudiese explicar la enfermedad en ellos. De todas formas el estudio genético sugiere que podría tratarse de una familia con HF en la que:

- Los haplotipos patológicos son C, c y 3.

- C27.02 es portador de HF con un fenotipo no muy claro, si se confirma que el haplotipo patológico es el indicado anteriormente.

- FH27.06 no es enfermo de HF, aunque inicialmente se había diagnosticado clínicamente como tal pues había padecido un infarto; sin embargo, hay otros síntomas que deben ser considerados, como el hecho de que la paciente es diabética y de que sus niveles de CT y LDL-C no sean excesivamente altos.

IV.4.1.7. Familia FH28.

Las características de esta familia se encuentran en la Fig. 26 y en la Tabla 17.

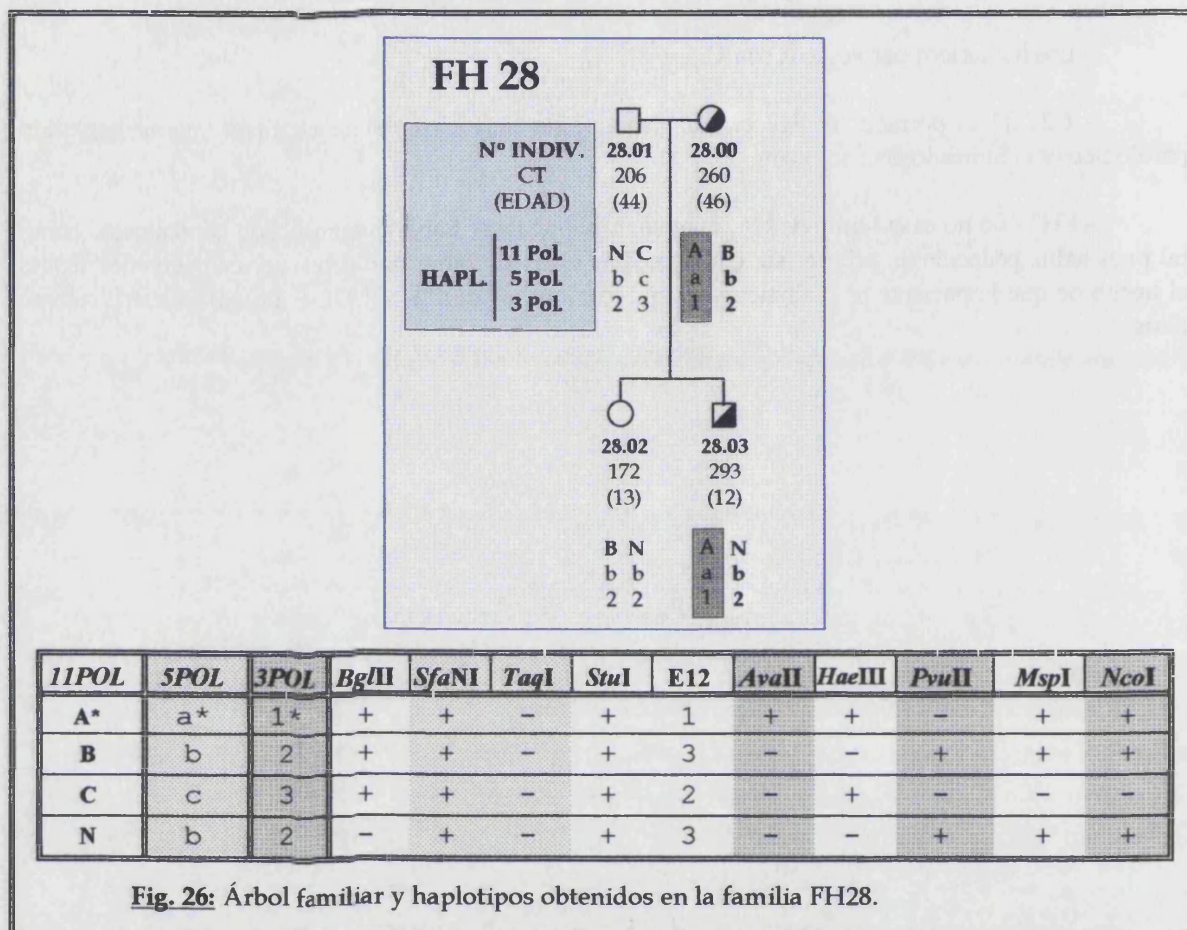


Fig. 26: Árbol familiar y haplotipos obtenidos en la familia FH28.

En esta familia el diagnóstico genético indirecto se puede realizar con todos los grupos de polimorfismos estudiados, obteniéndose como haplotipos patológicos en cada caso: A, a y 1; pero los resultados deben tomarse con precaución ya que el número de miembros de la familia es muy reducido.

Tabla 17: Datos clínicos de los miembros de la familia FH28.

	edad (años)	sexo	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo AI (mg/dl)	Hap. Pat.	Mut.
FH28.00	46	m	260	35	51	202	7	110	130	A, a, 1	
C 28.01	44	v	206	148	64	113	29	95	154		
C 28.02	13	m	172	60	79	81	12	73	146		
FH28.03	12	v	293	41	53	234	8	132	133	A, a, 1	



IV.4.1.8. Familia FH31.

Las árbol familiar y las características genéticas de la familia FH31 se pueden observar en la Fig. 27, y los datos bioquímicos de los mismos se pueden ver en la Tabla 18.

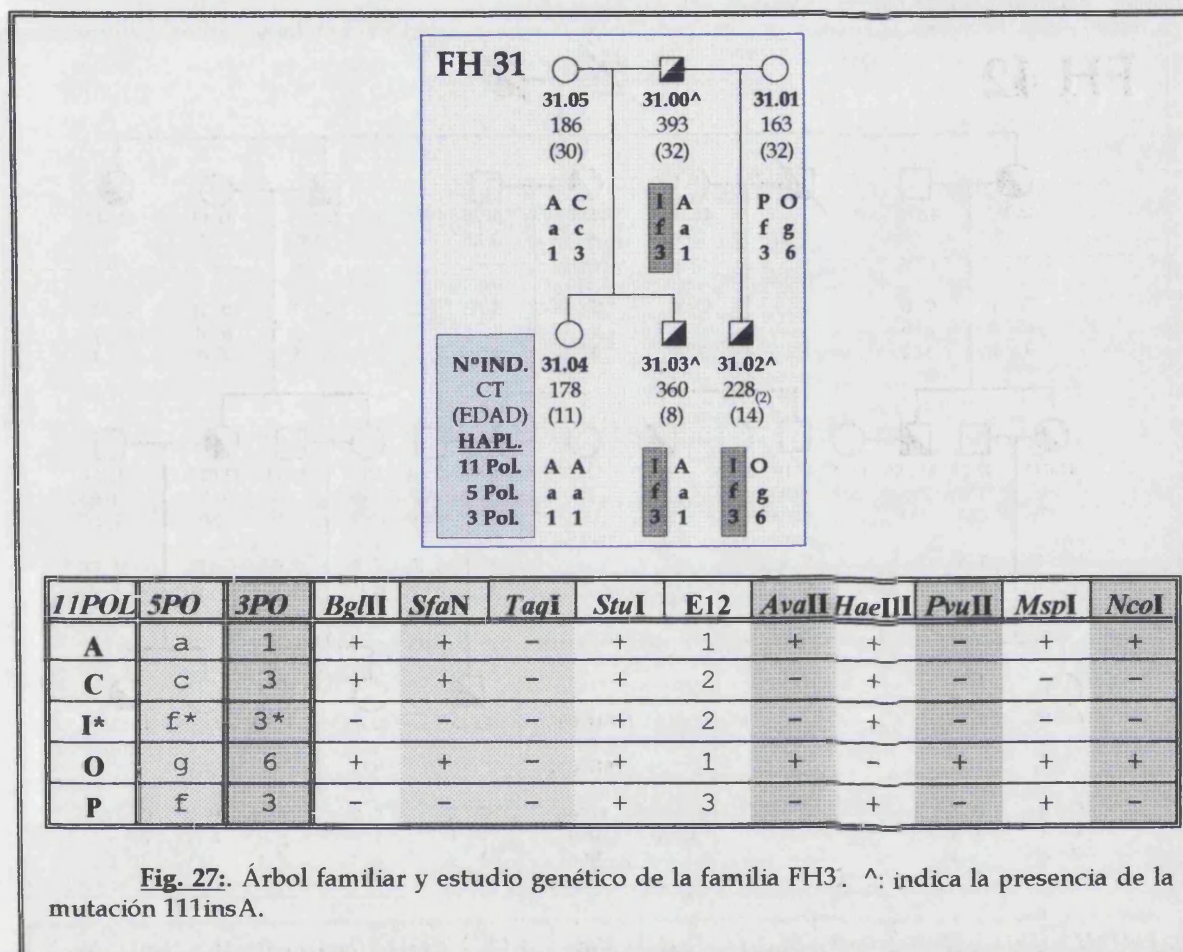


Fig. 27: Árbol familiar y estudio genético de la familia FH3. ^: indica la presencia de la mutación 111insA.

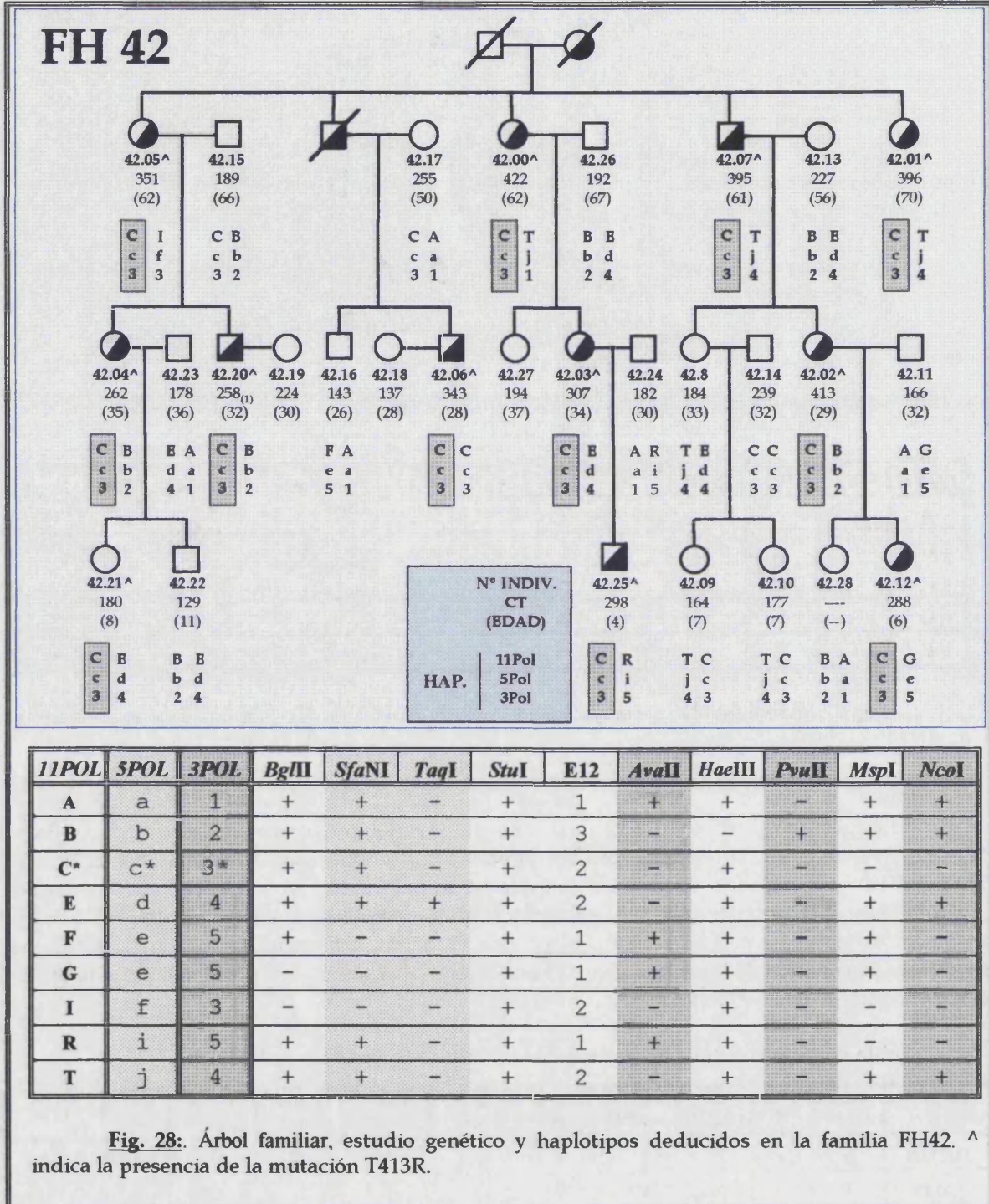
El diagnóstico genético indirecto de esta familia se puede realizar con los sistemas de 11Pol y 5Pol en todos los casos, siendo los haplotipos estudiados I y f. Utilizando el sistema 3Pol, el hijo de 31.00 y 31.05 no se podría diagnosticar, ya que no se puede saber si el haplotipo 3 procede del progenitor sano o enfermo. Si solamente se emplea el diagnóstico genético indirecto la fiabilidad de los resultados es muy baja debido al escaso número de miembros. Sin embargo, en esta familia se ha encontrado la mutación 111insA que permite corroborar el diagnóstico indirecto realizado y hacer un diagnóstico seguro de la enfermedad en sus miembros.

Tabla 18: Características bioquímicas de los miembros de la familia FH31.

	edad (años)	sexo	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo AI (mg/dl)	Hap. Pat.	Mut.
HF31.00	32	v	393	82	50	322	10	13	154	I, f, 3	111insA
C31.01	32	m	163	47	100	54	9	9	176		
HF31.02 <sup>(2)</sup>	14	v	228	127	45	157	21	14	113	I, f, 3	111insA
HF31.03	8	v	360	52	51	299	10	16	117	I, f, 3	111insA
C31.04	11	m	178	53	65	102	11	8	128		
C31.05	30	m	186	56	90	95	11	7	163		

IV.4.1.9. FAMILIA FH42.

El árbol familiar, con la segregación de haplotipos, y las características bioquímicas de esta familia se pueden ver en la Fig. 28 y en la Tabla 19.





RESULTADOS

Tabla 19: Características de los miembros de las familia FH42.

N° Indiv.	edad (años)	sexo	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo AI (mg/dl)	Hap. Pat.	Mut.
FH42.00	62	m	422	110	70	303	22	120	156	C, c, 3	T413R
FH42.01	70	m	396	142	69	304	29	182	197	C, c, 3	T413R
FH42.02	29	m	413	110	56	335	22	160	148	C, c, 3	T413R
FH42.03	34	m	307	62	60	235	12	107	84	C, c, 3	T413R
FH42.04	35	m	262	63	34	215	13	104	106	C, c, 3	T413R
FH42.05	62	m	351	116	67	271	13	164	139	C, c, 3	T413R
FH42.06	28	v	343	78	51	276	15	140	108	C, c, 3	T413R
FH42.07	61	v	395	62	73	296	8	121	160	C, c, 3	T413R
C42.08	33	m	184	93	34	132	18	89	144		
C42.09	7	m	164	51	44	110	10	62	151		
C42.10	7	m	177	48	51	117	9	66	182		
C42.11	32	v	166	63	32	122	12	61	121		
FH42.12	6	m	288	142	18	242	28	144	78	C, c, 3	T413R
C42.13	56	m	227	118	32	172	23	127	134		
C42.14	32	v	239	176	30	174	35	90	141		
C42.15	66	v	189	92	56	115	18	76	152		
C42.16	26	v	143	69	44	85	14	54	120		
C42.17	50	m	255	119	63	169	23	108	163		
C42.18	28	m	137	40	58	71	8	48	130		
C42.19	30	m	224	247	38	137	49	94	120		
FH42.20 <sub>(n)</sub>	32	v	258	95	41	198	19	111	121	C, c, 3	ET413R
C42.21	8	m	180	60	36	132	12	82	80	C, c, 3	T413R
C42.22	11	v	129	49	36	84	9	56	95		
C42.23	36	v	178	136	34	117	27	77	108		
C42.24	30	v	182	113	41	118	23	96	89		
FH42.25	4	v	298	63	77	209	12	95	85	C, c, 3	T413R
C42.26	67	v	192	71	44	134	14	82	89		
C42.27	37	m	194	54	65	118	11	68	221		
42.28		m									

De la Fig. 28 se deduce que los haplotipos patológicos son C, c y 3 para los sistemas 11POL, 5POL y 3POL, respectivamente.

En conjunto se puede decir que diagnóstico genético indirecto de esta familia se puede realizar utilizando el sistema 3POL; solamente se presenta un caso en el que el diagnóstico no es posible: el individuo FH42.05 presenta un genotipo 33 y no podemos realizar un diagnóstico genético seguro en su descendencia. En todos los demás miembros de la familia el diagnóstico es posible mediante este procedimiento. Los otros dos sistemas el diagnóstico permiten resolver en todos los casos; así, el individuo 42.05 es heterocigoto para varios de los polimorfismos incluidos en ambos sistemas y sus descendientes pueden ser ahora clasificados inequívocamente. El único problema podría plantearse en un futuro si el individuo 42.06 tuviese descendientes, pues es homocigoto para todos los polimorfismos analizados.

Se ha encontrado un individuo (C42.21) que presenta el haplotipo patogénico y presenta niveles de colesterol total (180) y de LDL-C dentro de la normalidad (132 mg/dl), corregidos para edad y sexo, según el estudio DRECE, y que son muy inferiores a los que presentan otros miembros de la familia con el haplotipo patológico (por ejemplo FH42.25 presenta un nivel de LDL-C de 209 mg/dl a los 4 años y FH42.12 presenta un nivel de 242 mg/dl). Esta niña, C42.21, había sido diagnosticada clínicamente como sana pero el análisis genético nos indica que es portadora de la enfermedad, aunque asintomática en el momento en el que se le realizaron los análisis. Por lo tanto, a esta niña se le debe hacer un seguimiento de la enfermedad e intentar que adopte hábitos que tiendan a mantener los niveles de CT normales, que ahora presenta.

En esta familia, finalmente, se ha identificado la mutación responsable de la enfermedad (T413R) que ha confirmado los resultados obtenidos mediante el diagnóstico genético indirecto y, especialmente, en el caso C42.21 ha confirmado que es portadora de la enfermedad. La mutación T413R supone la sustitución de la treonina 413 por una arginina (cambia el codón 413 de ACG a AGG).

IV.4.10. FAMILIA FH44.

Las características de la familia FH44 se pueden ver en la Fig. 29 y en la Tabla 20.

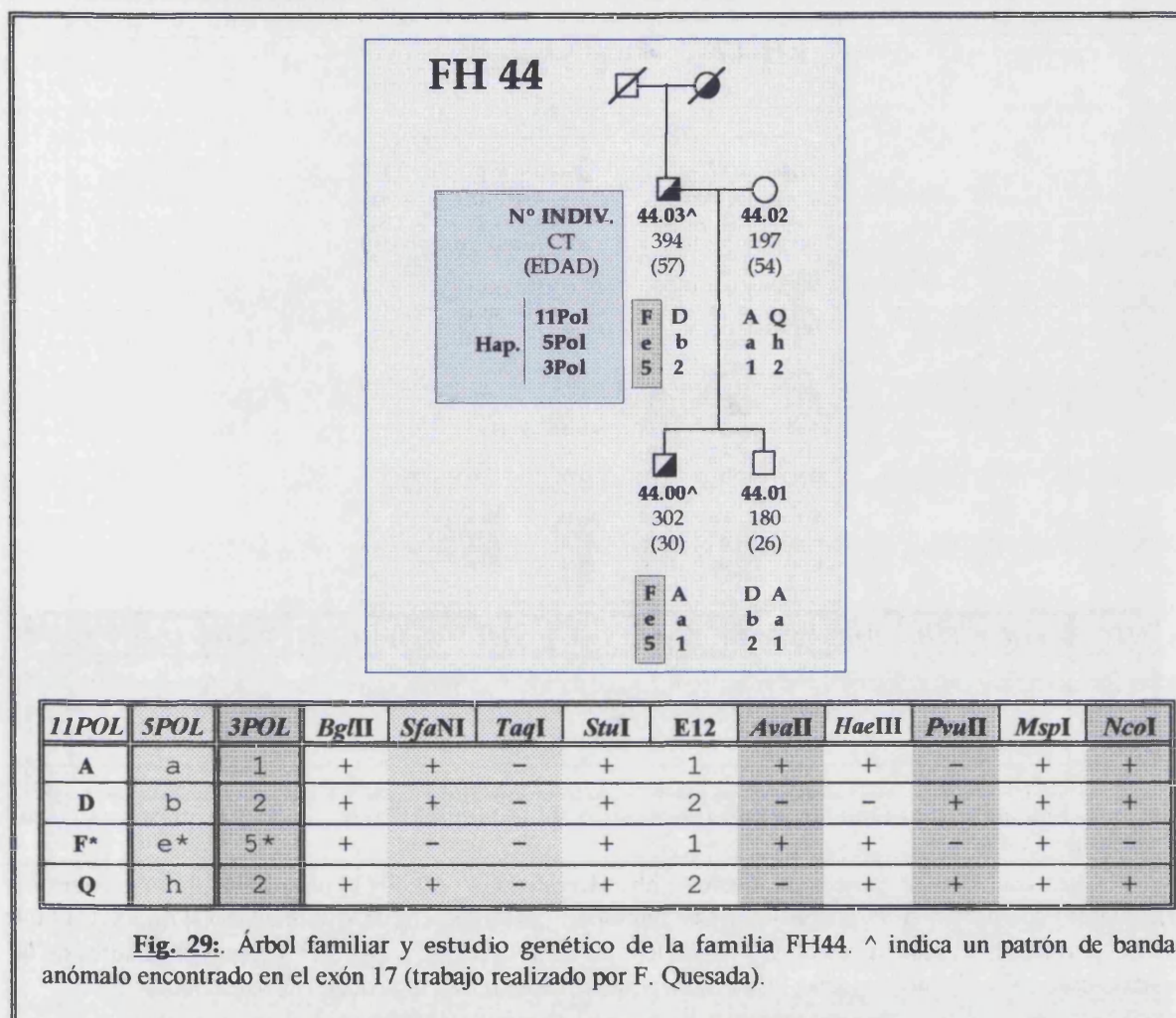


Tabla 20: Características clínicas de los miembros de la familia FH44.

	edad (años)	sexo	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo AI (mg/dl)	Hap. Pat.	Mut.
FH44.00	30	v	302	52	41	251	10	185	120	F, e, 5	E10
C44.01	26	v	180	78	56	123	15	76	152		
C44.02	54	m	197	75	41	141	15	111	123		
FH44.03	57	v	394	82	36	342	16	196	112	F, e, 5,	E10

En esta familia se observa que los haplotipos F, e y 5 cosegregan con HF, como se indica en la Fig. 29. El único problema que plantea esta familia es su reducido tamaño que obliga a considerar con precaución los resultados obtenidos. Recientemente se ha identificado un patrón de bandas anómalo en el exón 10 presente en FH44.00 y FH44.03, que podría deberse a la mutación causante de la enfermedad y, por tanto, corroborar el resultado obtenido mediante diagnóstico indirecto.



IV.4.1.11. FAMILIA FH47.

Los datos más importantes de la familia FH47 se encuentran en la Fig. 30 y en la Tabla 21.

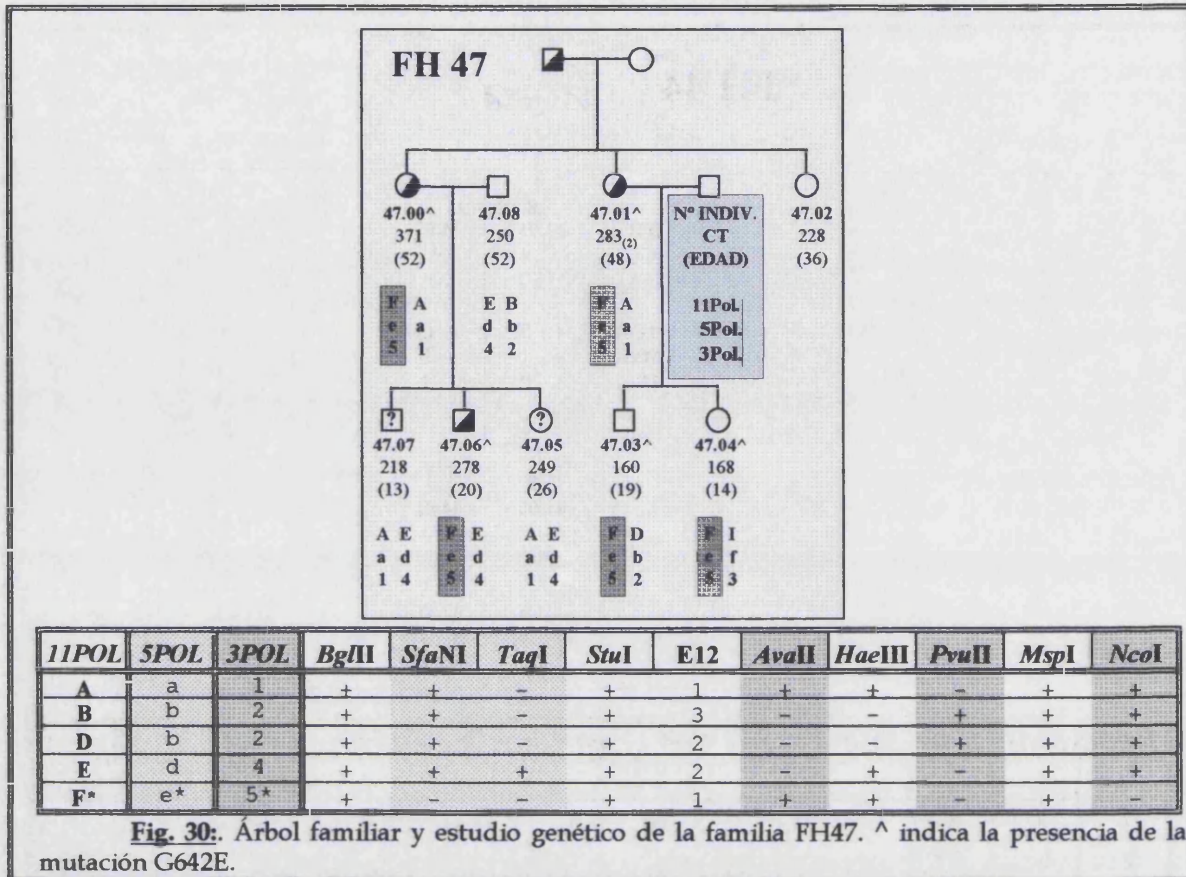


Fig. 30: Árbol familiar y estudio genético de la familia FH47. ^ indica la presencia de la mutación G642E.

Realizando el diagnóstico indirecto se observa que FH47.00, FH47.06 y FH47.01 (los enfermos HF claros) comparten el haplotipo F; si este haplotipo cosegrega con la enfermedad C47.03 y C47.04 serían portadores asintomáticos de la misma, los individuos ?47.05 y ?47.07 no serían portadores de la enfermedad y C47.02 no se podría saber al no poderse deducir con seguridad sus haplotipos.

Posteriormente, se ha identificado la mutación G642E que cosegrega con el haplotipo anterior (por tanto corrobora los resultados anteriores) y supone el cambio de la glicina 642 por un glutámico (GGA cambia a GAA). La identificación de esta mutación permite corroborar los resultados anteriores y, además, indica que C47.02 no es portador de la enfermedad.

Tabla 21: Principales características de los miembros de la familia FH47.

	edad (años)	sexo	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo AI (mg/dl)	Hap. Pat.	Mut.
FH47.00	52	m	371	69	66	291	14	132	144	F, e, 5	G642E
FH47.01(2)	48	m	283	43	68	207	8	119	149	F, e, 5	G642E
C47.02	36	m	228	82	75	137	16	85	207		
C47.03	19	v	160	44	47	104	9	60	113	F, e, 5	G642E
C47.04	14	m	168	31	67	95	6	56	159	F, e, 5	G642E
?47.05	26	m	249	62	95	142	12	91	194		
FH47.06	20	v	278	53	77	190	11	124	177	F, e, 5	G642E
?47.07	13	v	218	67	52	153	13	102	163		
C47.08	52	v	250	215	44	164	42	116	142		

IV.4.1.12. FAMILIA FH48.

Las características más importantes de la familia HF 48 se encuentran en la Fig. 31 y en la Tabla 22.

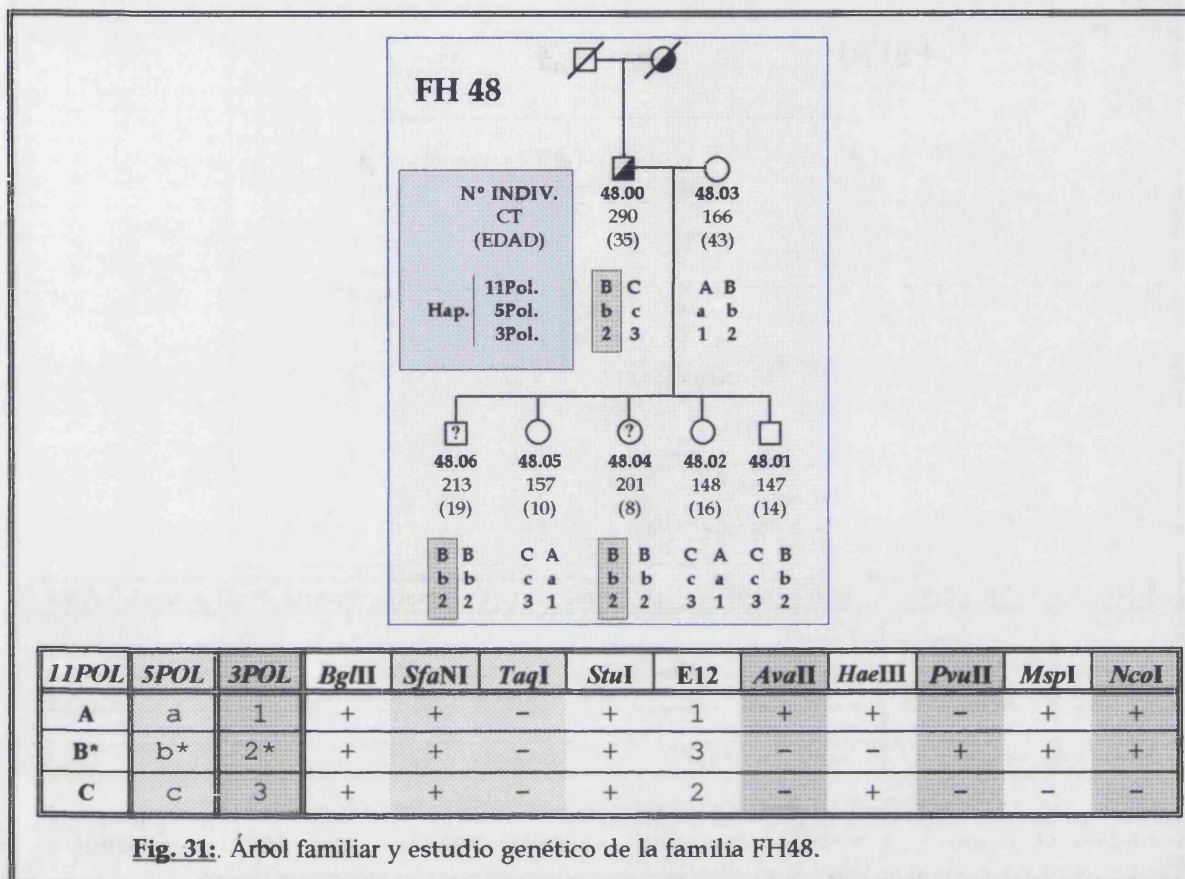


Fig. 31: Árbol familiar y estudio genético de la familia FH48.

Tabla 22: Características clínicas de los miembros de la familia FH48.

	edad (años)	sexo	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo AI (mg/dl)	Hap. Pat.	Mut.
FH4800	35	v	290	57	68	210	12			B, b, 2	
C48.01	14	v	147	40	49	90	8	55	118		
C48.02	16	m	148	33	67	76	5	51	164		
C48.03	43	m	166	173	32	100	34	75	93		
?48.04	8	m	201	48	68	124	9	74	167	B, b, 2	
C48.05	10	m	157	42	48	103	8	62	108		
?48.06	19	v	213	148	45	139	29	84	130	B, b, 2	

En esta familia se observa que los haplotipos B, b y 2 cosegregan con la enfermedad en los dos hijos clasificados como dudosos (48.04 y 48.06). Aunque no presentan niveles claramente patológicos sería aconsejable su seguimiento. Por otro lado, el diagnóstico realizado en esta familia debe ser utilizado con precaución ya que el número de miembros es bajo y algunos no muestran síntomas claros de la enfermedad.

El único problema que presenta el diagnóstico para nuevos miembros de esta familia está en que los dos miembros de la familia de la segunda generación (?48.04 y ?48.06) son homocigotos para todos los polimorfismos, por lo que el diagnóstico de su posible descendencia no se puede realizar utilizando los polimorfismos analizados hasta el momento.



IV.4.1.13. FAMILIA FH50.

Las características de los miembros de esta familia se pueden ver en la Fig. 32 y en la Tabla 23.

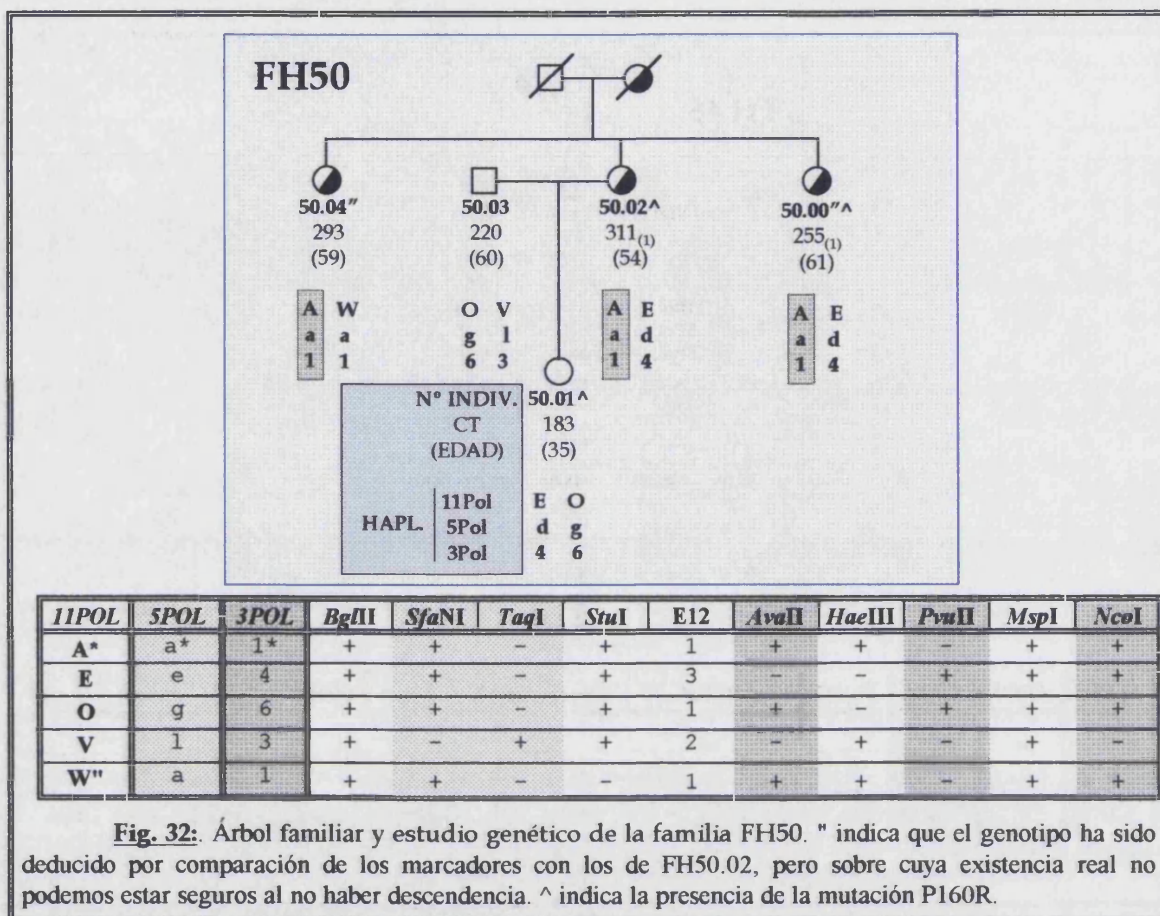


Fig. 32: Árbol familiar y estudio genético de la familia FH50. " indica que el genotipo ha sido deducido por comparación de los marcadores con los de FH50.02, pero sobre cuya existencia real no podemos estar seguros al no haber descendencia. ^ indica la presencia de la mutación P160R.

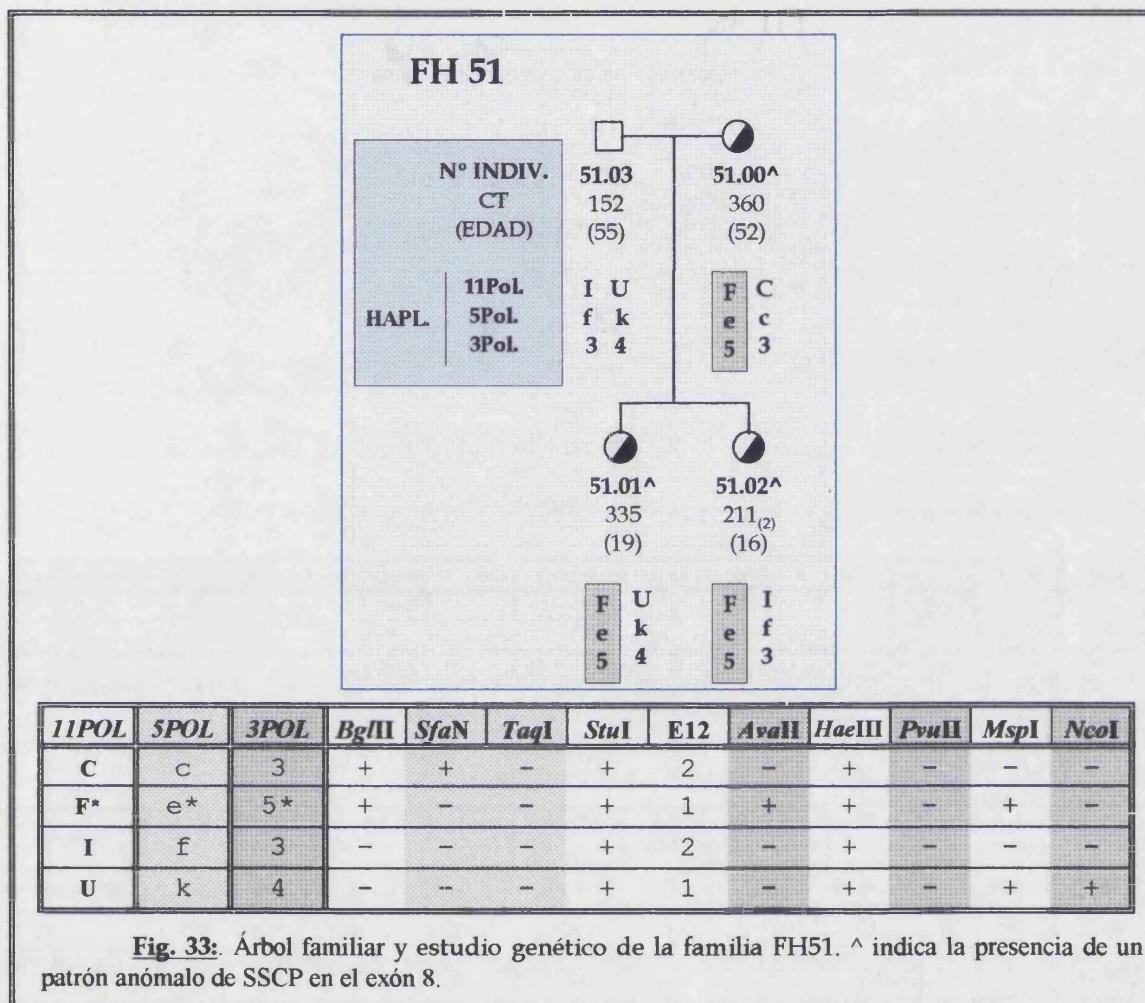
Los resultados obtenidos con esta familia deben tratarse con muchas precauciones debido al escaso número de miembros que presenta y a la imposibilidad de cerciorarnos de los haplotipos que presentan algunos de ellos. En todo caso, en principio parece que la enfermedad cosegrega con los haplotipos A, a, y l, pero recientemente se ha identificado la mutación P160R que cosegrega con el haplotipo E. Esta mutación es lo suficientemente importante como para ser la causante de la enfermedad. Si esto es así, nos encontraríamos que: a. FH50.04 no es un enfermo HF o su enfermedad está originada por otra mutación diferente a la identificada en otros miembros de la familia y localizada en el haplotipo W o en el A, ya que no podemos saber si su haplotipo A tiene el mismo origen que el de sus hermanas, FH50.02 y FH50.00; b. El haplotipo A de FH50.00 y FH50.02 no es el patológico, ya que si este haplotipo fuera portador de la enfermedad ambas hermanas serían heterocigotas compuestas, lo que contrasta con los niveles lipídicos que ambas presentan); c. C50.01 es un individuo portador de la enfermedad asintomático.

Tabla 23: Características de los miembros de la familia FH50.

	edad (años)	sexo	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo AI (mg/dl)	Hap. Pat.	Mut.
FH 50.00 <sup>(1)</sup>	61	m	255	85	62	176	17			E, d, 4	P160R
C 50.01	35	m	183	136	33	123	27	73	96	E, d, 4	P160R
FH 50.02 <sup>(1)</sup>	54	m	310	70	30	267	14			E, d, 4	P160R
C 50.03		v	220	181	37	147	36	90	112		
FH50.04	59	m	293	148	75	189	30	120	119		

IV.4.1.14. Familia FH51.

En la Fig. 33 y la Tabla 24 se pueden observar el resultado del análisis genético realizado y las características bioquímicas de esta familia.



En esta familia se observa que los haplotipos F, e y 5 segregan con la enfermedad así como la mutación detectada por análisis de SSCP en el exón 8. La identificación de ésta, por secuenciación, puede reforzar el resultado del análisis de polimorfismos, cuyo valor es limitado por el pequeño tamaño de la familias.

Tabla 24. Características de los miembros de la familia.

N° Indiv.	edad (años)	sexo	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo AI (mg/dl)	Hap. Pat.	Mut.
FH 51.00	52	v	360	159	39	289	32	143	121	F, e, 5	E8
FH51.01	19	v	335	190	30	265	38	140	90	F, e, 5	E8
FH51.02 <sub>(2)</sub>	16	m	211	60	41	158	79	95	15	F, e, 5	E8
C51.03	55	v	152	129	35	91	26	54	90		

E8: indica la presencia de un patrón anómalo de SSCP en el exón 8.



IV.4.1.15. Familia FH58.

Las características de los miembros de esta familia se pueden ver en la Fig. 34 y en la Tabla 25.

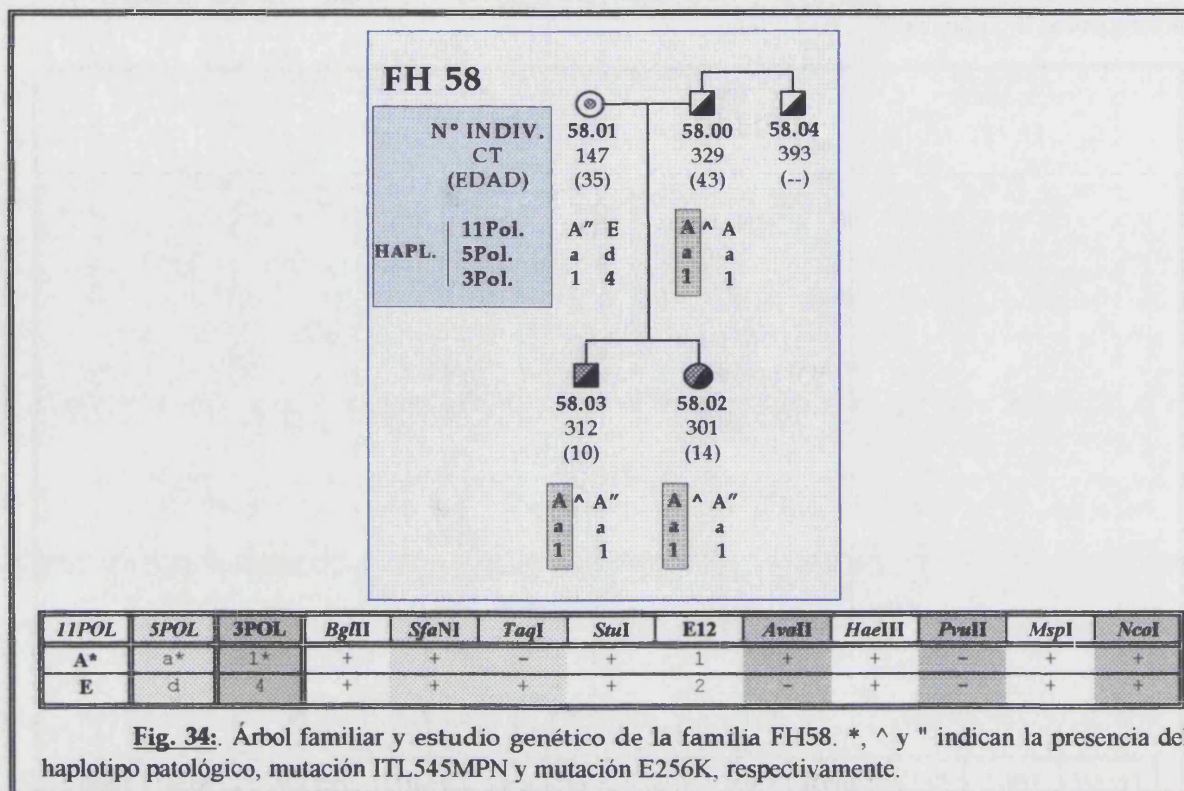


Fig. 34: Árbol familiar y estudio genético de la familia FH58. \*, ^ y " indican la presencia del haplotipo patológico, mutación ITL545MPN y mutación E256K, respectivamente.

Tabla 25: Características de los componentes de la familia FH58.

Nº Indiv.	edad (años)	sexo	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo AI (mg/dl)	Hap. Pat.	Mutación
FH 58.00	43	v	329	1125	23	156	50	104	109	A, a, 1	ITL545MPN
C58.01	35	m	147	88	50	80	17	58	167	A, a, 1	E256K
FH58.02	14	m	301	106	43	237	21	146	117	A, a, 1	ITL545MPN E256K
FH58.03	10	v	312	78	37	260	15	156	85		ITL545MPN E256K
FH58.04		v	393	208	27	325	41	184	76	¿?	¿?

¿? indica que el DNA no ha podido ser analizado por el momento.

El estudio de esta familia puede ser especialmente ilustrativo de la capacidad del diagnóstico molecular para revelar situaciones complejas que pueden ser frecuentes en el área de las dislipemias primarias. El probando, FH58.00, tiene unos niveles extraordinariamente altos de TG. Sus hijos (de 10 y 14 años) presentan niveles patológicos de CT como de LDL-C, pero normales de TG. El pequeño tamaño de la familia limita, de entrada, la validez del análisis de polimorfismos, complicado, además, por el hecho de que el probando es homocigoto para todos los polimorfismos analizados. Por lo tanto, con estos datos no podemos elaborar un diagnóstico genético indirecto.

La búsqueda de mutaciones ha permitido identificar la mutación ITL545MPN (cambia Ile-Thr-Leu por Met-Pro-Asn a partir del aminoácido 545) en FH58.00 y E256K (Glu por Lys en el aminoácido 256) en C58.01. Ambas mutaciones han sido heredadas por los dos hijos. Ya que 58.01 es sana aparentemente y sus dos hijos no presentan niveles de homocigotos podría pensarse que la mutación causante de HF es la que han heredado de su padre. Sin embargo, tal conclusión no es segura hasta que se demuestre el efecto que ambas mutaciones ejercen sobre el receptor

IV.4.1.16. Familia FH59.

Las características de los miembros de esta familia se pueden ver en la Fig. 35 y en la Tabla 26.

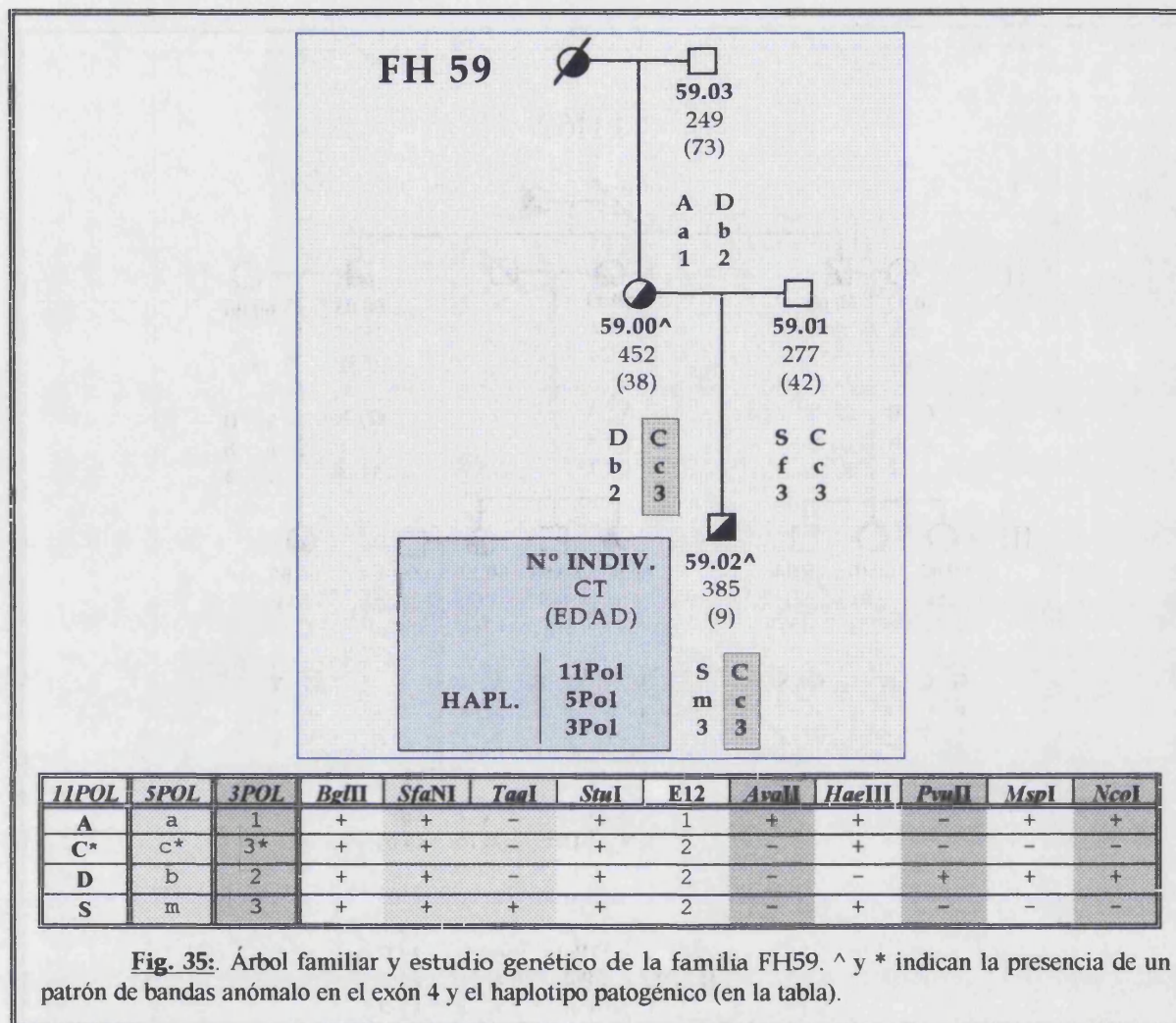


Fig. 35: Árbol familiar y estudio genético de la familia FH59. ^ y \* indican la presencia de un patrón de bandas anómalo en el exón 4 y el haplotipo patogénico (en la tabla).

En esta familia se observa que los haplotipos C, c, 3 cosegregan con la enfermedad así como un patrón anómalo de SSCP encontrado en el exón 4, si bien el reducido número de miembros de la familia hace que se deban utilizar con cierta precaución estos resultados. Se puede realizar el diagnóstico en el individuo FH59.02 con cualquier sistema de polimorfismos, pero su descendencia necesitaría ser analizada al menos con el sistema 5Pol. para poder ser diagnosticada.

Tabla 26: Características de los componentes de la familia FH59.

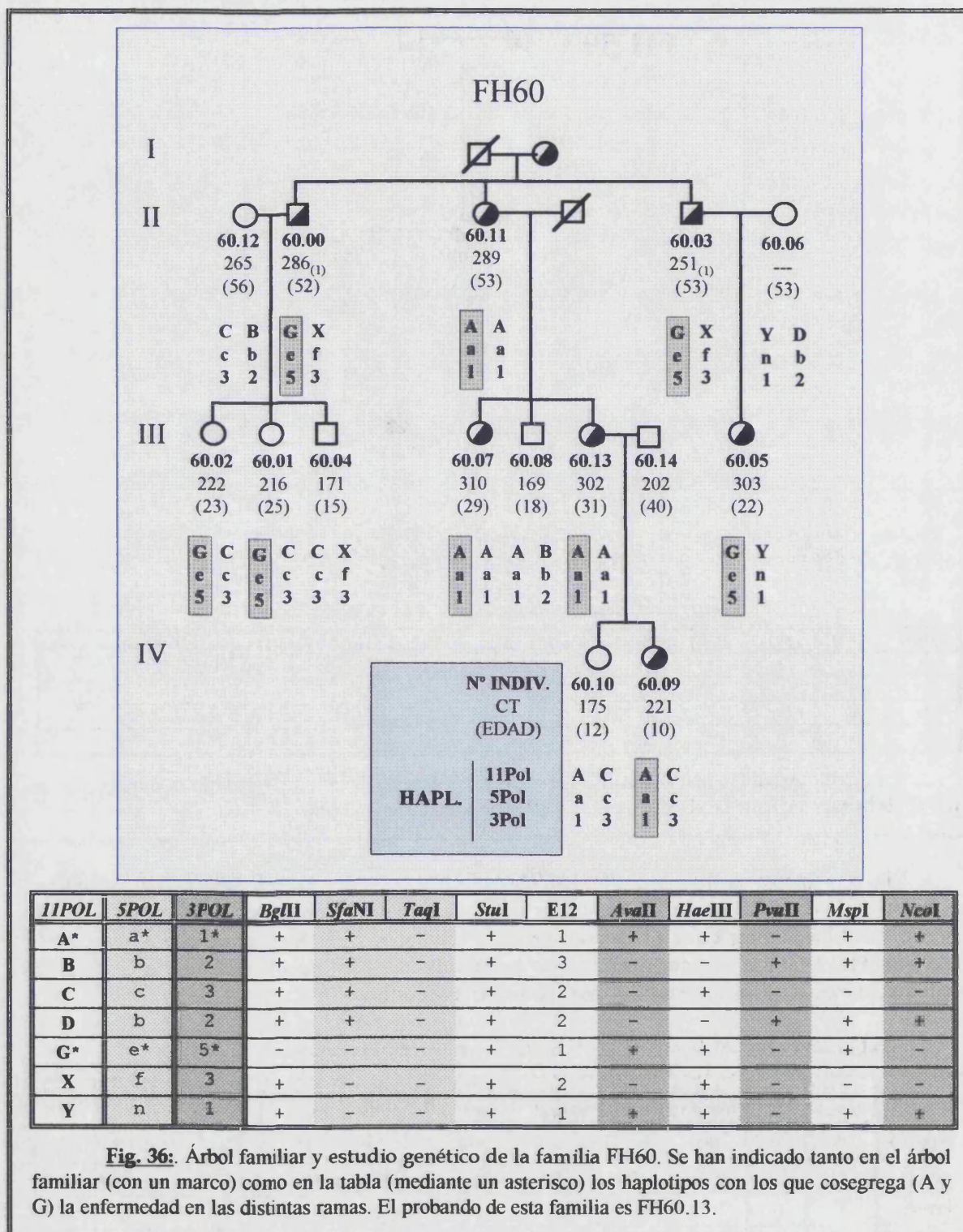
	edad (años)	sexo	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo AI (mg/dl)	Hap. Pat.	Mut.*
FH 59.00	38	v	452	63	38	402	12	176	150	C, c, 3	exón 4
C59.01	42	v	277	233	43	188	46	162	153		
FH59.02	9	m	385	71	50	321	14	168	136	C, c, 3	exón 4
C58.03	73	v	249	83	41	192	16	134	110		

\* se ha localizado un patrón de bandas de SSCP anómalo en el exón 4.



IV.4.1.17. Familia FH60.

Las características de esta familia se pueden observar en la Fig. 36 y en la Tabla 27.



RESULTADOS

**Tabla 27:** Características bioquímicas de los miembros de la familia FH60.

	edad (años)	sexo	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo AI (mg/dl)	Hap. Pat.	Mut.
FH60.00 <sup>(1)</sup>	52	v	286	240	46	192	48	100	111		
C60.01	25	m	216	79	68	133	15	75	115		
C60.02	23	m	222	88	69	141	17	76	124		
FH60.03 <sup>(1)</sup>	53	v	251	216	35	173	43	112	165		
C60.04	15	v	171	121	37	110	24	66	88		
FH60.05	22	m	303	88	67	218	18	143			
C60.06	53	m									
FH60.07	29	m	310	171	45	231	34	142	111		
C60.08	18	v	169	149	45	95	29	69	102		
FH60.09	10	m	221	96	56	152	19	88	105		
C60.10	12	m	175	95	44	112	19	69	96		
FH60.11	53	m	289	131	46	217	26	106	104		
C60.12	56	m	265	124	32	208	25	111	83		
FH60.13	31	m	302	156	44	227	31	116	105		
C60.14	40	v	202	193							

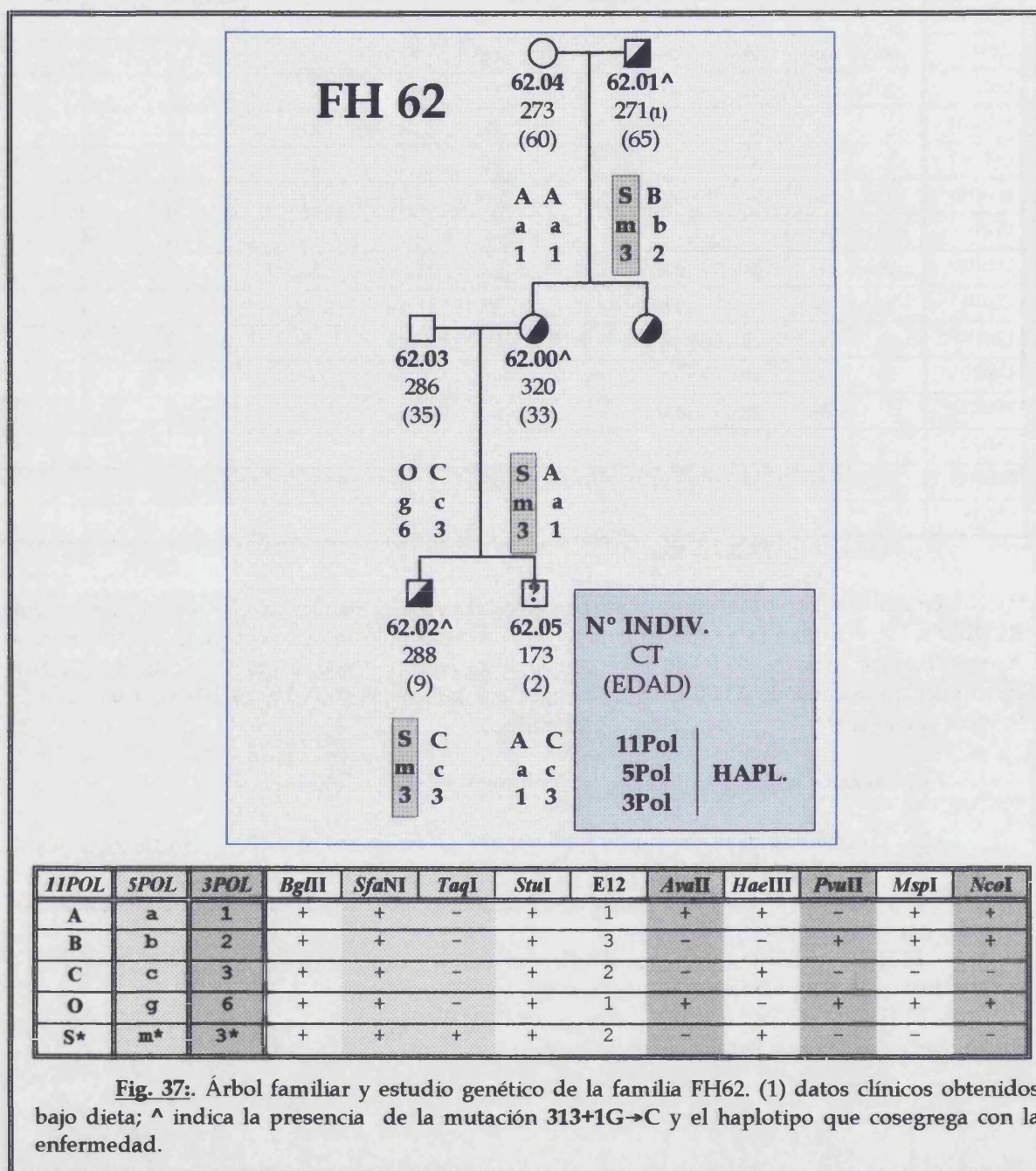
El probando de la familia es FH60.13.

En esta familia parece que no existe cosegregación entre el diagnóstico clínico realizado y el gen RLDL (Fig. 36 y Tabla 27), ya que en la rama 60.11 el fenotipo patológico cosegrega con el haplotipo A, mientras que en la de 60.03 lo hace con G. Este haplotipo podría cosegregar también con la enfermedad en la rama de 60.00 aunque los hijos que la heredan (60.01 y 60.02) no tienen niveles lipídicos patológicos y serían, por lo tanto, asintomáticos.

Esta situación se puede explicar de varias formas, algunas de ellas son:

- Los progenitores de la generación I, ambos, son heterocigotos para HF y los haplotipos A y G provienen cada uno de un progenitor distinto.
- El progenitor afecto de la generación I es heterocigoto compuesto y sus cromosomas son definidos por los haplotipos A y G.
- El alelo defectuoso del gen RLDL ha sufrido recombinación en el individuo 60.11, originándose un haplotipo diferente al que presentan sus dos hermanos.
- El defecto no se encuentra en el gen RLDL en alguna de las ramas o en ninguna y la enfermedad es debida a un defecto en un gen diferente.

IV.4.1.18. Familia FH62.



Las características de esta familia se pueden ver en la Fig. 37 y en la Tabla 28.

En esta familia se observa que los haplotipos S, m y 3 cosegregan con la enfermedad. En ella se puede realizar el diagnóstico con cualquiera de los sistemas de marcadores empleados, pero la descendencia de 62.02 necesitaría ser analizada con el sistema 5Pol como mínimo para poder ser diagnosticada, en la primera generación. En el intrón 3 se ha identificado la mutación 313+1G→C que podría ser la causante de la HF y, por lo tanto, corroborar el resultado obtenido mediante diagnóstico indirecto. Esta mutación permite realizar el diagnóstico genético directo de la enfermedad en los miembros de esta familia. El niño ?62.05 no es portador de la enfermedad, al menos procedente de

RESULTADOS

FH62.00, si bien sus niveles de CT y LDL-C elevados pueden tener su origen en la herencia recibida de C62.03.

**Tabla 28:** Características de los componentes de la familia FH62.

	edad (años)	sexo	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo AI (mg/dl)	Hap. Pat.	Mutación
FH62.00	33	m	320	84	53	251	16	130	104	W, m, 3	313+1G→C
FH62.01	65	v	271	106	66	183	21	97	124	W, m, 3	313+1G→C
FH62.02	9	v	288	96	48	221	19	107	85	W, m, 3	313+1G→C
Y62.03	35	v	286	138	45	214	27	84	119		
C62.04	60	m	273	103	86	197	20	105	106		
762.05	2	v	173	91	48	127	18	81	108		



**IV.4.2. Haplotipos Encontrados y Orden de Máxima Informatividad.**

Mediante el conocimiento de los haplotipos y el número de veces que aparece cada uno de ellos, se puede calcular el orden teórico de utilización de los polimorfismos para obtener la máxima capacidad diagnóstica utilizando el mínimo número de polimorfismos (orden de máxima informatividad).

**IV.4.2.1. Análisis con 11 Polimorfismos (*Bgl*III, *Sfa*NI, *Taq*I, *Stu*I, *Hinc*II-C-T<sub>1725</sub>, *Ava*II, *Hae*III, *Pvu*II, *Msp*I, *Nco*I): Haplotipos Identificados.**

El total de haplotipos independientes sanos y patológicos obtenidos mediante el análisis de los 11 polimorfismos (indicados con letras mayúsculas en las figuras de las familias), se pueden ver en la Tabla 29.

**Tabla 29:** Haplotipos encontrados utilizando 11 polimorfismos. Los haplotipos se designan con letras mayúsculas. En las columnas C y HF se muestra el número de veces que aparece cada haplotipo sano y patológico en individuos no relacionados, respectivamente, y entre paréntesis, el porcentaje que representan del total de cromosomas. Se indica como E12 los resultados conjuntos del sistema trialélico constituido por los polimorfismos (C→T)<sub>1725</sub> e *Hinc*II, ya que son resultantes del análisis de este exón, los números indican: 1= *Hinc*II (-) 1725 (C); 2= *Hinc*II (+) 1725 (C); 3= *Hinc*II (+) 1725 (T), el cuarto haplotipo posible *Hinc*II (-) 1725 (T) no se ha encontrado en nuestra muestra (ver tesis de O. Puig, 1996).

HAP.	<i>Bgl</i> III	<i>Sfa</i> NI	<i>Taq</i> I	<i>Stu</i> I	E12	<i>Ava</i> II	<i>Hae</i> III	<i>Pvu</i> II	<i>Msp</i> I	<i>Nco</i> I	C (%)	HF (%)
A <sup>(1)</sup>	+	+	-	+	1	+	+	-	+	+	18 (24.0)	4 (26.6)
B <sup>(2)</sup>	+	+	-	+	3	-	-	+	+	+	10 (13.3)	1 (6.6)
C	+	+	-	+	2	-	+	-	-	-	12 (16.0)	3 (20.0)
D	+	+	-	+	2	-	-	+	+	+	4 (5.3)	
E	+	+	+	+	2	-	+	-	+	+	8 (10.6)	
F	+	-	-	+	1	+	+	-	+	-	3 (4.0)	3 (20.0)
G	-	-	-	+	1	+	+	-	+	-	3 (4.0)	
H	+	+	-	+	2	+	+	-	+	+	1 (1.3)	
I	-	-	-	+	2	-	+	-	-	-	2 (2.6)	3 (20.0)
J	-	+	-	+	2	-	-	+	+	+	1 (1.3)	
K	-	+	-	+	1	+	+	+	+	+	1 (1.3)	
L	+	+	-	+	1	+	-	-	+	+	1 (1.3)	
M <sup>(3)</sup>	+	+	-	-	2	-	-	+	+	+	2 (2.6)	
N	-	+	-	+	3	-	-	+	+	+	1 (1.3)	
O	+	+	-	+	1	+	-	+	+	+	2 (2.6)	
P	-	-	-	+	3	-	+	-	+	-	1 (1.3)	
Q	+	+	-	+	2	-	+	+	+	+	1 (1.3)	
R	+	+	-	+	1	+	+	-	-	-	1 (1.3)	
S	+	+	+	+	2	-	+	-	-	-		1 (6.6)
T	+	+	-	+	2	-	+	-	+	+	1 (1.3)	
U	-	-	-	+	1	-	+	-	+	+	1 (1.3)	
V	+	-	+	+	2	-	+	-	+	-	1 (1.3)	
W	+	+	-	-	1	+	+	-	+	+	1*	
X	+	-	-	+	2	-	+	-	-	-	1*	
Y	+	-	-	+	1	+	+	-	+	+	1*	
<b>Nº de haplotipos independientes:</b>											<b>75</b>	<b>15</b>

<sup>(1)</sup> indica que uno de los haplotipos procede de 26.05 y otro de 26.06, <sup>(2)</sup> indica que un haplotipo procede de 26.06 y <sup>(3)</sup> indica que un haplotipo procede de 26.05, estos individuos pertenecen a la familia FH26 que presenta una gran alteración y que se estudia en la Tesis Doctoral de O. Puig; \* indican haplotipos que no se han utilizado en el estudio del orden de informatividad, debido a que son haplotipos deducidos de forma indirecta y no se tiene la certeza de que existan.



De la Tabla anterior se deduce que existen varios haplotipos frecuentes (por ejemplo los haplotipos A, B y C), mientras que otros son muy poco frecuentes (por ejemplo: T, U, V, etc.) y el haplotipo S solo se ha encontrado en la población HF y no en población sana. Sin embargo, dado el tamaño de nuestra muestra, este dato no supone que existan diferencias entre la población Control y HF

El estudio de los haplotipos obtenidos de las familias analizadas (ver Tabla 29) y, siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos (Apartado III.2.9., Pag. 37), permite calcular la informatividad global o acumulada de los 11 marcadores estudiados en nuestro laboratorio. La Tabla 30 muestra el orden en el que se deberían utilizar los polimorfismos para obtener la máxima informatividad en el diagnóstico de HF en población española. Como el número de haplotipos en el grupo HF era insuficiente, se tomaron los haplotipos del grupo control para el cálculo de la informatividad.

**Tabla 30:** Informatividad acumulada de 11 polimorfismos.

<b>Polimorfismo</b>	<b>Heterocigosidad</b>	<b>PIC</b>
<i>HincII-1725</i>	0.62080	0.54074
<i>NcoI</i>	0.77796	0.74295
<i>PvuII</i>	0.82773	0.80570
<i>BglII</i>	0.85476	0.83940
<i>TaqI</i>	0.86471	0.85172
<i>HaeIII</i>	0.87324	0.86165
<i>StuI</i>	0.87609	0.86517
<i>SfaNI o MspI</i>	0.87716	0.86650
<i>MspI o SfaNI</i>	0.87751	0.86694
<i>AvaII</i>	0.87751	0.86694

El valor PIC acumulado que hemos obtenido indica que, teóricamente, en el 86.69% de los descendientes en los que conozcamos el genotipo de sus antecesores podremos deducir si han heredado o no el haplotipo patológico. Además, el valor PIC acumulado también indica que los seis primeros polimorfismos permiten obtener ya una información importante y que la adición de los restantes solo será significativo en familias particulares.

**IV.4.2.2. Análisis con 5 Polimorfismos (*Sfa*NI, *Taq*I, *Ava*II, *Pvu*II y *Nco*I).**

Los haplotipos correspondientes a los 5 polimorfismos estudiados por mí (*Sfa*NI, *Taq*I, *Ava*II, *Pvu*II y *Nco*I) de los alelos sanos y HF de los miembros de dichas familias se encuentran en la Tabla 31, donde se puede observar el número de ocasiones en las que ha aparecido cada haplotipo (en individuos no relacionados).

**Tabla 31:** Haplotipos encontrados utilizando 5 polimorfismos.

	a	b	c	d	e	f	g	i	j	k	l	m	n	N°
<i>Sfa</i> NI	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	
<i>Taq</i> I	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
<i>Ava</i> II	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	
<i>Pvu</i> II	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Nco</i> I	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	
C (%)	20 <sup>(1)W</sup> (26.6)	19 <sup>(2)</sup> (24.0)	12 (16.0)	8 (10.6)	6 (8.0)	3 <sup>X</sup> (4.0)	3 (4.0)	1 (1.3)	1 (1.3)	1 (1.3)	1 (1.3)		Y	75
HF (%)	4 (26.6)	1 (6.6)	3 (20.0)		3 (20.0)	3 (20.0)						1 (6.6)		15

HF y C indican el número de haplotipos encontrados en los grupos de población HF y Control y, entre paréntesis se indica el porcentaje del total que representa cada uno, N° indica el número total de haplotipos encontrados <sup>(1)</sup> indica que uno de los haplotipos procede de 26.05 y otro de 26.06; los superíndices W, X e Y indican la presencia de los haplotipos W, X e Y indicados en la Tabla 30, estos haplotipos no han sido utilizados para ningún cálculo al haber sido deducidos y no poderse comprobar su presencia de forma definitiva.

El orden de máxima informatividad de estos 5 polimorfismos se puede deducir a partir de los haplotipos obtenidos con ellos (ver Tabla 32), obteniéndose el orden de máxima informatividad y el PIC acumulado de estos polimorfismos.

**Tabla 32:** Heterocigosidad y valor PIC acumulados de los cinco polimorfismos.

Polimorfismo	Heterocigosidad	PIC
<i>Ava</i> II	0.48000	0.36480
<i>Nco</i> I	0.69673	0.63184
<i>Pvu</i> II	0.79111	0.75912
<i>Sfa</i> NI	0.81991	0.79677
<i>Taq</i> I	0.82382	0.80199

**IV.4.2.3. Análisis con 3 Polimorfismos (*AvaII*, *PvuII* y *NcoI*).**

Los polimorfismos *AvaII*, *NcoI* y *PvuII* se pueden analizar mediante amplificación por PCR largo y digestión con las enzimas correspondientes simplificando la realización del diagnóstico genético indirecto. Para comprobar su capacidad diagnóstica se han utilizado estos tres polimorfismos en el análisis de las familias reclutadas, observándose que en 15 de 17 familias hay cosegregación de un haplotipo con la enfermedad, pudiéndose confirmar el diagnóstico clínico en 13 de las 15 analizadas. Los haplotipos de individuos sanos y pacientes HF, no relacionados, se pueden ver en la Tabla 33, mientras que el orden de máxima informatividad es similar al expuesto en la Tabla 32 del Apartado anterior, ya que estos tres polimorfismos son los tres primeros de esa Tabla.

**Tabla 33:** Haplotipos encontrados en la población española, no HF, para las enzimas *AvaII*, *PvuII* y *NcoI*

	1	2	3	4	5	6	Nº
<i>AvaII</i>	+	-	-	-	+	+	
<i>PvuII</i>	-	+	-	-	-	+	
<i>NcoI</i>	+	+	-	+	-	+	
C	20 <sup>(1)W</sup>	19 <sup>(1)</sup>	16 <sup>X</sup>	10	7 <sup>Y</sup>	3	75
(%)	(26.6)	(24.0)	(21.3)	(13.3)	(9.3)	(0.04)	
HF	4	1	7		3		15
(%)	(26.6)	(6.6)	(46.6)		(20.0)		

HF y C indican el número de haplotipos encontrados en los grupos de población HF y Control, entre paréntesis se indica el porcentaje del total que representa cada uno; Nº indica el número total de haplotipos encontrados; <sup>(1)</sup> indica que uno de los haplotipos procede de 26.05 y otro de 26.06; los superíndices W, X e Y indican la presencia de los haplotipos W, X e Y indicados en la Tabla 30, estos haplotipos no han sido utilizados para ningún cálculo al haber sido deducidos y no poderse comprobar su presencia de forma definitiva.

RESULTADOS

---

#### **IV.5. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN RLDL.**

Este bloque de resultados se ha dividido en dos grandes apartados: caracterización de grandes reordenamientos y de pequeñas mutaciones (ver Fig. 6, Pag. 45). Esta separación se debe a que la metodología empleada para la detección y caracterización de los dos grandes tipos de mutaciones es completamente diferente. Las primeras han sido detectadas mediante transferencia Southern y caracterizadas, a grandes rasgos, por transferencia Southern y PCR largo, mientras que la detección de las segundas ha sido posible mediante amplificación de los diferentes exones por PCR y análisis de SSCP y su caracterización mediante amplificación por PCR y secuenciación de los productos de PCR.



**IV.5.1. Caracterización de Grandes Alteraciones.**

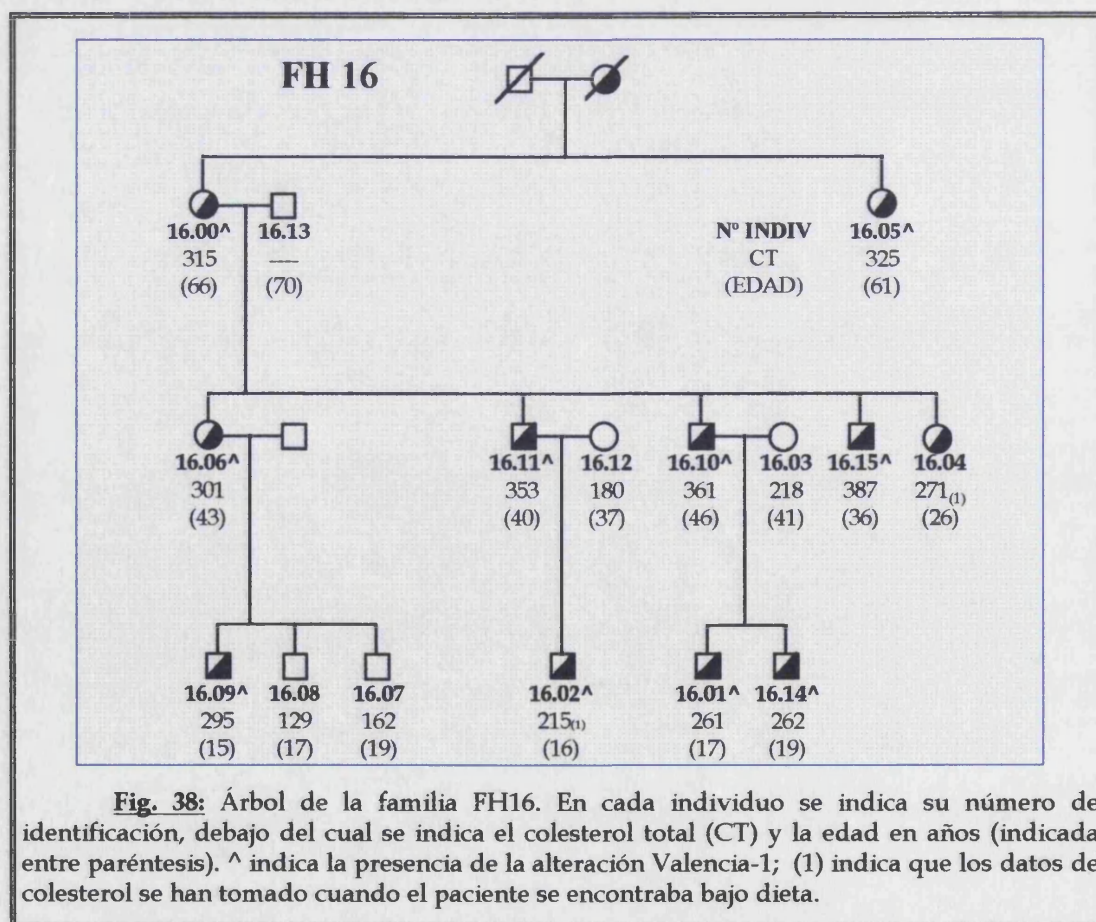
Inicialmente, analizamos el DNA de 58 pacientes diagnosticados como HF mediante digestión con *Bgl*II del DNA genómico, transferencia Southern, e hibridación con una mezcla de exones marcados con DIG. Siguiendo este procedimiento se detectaron 4 grandes alteraciones (Apartado IV.2., Pag. 48, y Fig. 9, Pag. 49); de estas alteraciones he caracterizado las correspondientes a la familia FH16 (mutación Valencia-1) y al probando FH30 (Valencia-4); las otras dos grandes alteraciones, correspondientes a las familias FH26 (Valencia-2) y FH29 (Valencia-3), han sido caracterizadas por O. Puig (para más datos ver su Tesis Doctoral). Mediante análisis de segregación del polimorfismo *Bgl*III se ha encontrado otra gran alteración (Valencia-5) en la familia FH13 (Apartado IV.4.1.2., Pag. 71).

**IV.5.1.1. Caracterización de la Alteración Valencia-1 (Familia FH16).**

El análisis por transferencia Southern del DNA genómico digerido con *Bgl*III y *Apa*LI (Apartado IV.2, Pag. 48) indicó que el probando FH16 presentaba un reordenamiento del gen RLDL, que se denominó Valencia-1. En el correspondiente análisis realizado en toda la familia, mediante digestión con *Apa*LI e hibridación con las sondas E3 y E4 (ver Fig. 38 y Tabla 34.), se observó que:

-el fragmento anómalo cosegregaba con la enfermedad.

- el individuo FH16.04 (cuyo diagnóstico clínico era de enfermo de HF, ya que sus niveles de colesterol y LDL-colesterol se encuentran, bajo dieta, en el límite utilizado para diferenciar entre sanos y enfermos HF) no presentaba la enfermedad, al menos originada por esta mutación.



**Fig. 38:** Árbol de la familia FH16. En cada individuo se indica su número de identificación, debajo del cual se indica el colesterol total (CT) y la edad en años (indicada entre paréntesis). <sup>^</sup> indica la presencia de la alteración Valencia-1; (1) indica que los datos de colesterol se han tomado cuando el paciente se encontraba bajo dieta.

RESULTADOS

**Tabla 34:** Datos bioquímicos de los componentes de la familia FH16.

Nº Indiv.	edad (años)	sexo	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo AI (mg/dl)	Mutación
FH16.00	66	m	315	157	33	279	42	129	151	D
FH16.01	17	v	261	46	49	203	9			D
FH16.02 <sup>(1)</sup>	16	v	215	46	80	156	9			D
C16.03	41	m	218	155	42	145	31	89	135	
FH16.04 <sup>(1)</sup>	26	m	271	135	55	189	27	112	197	
FH16.05	61	m	325	92	33	269	11	128	125	D
FH16.06	43	m	301	92	36	272	9	129	102	D
C16.07	19	v	162	78	36	111	15	60	120	
C16.08	17	v	129	37	42	80	7	46	112	
FH 16.09	15	v	295	53	33	252	10	144	88	D
FH 16.10	46	v	361	69	39	311	5	128	116	D
FH 16.11	40	v	353	94	43	312	13	148	136	D
C 16.12	37	m	180	56	47	123	16	65	139	
C 16.13	70	v	ND							
FH 16.14	19	v	262	128	52	185	25	97	125	D
FH 16.15	36	v	387	191	38	311	38			D

D indica la presencia de la alteración Valencia-1; (1) indica que los datos se obtuvieron cuando el paciente se encontraba bajo dieta.

Para caracterizar la alteración detectada en esta familia se realizaron diferentes digestiones del DNA genómico del probando FH16.00, que dieron los siguientes resultados:

- La digestión con *Bgl*II e hibridación con la sonda 2HH1 (exones 11 a 18) no permitió la detección de ningún fragmento anómalo, mientras que al hibridar con las sondas E3 y E4 se detectó una banda extra de 5.6 Kb (ver Fig. 39).

- Las digestiones con *Bam*HI y con *Apa*LI, independientemente, e hibridación con las sondas E3 y E4 originan una banda anormal de 19.0 y 16.5 Kb, respectivamente (ver Fig. 40). Estas bandas se observan si se hibrida con las sondas E3 o E4, pero no se observan si se hibrida con la sonda E2 ni con la E1 (datos no mostrados).

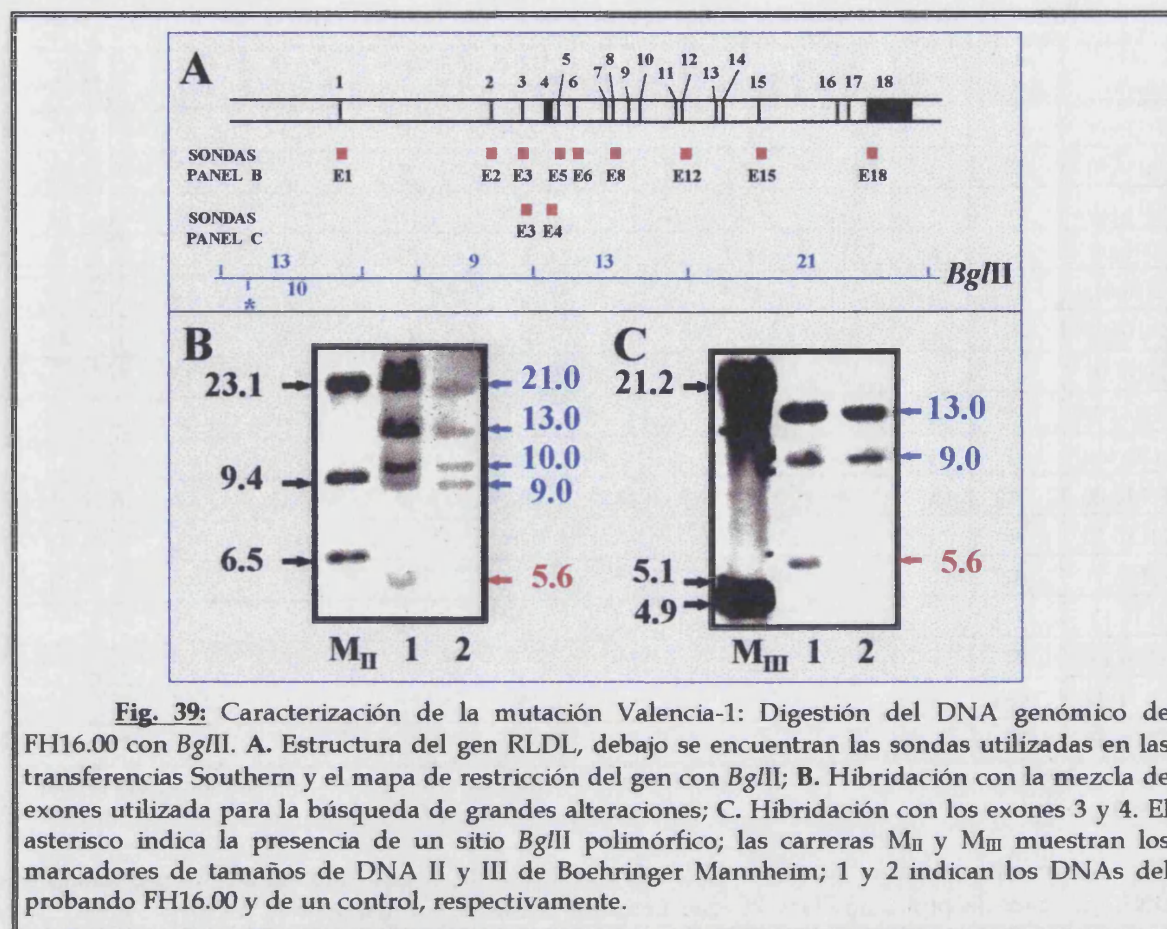
- Las digestiones con *Pvu*II y *Xba*I (ver mapa de restricción de la Fig. 41) e hibridación con la sonda 2HH1 no mostraron ningún fragmento anómalo. Lo que sugiere que el gen no se encuentra alterado desde el sitio *Pvu*II del intrón 10 hasta el final 3' del gen.

Los resultados anteriores, unidos a la segregación anormal en esta familia del polimorfismo *Sfa*NI (Fig. 8, Pag. 48) localizado en el exón 2, nos indicó que la alteración Valencia-1 se localiza en la zona 5' del gen, tratándose de una delección desde la región 5' hasta el intrón 2 (Fig. 41).

Para determinar más exactamente los límites de esta alteración se realizaron las digestiones e hibridaciones que se describen a continuación y cuyos resultados (no mostrados) se pueden contrastar con el mapa de restricción expuesto en la Fig. 41:

- La digestión con *Eco*RV e hibridación con las sondas E3 y E4 produce una banda normal de 25.0 Kb y una banda extra de 30.0 Kb, por lo que podemos suponer que el sitio *Eco*RV situado 5' respecto al exón 1 se encuentra delecionado y el exón 1 también.





**Fig. 39:** Caracterización de la mutación Valencia-1: Digestión del DNA genómico de FH16.00 con *Bgl*III. A. Estructura del gen RLDL, debajo se encuentran las sondas utilizadas en las transferencias Southern y el mapa de restricción del gen con *Bgl*III; B. Hibridación con la mezcla de exones utilizada para la búsqueda de grandes alteraciones; C. Hibridación con los exones 3 y 4. El asterisco indica la presencia de un sitio *Bgl*III polimórfico; las carreras M<sub>II</sub> y M<sub>III</sub> muestran los marcadores de tamaños de DNA II y III de Boehringer Mannheim; 1 y 2 indican los DNAs del probando FH16.00 y de un control, respectivamente.

- La digestión *Xba*I e hibridación con las sondas E3 y E4 origina un fragmento normal de 24.0 Kb y uno extra de 16 Kb, lo que nos hizo suponer que el sitio *Xba*I, situado 5' en relación al exón 1 y al sitio *Eco*RV delecionado, está intacto.

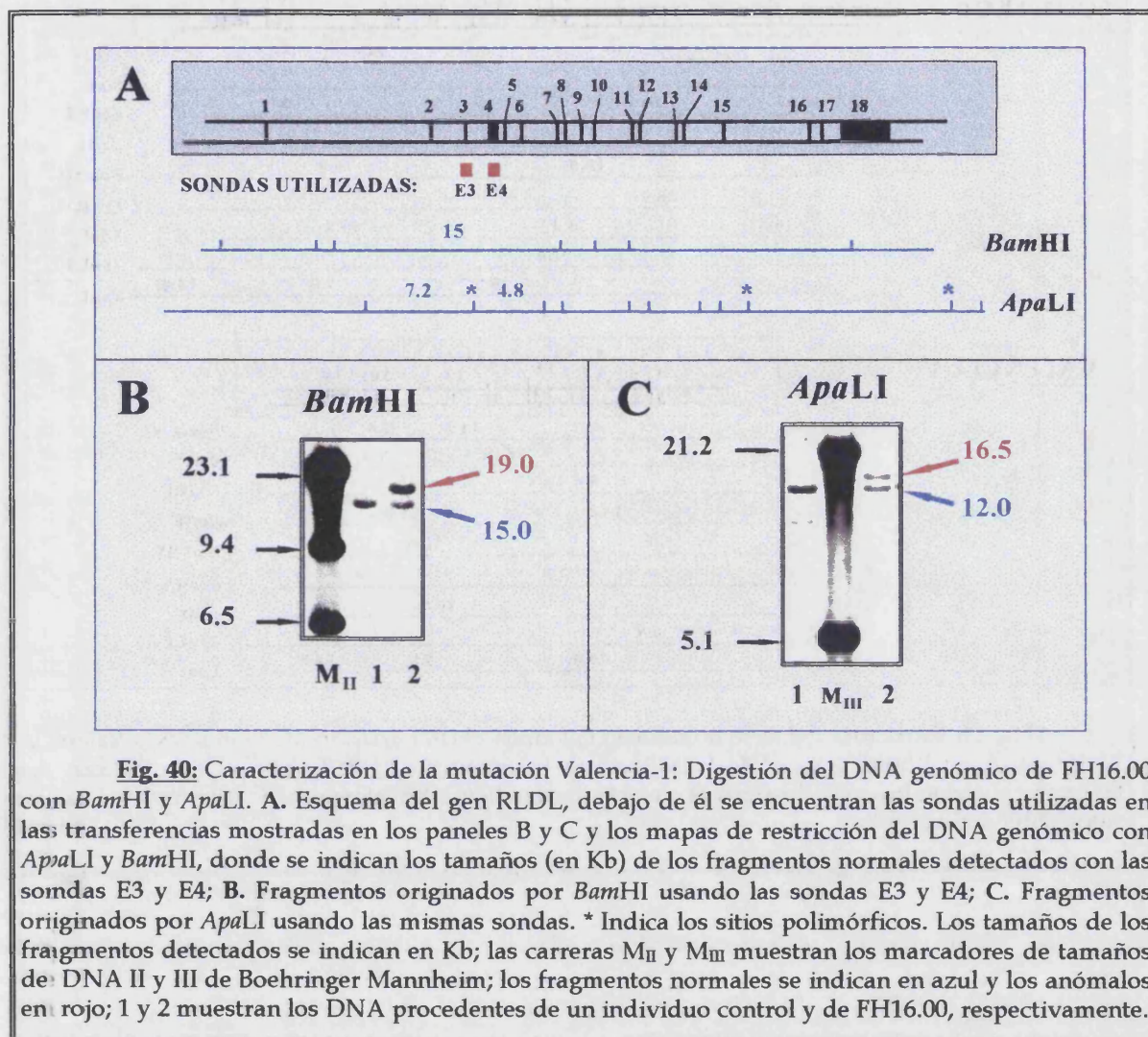
- La digestión con *Xba*I + *Bam*HI e hibridación con las sondas E3 y E4 origina un fragmento normal de 16.0 Kb y uno anormal de 10 Kb. *Bam*HI, individualmente, produce un fragmento normal de 16.0 Kb y uno anormal de 19.0 Kb, lo que supondría que este último fragmento es digerido por *Xba*I dando origen al fragmento de 10.0 Kb.

- La digestión *Bgl*III produce, tanto en digestión individual como con *Xba*I, cuando se hibrida con los exones 3 y 4, dos fragmentos de 14.0 y 9.0 Kb, presentes ambos en los controles, y uno de 5.6 Kb, presente solo en los portadores de Valencia-1.

- La digestión *Xba*I + *Kpn*I produce un fragmento de 16.0 Kb, cuando se hibrida con las sondas E3 y E4, de igual tamaño al presentado por los controles. Por lo tanto, el límite 3' de la deleción puede ser: a) en 3' del sitio *Kpn*I, que por tanto está intacto; b) el sitio *Kpn*I está delecionado y la deleción ocasiona que el siguiente sitio *Xba*I, localizado en la región 5' respecto al exón 1, se sitúe en la zona donde está el *Kpn*I (intrón 2) resultando un fragmento de tamaño similar.

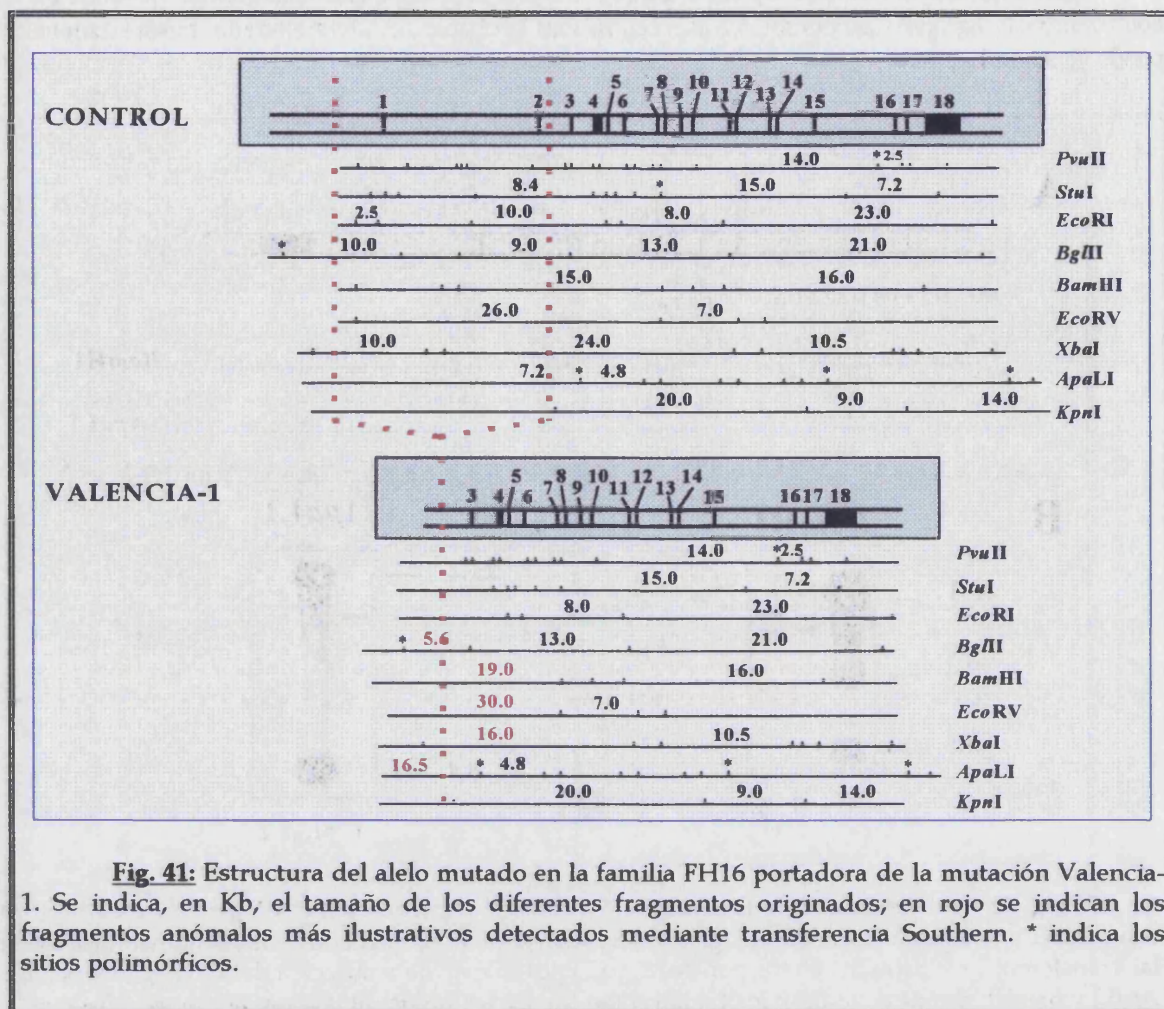
La deleción, pues, debe encontrarse entre el sitio *Kpn*I, que puede estar delecionado o no, localizado en el intrón 2 y el sitio *Xba*I presente en la región 5' del gen, que se encuentra intacto. No puede descartarse la existencia de otro sitio *Xba*I mas próximo al extremo 5' del gen, que produzca el tamaño de fragmentos observados, ya que no disponemos de los mapas de restricción de esa zona.

Las digestiones con *Stu*I, *Apa*LI + *Bam*HI, *Eco*RV + *Xba*I, todas ellas usando la sonda E3-4, confirmaron la hipótesis propuesta. La estructura más probable del alelo alterado de esta familia se puede ver en la Fig. 41



Las características de esta alteración nos indica que este alelo carece por completo de la actividad del gen RLDL, ya que no presenta el promotor y, por lo tanto, no origina mRNA para la síntesis del RLDL.





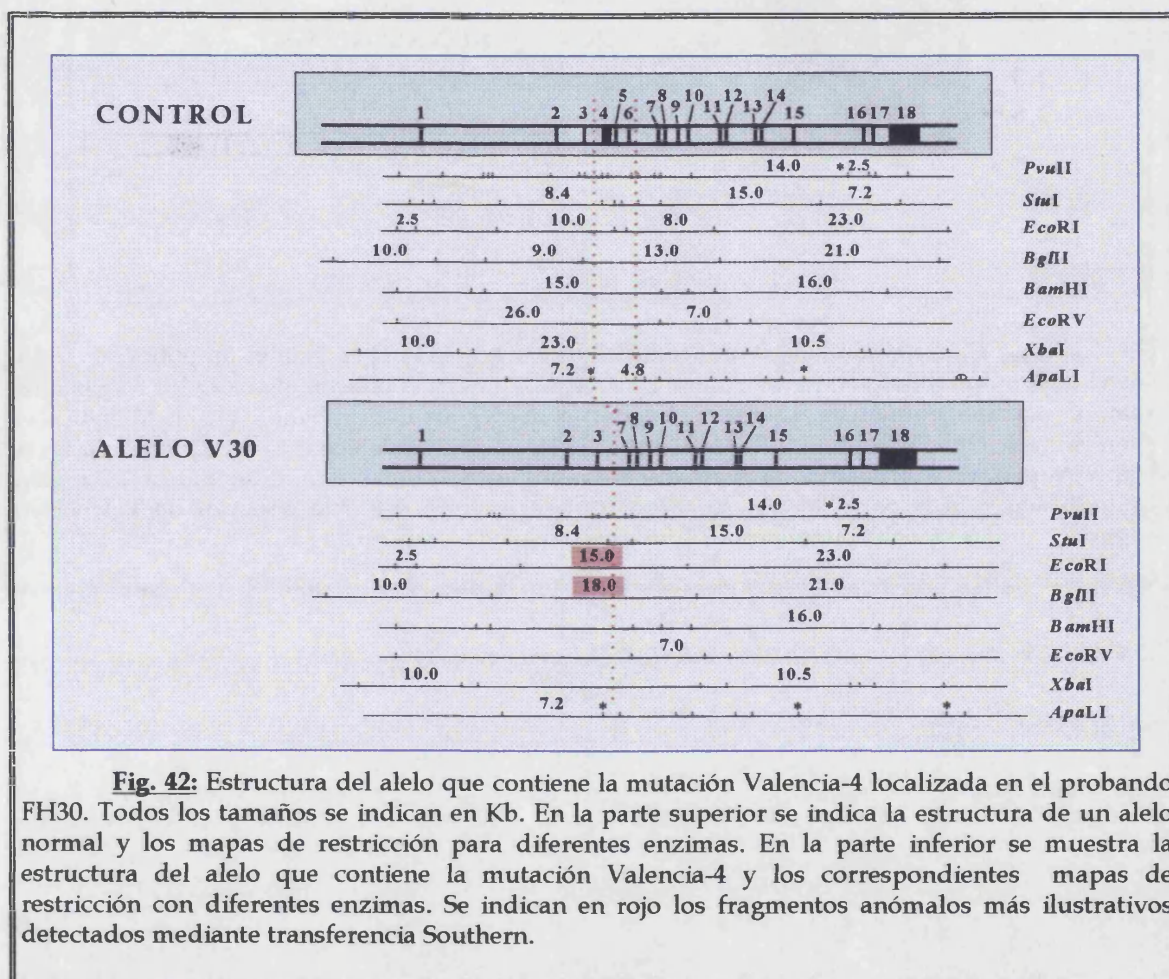
**Fig. 41:** Estructura del alelo mutado en la familia FH16 portadora de la mutación Valencia-1. Se indica, en Kb, el tamaño de los diferentes fragmentos originados; en rojo se indican los fragmentos anómalos más ilustrativos detectados mediante transferencia Southern. \* indica los sitios polimórficos.



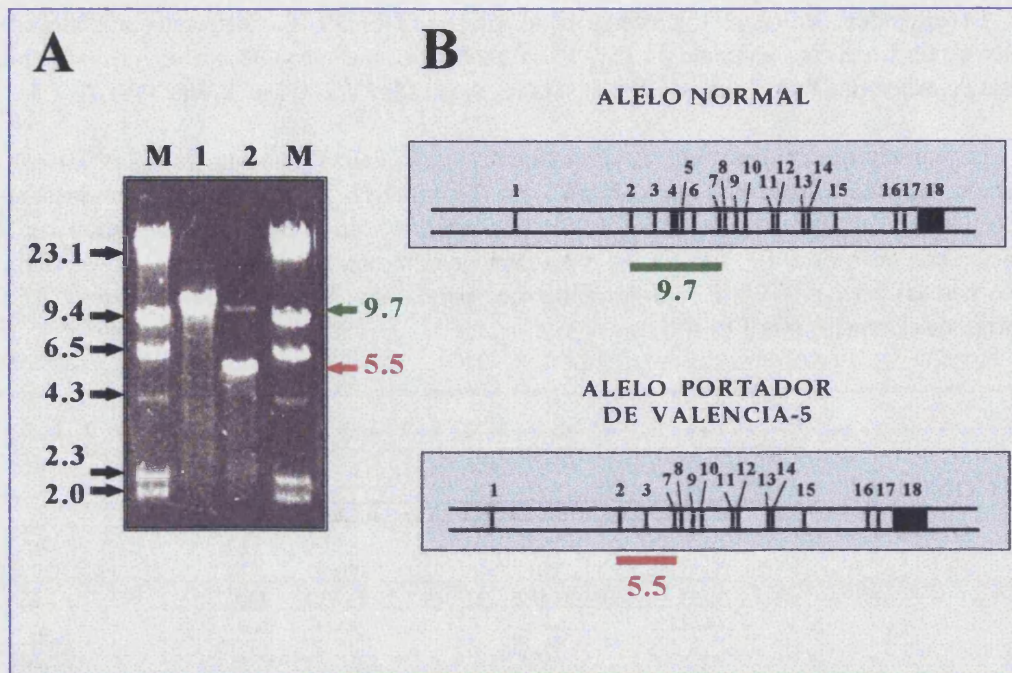
**IV.5.1.2. Caracterización de la Alteración Valencia-4 (Probando FH30).**

La alteración Valencia-4, presente en el probando FH30, fue detectada inicialmente por la aparición de un fragmento anómalo de 18.0 Kb al realizar la búsqueda general de grandes alteraciones mediante digestión de DNA genómico con *Bgl*II (ver Apartado IV.2. y Fig. 8, Pag. 48).

La caracterización más fina de esta alteración se realizó mediante la digestión con *Bgl*II e hibridación, individualmente, con las sondas E3, E5, E6 y 2HH1. En esta serie de hibridaciones solo se detectó un fragmento anómalo de 18.0 Kb con la primera sonda utilizada. La digestión con *Eco*RI e hibridación con las sondas E3, E4, E5, E6 y E7, individualmente, revela un fragmento anómalo de 15.0 Kb solo con las sondas E3 y E7. Estos datos nos permitieron suponer que los exones 4, 5 y 6 se encuentran deletados (ver Fig. 42).



Esta hipótesis fue corroborada mediante la amplificación del DNA genómico situado entre los exones 2 y 7, utilizando los oligonucleótidos P-23 (correspondiente al final del intrón 1, en dirección 3' respecto al gen) y P-54 (localizado en el inicio del intrón 7, en dirección 5'), mediante el sistema descrito en la sección de Materiales y Métodos para PCR largo (ver Tabla 7, Pag. 59). Esta amplificación proporciona un fragmento normal de 9.7 Kb y cuando, se aplica al probando FH30 origina el fragmento de 9.7 Kb, correspondiente al alelo normal, y un fragmento de 5.5 Kb resultante de amplificar el alelo en el que se los exones 4, 5 y 6 están deletados (ver Fig. 43).



**Fig. 43:** Detección de la mutación Valencia-4 por PCR largo. Se amplifica el DNA genómico comprendido entre los exones 2 y 7. **A.** Gel donde se pueden observar los fragmentos amplificados: el normal de 9.7 Kb y el anómalo de 5.5 Kb del probando FH30; M indica el marcador de tamaño molecular II de Boehringer Mannheim, 1 es un control y 2 es FH30; **B.** En la parte superior se encuentra la estructura de un alelo normal donde se indica la región amplificada y en la parte inferior se encuentra la estructura del alelo portador de Valencia-4, donde se indica la región amplificada. Todos los tamaños se indican en Kb.



#### IV.5.2. Procedimientos Experimentales Optimizados y Desarrollados para Detectar y Caracterizar Pequeñas Mutaciones.

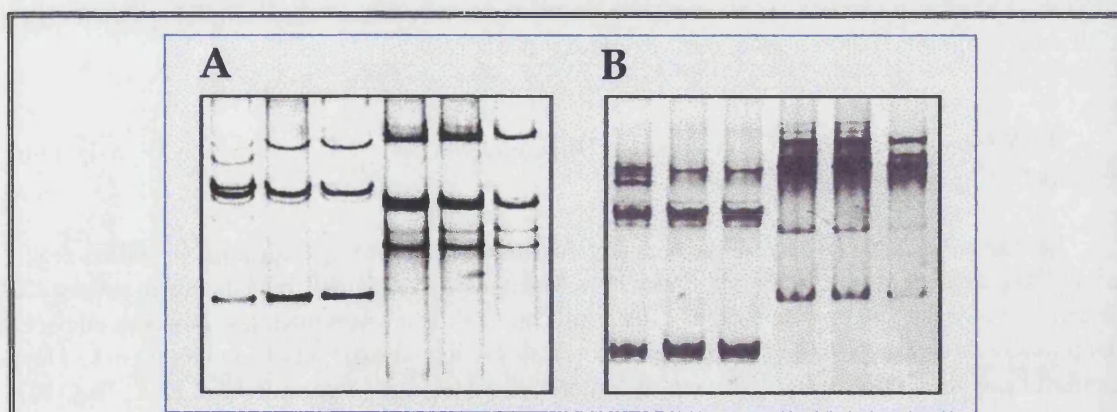
Las mutaciones puntuales responsables de HF se encuentran repartidas a lo largo de todo el gen RLDL. En cada población, el número de diferentes mutaciones pueden ser muy elevado y muchas de ellas pueden ser diferentes a las encontradas en otras poblaciones (Hobbs *et al.*, 1992; Goldstein *et al.*, 1995).

En población española, como hemos visto, solo un 10% aproximadamente de las mutaciones son grandes reordenamientos del gen RLDL, detectables mediante transferencia Southern. Este resultado implica que aproximadamente el 90 % de las mutaciones de pequeñas alteraciones o mutaciones puntuales. En nuestro caso, para realizar la búsqueda de estas pequeñas mutaciones o de mutaciones puntuales hemos empleado el análisis de SSCPs (de "single strand conformation polymorphisms") de fragmentos amplificados mediante PCR.

##### IV.5.2.1. Detección de las Mutaciones Mediante Análisis de SSCPs.

El análisis se realizó utilizando cubetas de electroforesis OWL Penguin (OWL Scientific) en las cuales se emplean geles de 10 x 10 cm que hacen cómodo su manejo. La visualización del DNA se realizó por tinción con plata, según el protocolo descrito en Materiales y Métodos (Apartado III.2.8., Pag. 36).

Cada fragmento de DNA se analizó bajo varias condiciones electroforéticas, pues no todas las condiciones permiten revelar la migración anómala de las bandas de DNA portadoras de mutación (Leren *et al.*, 1993). Los diferentes ensayos electroforéticos se realizaron usando entre 10 y 20 % de acrilamida 29:1, 0 y 20 % de glicerol, 0 y 25 °C, 300 y 450 V y 0.5 ó 1.0 x TEB. El análisis de SSCP de cada exón se realizó, finalmente en todos los individuos, bajo varias condiciones de electroforesis que permitían detectar las bandas de la forma más nítida (ver Fig. 44). La utilización de diferentes condiciones de electroforesis en el análisis de SSCP aumenta la fiabilidad de la técnica y permite, por lo tanto, detectar un mayor número de alteraciones.



**Fig. 44:** Comparación de dos condiciones de electroforesis en el análisis de SSCP de dos exones distintos. En el panel A se observan los resultados obtenidos con 15 % acrilamida, 1 x TEB, 2 °C, 400V y en el B con 15 % acrilamida, 10% glicerol, 1 x TEB, 2 °C, 400V). En el panel A se observan las bandas más nítidas, en general, que en el panel B. Según indico en el texto preferíamos utilizar condiciones que proporcionaran bandas similares a las obtenidas en el caso A frente a las obtenidas en el caso B, ya que estas bandas son muy gruesas y en algunos casos difusas, lo que dificultaría la detección de bandas anómalas.

#### **IV.5.2.2 Secuenciación de Mutaciones.**

Uno de los principales objetivos en nuestro laboratorio es la utilización de sistemas no radioactivos en el análisis genético de la HF, debido al gran número de muestras a analizar y a la mayor comodidad que esto supone. Por ello, a la hora de secuenciar las muestras de DNA en la búsqueda de mutaciones, optamos, en primer lugar, por estudiar varios métodos de secuenciación y seleccionar aquel que fuese más interesante para nuestros propósitos.

##### **IV.5.2.2.1. Secuenciación Manual.**

###### **A. Secuenciación Mediante PCR y Tinción de Plata.**

Inicialmente se realizaron pruebas con el sistema manual de secuenciación cíclica "DNA Silver Sequencing Kit" de Promega, bajo las condiciones indicadas en Materiales y Métodos (Apartado III.2.11.1, Pag. 40). Este sistema permitía la secuenciación de los fragmentos de DNA amplificados mediante PCR.

Los problemas de este sistema de secuenciación son varios pero, esencialmente, se basan en que la cantidad mínima de DNA requerida para su detección mediante la tinción con plata es bastante alta, del orden de picogramos. Esto supone que se precisa una cantidad inicial elevada de producto de PCR y la realización de un gran número de ciclos de PCR (entre 40 y 50), con todos los inconvenientes que esto supone (utilización de gran cantidad de DNA molde, introducción de errores en la secuenciación, etc.).

Debido a que la detección del DNA es proporcional a los picogramos de DNA y no a los moles presentes de cada fragmento, es muy difícil llegar a poder identificar claramente las primeras bases de cada reacción. Según los fabricantes, se puede leer la secuencia a partir de unos 50 nucleótidos del oligonucleótido empleado en la reacción, si bien en nuestro laboratorio se pudieron leer a partir de las 20 primeras bases al incrementar entre un 50 y un 100% la concentración de cada ddNTP en su mezcla correspondiente (ver Fig. 45, panel A). La reproducción en soporte sólido (en fotografía o en papel) resultó difícil al ser muy tenues las bandas (respecto al fondo originado), la unión del gel a un cristal y los reflejos que origina el propio gel al estar teñido con plata.

###### **B. Secuenciación Cíclica Mediante Oligonucleótidos Marcados con Digoxigenina y Detección Luminescente.**

La secuenciación cíclica con oligonucleótidos marcados con digoxigenina se realizó según el sistema "DIG DNA Sequencing Kit" de Boehringer Mannheim y se visualizó mediante el sistema "DIG DNA Luminescent Kit" de la misma firma comercial, con modificaciones menores. Los oligonucleótidos se compraban marcados con DIG de las casas comerciales o con un extremo 5'-amino al cual se le unía una molécula de DIG, tal y como se explica en Materiales y Métodos (Apartado III.2.11.1., Pag. 40).

Los resultados obtenidos mediante este sistema fueron muy buenos, una vez que la proporción de cada ddNTP frente a los dNTPs recomendada en el kit fue incrementada entre un 75 y un 100% ya que, de esta forma, permitía la lectura de la secuencia desde los primeros nucleótidos (ver Fig. 45, paneles B y C). Además, la utilización de oligonucleótidos marcados en nuestro laboratorio y sin purificar por HPLC (los fabricantes indican que es imprescindible) proporcionó los mismos resultados que la utilización de oligos marcados con digoxigenina por las empresas encargadas de sintetizar los oligos y purificados por HPLC. Aunque la técnica proporciona buenos resultados, el tiempo necesario y el coste de los reactivos empleados es demasiado elevado, ya que, tras la electroforesis, se debe realizar

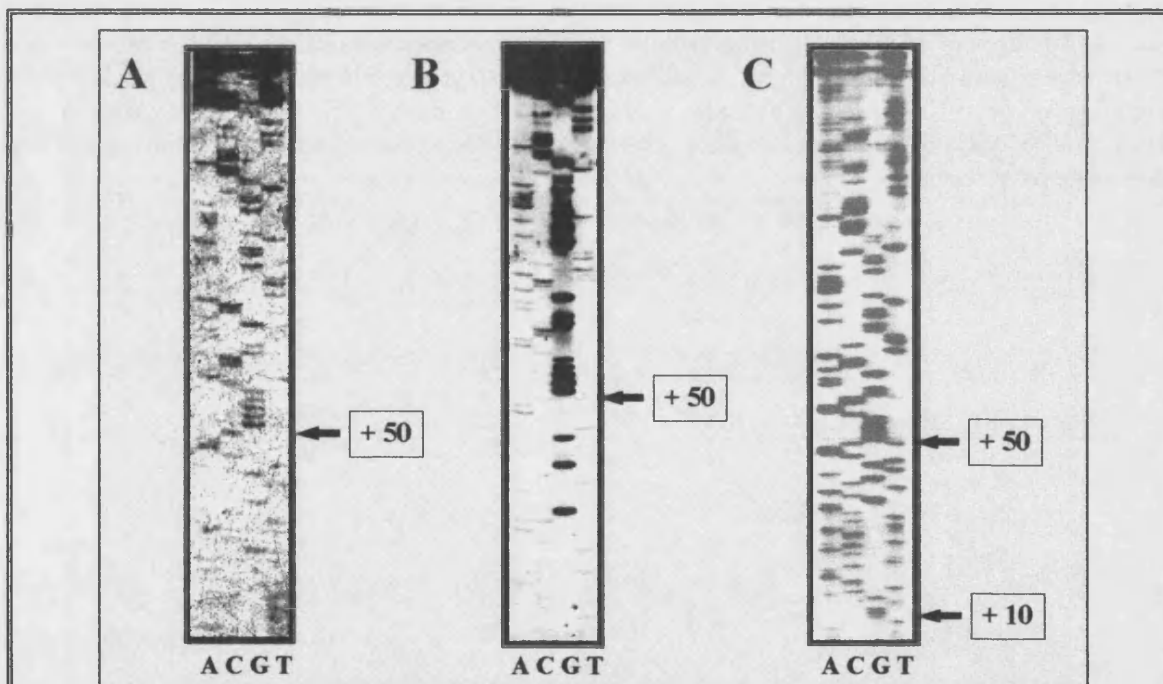
la transferencia a membrana de nylon y detectar inmunológicamente las bandas resultantes de la secuenciación.

También se realizaron pruebas de secuenciación con el sistema "Sequenase Version 2.0 DNA sequencing Kit" de USB (utilizando los mismos oligonucleótidos marcados y el mismo sistema de revelado). Los resultados obtenidos mediante este sistema fueron secuenciaciones de menor calidad, lo que junto con la mayor cantidad de trabajo necesaria (el proceso es más breve pero requiere atención constante y un mayor cuidado en las condiciones empleadas) hizo que se desestimara este sistema de secuenciación.

#### IV.5.2.2.2. Secuenciación Semiautomática.

La única diferencia de los sistemas semiautomáticos con los sistemas manuales radica en que en los primeros la transferencia del DNA desde el gel a la membrana se realiza por un sistema acoplado a la cubeta de electroforesis. El sistema desliza una membrana de nylon por la parte inferior del gel durante la electroforesis; los fragmentos de DNA se adhieren a la membrana al salir por el extremo inferior del gel.

Se empleó el sistema semiautomático "GATC 1500-System" (GATC), en el cual se realizaban las electroforesis y la transferencia de los fragmentos de DNA a membranas "Direct Blotting Membranes" (GATC) siguiendo las instrucciones del fabricante.



**Fig. 45:** Secuenciación mediante sistemas no radioactivos manuales y semiautomático. A: Resultado de la secuenciación cíclica con "DNA Silver Sequencing Kit", modificado, de Promega y tinción con plata. B: Resultado de la secuenciación cíclica usando el sistema de Boehringer Mannheim, en la que se ha aumentado la concentración de ddGTP en un 100 %, utilizando un oligo marcado con digoxigenina (suministrado por la empresa de síntesis de oligos) y transferencia manual a la membrana. C: Secuenciación cíclica con un oligo marcado con digoxigenina en nuestro laboratorio a partir de un oligo 5' amino, utilizando el sistema "DIG DNA Sequencing Kit" de Boehringer Mannheim modificado (se aumentó la concentración de los ddNTPs entre un 75 y un 100%) y la transferencia a membrana se realizó mediante "GATC 1500-System" (GATC). Los números indican el número de nucleótidos después del oligo de secuenciación.



Las reacciones de secuenciación se realizaron siguiendo los mismos protocolos que los empleados en la secuenciación manual con digoxigenina, obteniéndose secuenciaciones prácticamente completas de cada fragmento de DNA (ver Fig. 45, panel C). La detección del marcaje y, por tanto, del DNA se realizó mediante el sistema "DIG DNA Luminescent Kit" y la exposición de las membranas a películas X-OMAT S (Kodak).

Las ventajas de este sistema frente a los sistemas manuales son: 1. la transferencia directa de los fragmentos resultantes desde el final del gel a la membrana, 2. la mejor visualización de toda la secuencia al poder regularse la separación entre las bandas en la membrana, pudiéndose mantener homogénea a lo largo de toda la secuencia (en la Fig. 45 se puede observar la diferencia con la transferencia manual si se comparan los paneles B y C), resultado difícil de conseguir en secuenciaciones manuales y 3- la sencillez de su manejo.

El problema de este sistema de secuenciación, así como del sistema de secuenciación manual con digoxigenina, es la gran cantidad de trabajo que precisa para completarse el protocolo de detección. El alto coste por reacción de estos sistemas de secuenciación se debe a la necesidad de emplear oligonucleótidos marcados con digoxigenina específicos para cada fragmento de DNA a secuenciar y la detección realizada mediante "DIG DNA Luminescent Kit" de Boehringer. La detección de las reacciones de secuenciación resultan de un elevado coste, al transferirse el DNA a membranas de gran tamaño que precisan el empleo de grandes cantidades de reactivos.

Para reducir, al menos en parte, los costes de la secuenciación mediante oligos marcados con digoxigenina, utilizamos el marcaje de oligonucleótidos con extremos 5'-amino lo que permite reducir el coste de los oligos en un 60 % aproximadamente. Si bien, la necesidad de usar un gran número de oligos diferentes y el hecho de que debían ser sintetizados de nuevo (los oligos usados en el laboratorio para la amplificación por PCR no tenían extremo 5'-amino) elevaban mucho el coste de este sistema lo que, junto con la instalación de un secuenciador automático en nuestro centro, nos indujo a abandonar este sistema de secuenciación.

#### IV.5.2.2.3. Secuenciación Automática.

La reciente instalación de un secuenciador automático de DNA "ALF DNA Sequencer" de Pharmacia Biotech en el IIC nos dio la oportunidad de simplificar la secuenciación de DNA. Por lo tanto, decidimos desarrollar un protocolo para la secuenciación directa de productos de PCR. Para simplificar el trabajo este protocolo debía utilizar los mismos oligos utilizados en la amplificación mediante PCR, es decir, éstos no debían estar necesariamente marcados con fluoresceína (fluoróforo que se utiliza en este secuenciador como marcador). Utilizando oligos no marcados evitaríamos gran parte de los problemas antes mencionados y no necesitaríamos reponer los oligos marcados cada año aproximadamente (tiempo en el cual estos oligos dejan de ser fiables, ya que van perdiendo el marcaje, según Pharmacia Biotech).

Inicialmente se comprobó que la secuenciación de los fragmentos de DNA obtenidos en nuestro laboratorio según los protocolos dados en Materiales y Métodos (Apartado III.2.11.3., Pag. 41), se podía realizar utilizando oligos marcados con fluoresceína, los protocolos empleados hasta el momento y el secuenciador automático. El resultado fue satisfactorio con los diferentes sistemas de secuenciación comprobados ("DIG DNA Sequencing Kit" de Boehringer, "Autocycle Sequencing Kit" de Pharmacia Biotech, Sequitherm Cycle Sequencing Kit de Epicentre Technologies), pudiéndose leer la secuencia de los fragmentos desde las bases iniciales, próximas al oligo utilizado en la reacción de secuenciación, en todos los casos. Para evitar la aparición de indeterminaciones, se añadieron en todas las reacciones 2 o 4 µl de DMSO en la mezcla inicial de reacción.

Posteriormente, se intentó reproducir estos resultados utilizando el mismo oligo sin marcar y añadiendo a la mezcla de reacción entre 20 y 30 picomoles de dUTP-11-Fluoresceína (F-dUTP) o dATP-11-Fluoresceína (F-dATP), en función de las recomendaciones generales dadas por Zimmermann *et al.* (1992) y Pharmacia Biotech, si bien, esta misma empresa no recomendaba el sistema por la poca reproducibilidad y gran número de errores que se originaban en la secuencia. En ninguno de los casos se obtuvo una secuencia legible por el programa "ALF DNA Sequencer" de Pharmacia Biotech.

Se realizaron pruebas con la polimerasa de T7 o "Sequenasa" con los sistemas "Autoread Sequencing Kit" de Pharmacia Biotech y "Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit" de USB, respectivamente, siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Las secuencias obtenidas contenían un alto porcentaje de indeterminaciones, mayor del 20 %, y un gran número de paradas inespecíficas en los cuatro nucleótidos, tanto con oligos marcados como utilizando F-dATP (según las recomendaciones de Wiemann *et al.*, 1995), lo cual hacía que estos sistemas fueran inviables para productos de PCR de doble cadena. Los ensayos realizados con DNA de cadena sencilla, obtenido mediante amplificación asimétrica (Shuster *et al.*, 1992) permitían mejorar la lectura, pero de forma insuficiente para la localización de mutaciones puntuales. Debido a la poca fiabilidad de las secuencias obtenidas mediante estos sistemas, sobre todo con productos de doble cadena, la gran cantidad de trabajo necesario y su poca reproducibilidad con los productos de PCR de doble cadena, decidimos abandonarlos.

De los posibles procedimientos de secuenciación mencionados anteriormente, el que más se aproximaba a nuestros intereses era la secuenciación cíclica mediante la incorporación de F-dUTP en la reacción de extensión de la cadena de DNA, debido a la posibilidad de utilizar los oligos sin marcar y ser un procedimiento muy sencillo. Existen otras posibilidades, como la incorporación de rUTP-Fluoresceína en el extremo 3' de los oligonucleótidos (Igloi & Schiefermayr, 1993), el empleo de DNA molde de simple cadena obtenido por amplificación asimétrica, etc., pero suponen pasos extras de marcaje, amplificación o purificación.

La secuenciación cíclica mediante la incorporación de F-dUTP podía realizarse, al menos, para fragmentos grandes de DNA (plásmidos) (Voss *et al.*, 1989; Zimmermann *et al.*, 1992), por lo que se planteó la optimización de este protocolo para su empleo con productos de PCR de doble cadena. Inicialmente se utilizaron las mezclas indicadas en la Tabla 35 y los ciclos de reacción indicados en la

RESULTADOS

Tabla 36 (resultantes de la observación de la composición de varios de los sistemas de secuenciación empleados y de los resultados obtenidos en el laboratorio) y los oligos P-41, P-42, P-45 y P-46 empleados en la amplificación de los exones 5 y 11, y "Fluorogreen" (nombre dado por Amersham al F-dUTP).

**Tabla 35:** Composición de las disoluciones utilizadas en la secuenciación, su concentración, procedencia y las cantidades empleadas de cada uno de ellos.

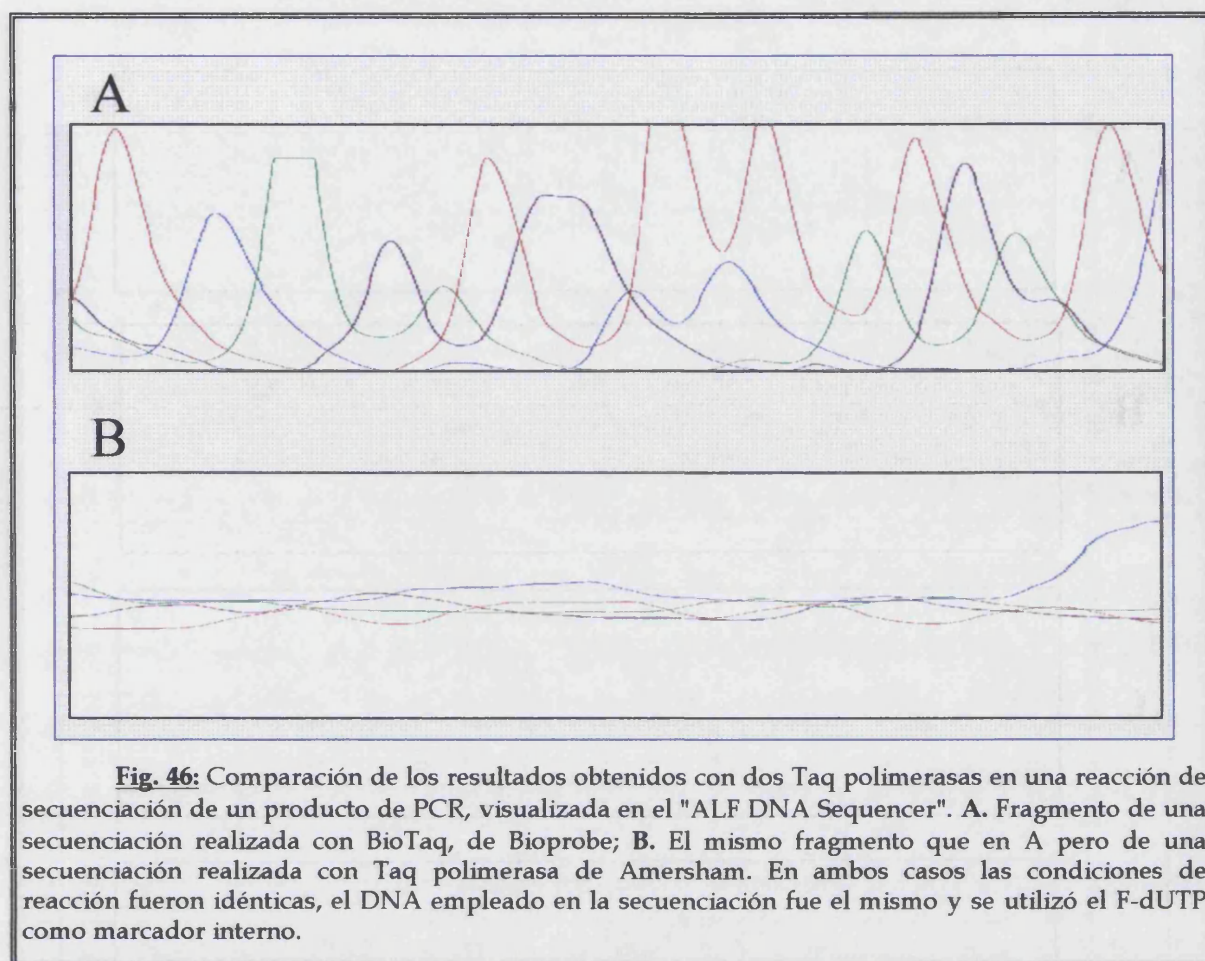
NOMBRE	REACTIVOS	CONCENTRACIÓN	CASA COMERCIAL	µL UTILIZADOS
10 x tampón de reacción	Tris/HCl, pH 9.0	600 mM	Sigma	2
	Cl <sub>2</sub> Mg	10-15 mM	Merck	
DMSO	DMSO	100%	Merck	0, 2, 4
dNTPs	dATP/dCTP/dTTP/7-deaza-GTP	400 µM cada uno	Pharmacia Biotech	1
F-dUTP	F-dUTP	10 µM	Amersham	1.5
Oligonucleótido	—	10 µM	diferentes	2-3
Se añade el DNA, 2.5-3.0 unidades de Taq y agua hasta 18 µl, y se reparten 4µl por tubo con un ddNTP				
ddATP	ddATP	700 µM	Pharmacia Biotech	2
ddCTP	ddCTP	200 µM	"	2
ddGTP	ddGTP	30 µM	"	2
ddTTP	ddTTP	900 µM	"	2
Cubrir con aceite mineral y realizar los ciclos en el termociclador, parar a continuación con				
Solución de parada	-formamida desionizada	100 % (v/v)	Riedel-de Haën	3
	-azul de dextrano 2000	0.5 % (p/v)	Merck	

**TABLA 36:** Ciclos de reacción empleados para la secuenciación mediante un PCR "GeneE" de Techne, utilizando tubos de 0.5 ml y sin placa termostatzada superior.

Temp (°C)	Tiempo (seg.)	Nº de ciclos
94	150	1
94	30	20-30
5-0 °C < T <sub>m</sub> del oligo	30	
72	80	
72	300	1
4	∞	1

T<sub>m</sub>: temperatura de fusión del oligonucleótido empleado en la reacción.

En un primer momento, determinamos qué Taq polimerasa era capaz de incorporar F-dUTP y los ddNTPs de una forma eficiente bajo las condiciones ya mencionadas. Previamente, en el marcaje de sondas con DIG, se habían utilizado las Taq polimerasas de Promega, Hytest, Pharmacia Biotech y Bioprobe; todas ellas habían permitido el marcaje de las sondas con DIG-dUTP de forma eficiente (utilizándose la relación de 1/3 de este nucleótido modificado frente a 2/3 de dATP en la mezcla de reacción). En las pruebas realizadas con estas enzimas se pudo constatar claramente que, en las condiciones utilizadas de tampón, la enzima de Bioprobe, denominada Biotaq, permitía la incorporación de F-dUTP eficientemente y de cada ddNTP de una forma específica (ver Fig. 46). El resto de enzimas permitían la incorporación de F-dUTP y los ddNTPs, pero la incorporación del nucleótido fluorescente era mucho menos eficaz, se producían picos de parada inespecíficos o no se obtenía una lectura clara en amplias zonas del fragmento secuenciado.

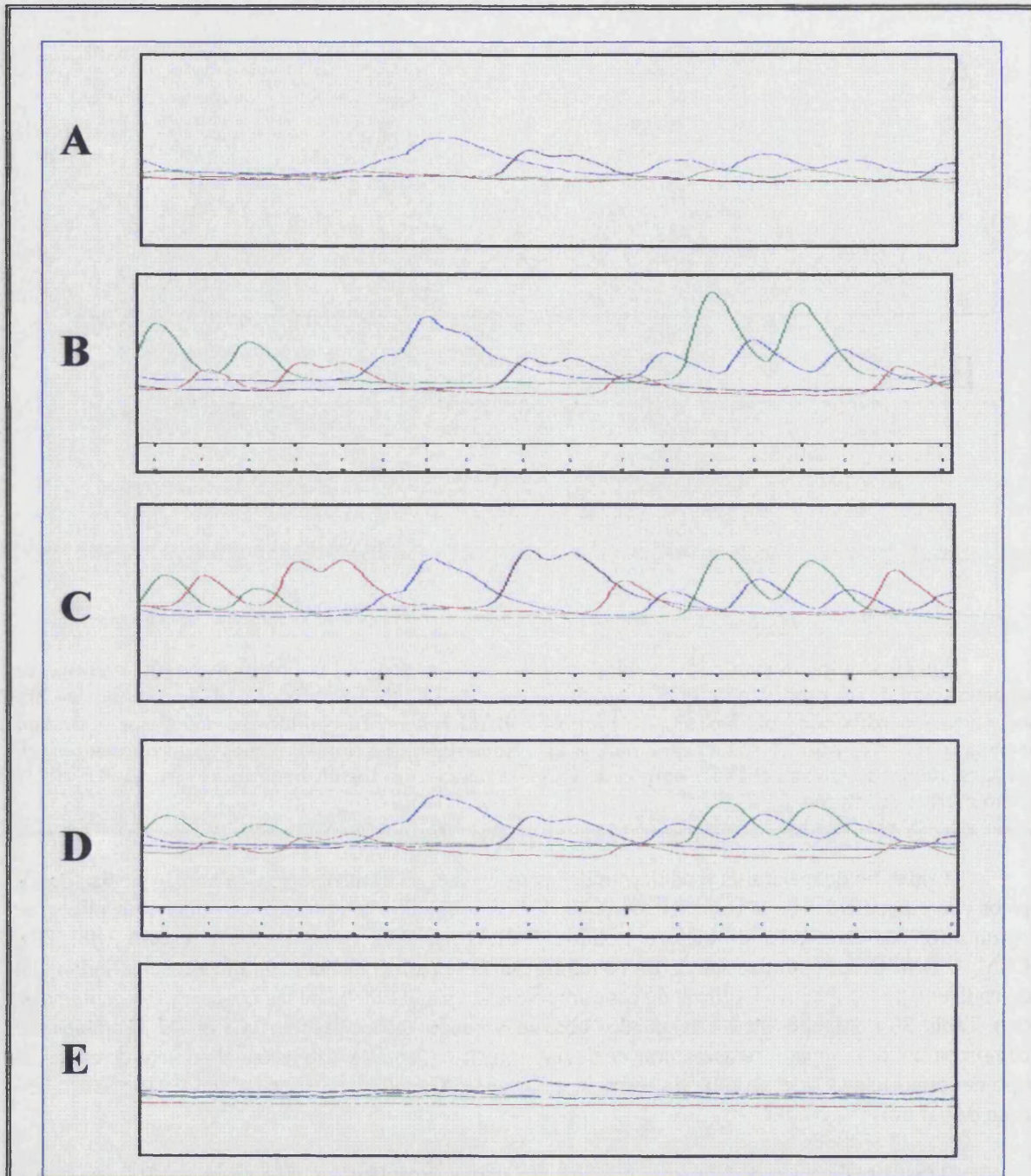


**Fig. 46:** Comparación de los resultados obtenidos con dos Taq polimerasas en una reacción de secuenciación de un producto de PCR, visualizada en el "ALF DNA Sequencer". A. Fragmento de una secuenciación realizada con BioTaq, de Bioprobe; B. El mismo fragmento que en A pero de una secuenciación realizada con Taq polimerasa de Amersham. En ambos casos las condiciones de reacción fueron idénticas, el DNA empleado en la secuenciación fue el mismo y se utilizó el F-dUTP como marcador interno.

Con el fin de mejorar el rendimiento de las reacciones de secuenciación, la homogeneidad de los picos y la especificidad de la secuencia obtenida, así como facilitar la utilización de diferentes oligos, se optimizaron las cantidades de oligonucleótidos, F-dUTP, dNTPs (sales de sodio y litio), ddNTPs,  $Cl_2Mg$  y DMSO. La optimización de las concentraciones se realizó mediante la modificación individual de cada uno de los reactivos, utilizando concentraciones hasta el 200 % de las concentraciones iniciales (ver Tabla 36.). Algunos de los resultados obtenidos pueden observarse en la Fig. 47. También, se comprobaron los tiempos y temperaturas de desnaturalización, unión y extensión, el número de ciclos, el tipo de termociclador y el de tubo de reacción empleado ("GeneE", con tubo 0.5 ml y "Progene", con tubo de 0.2 ml).

Tras la realización de diferentes estudios con varios exones (de tamaño inferior a 300 pb) y, por tanto, con diferentes oligonucleótidos, se determinó que las cantidades más apropiadas de cada disolución y de cada reactivo son las que pueden verse en la Tabla 37. Los ciclos de PCR empleados se muestran en la Tabla 38. Las temperaturas de unión del oligo empleadas eran próximas a la  $T_m$  del oligonucleótido utilizado en la reacción de secuenciación.





**Fig. 47:** Resultados obtenidos en la secuenciación de un producto de PCR cambiando la concentración de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  y la procedencia de los dNTPs. A. Concentración final de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  0.5 mM (dNTPs de Boehringer); B. Concentración final de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  1.0 mM (dNTPs de Boehringer); C. Concentración final de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  1.5 mM (dNTPs de Boehringer); D. Concentración final de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  2.0 mM (dNTPs de Boehringer); E. Concentración final de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  1.5 mM (dNTPs de Pharmacia Biotech). Los dNTPs de Boehringer se encuentran en forma de sal de litio mientras que los de Pharmacia en forma de sales de sodio.



RESULTADOS

**Tabla 37:** Composición de las soluciones utilizadas en las reacciones de secuenciación, su concentración, procedencia y cantidades empleadas.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN	CASA COMERCIAL	μL UTILIZADOS
<b>10 x tampón de reacción:</b> Tris/HCl, pH 9.0, Cl <sub>2</sub> Mg	700 mM, 15 mM	Sigma, Merck	2
DMSO	100%	Merck	4
dNTPs: dATP/dCTP/dTTP/7-deaza-GTP	320 μM cada uno	Pharmacia Biotech	1
F-dUTP	20 μM	Amersham	2
Oligonucleótido	10 μM	≠	3
Se añade el DNA (100-300 fmol), 2.0-3.0 unidades de Taq y agua hasta 18 μl, y se reparten 4μl en cada tubo con un ddNTP			
ddATP	750 μM	Pharmacia Biotech	2
ddCTP	250 μM	"	2
ddGTP	35 μM	"	2
ddTTP	1000 μM	"	2
Cubrir con aceite mineral (en los tubos de 0.5 para el termociclador "GeneE") y realizar los ciclos en el termociclador; parar a continuación con			
<b>Solución de parada:</b> -formamida desionizada -azul de dextrano 2000	100 % (v/v) 0.5 % (p/v)	Riedel-de Haën Merck	3

≠: los oligonucleótidos proceden de diversas firmas como: Boehringer Mannheim, Pharmacia, MWM Biotech, etc.

**Tabla 38:** Ciclos de reacción empleados para la secuenciación mediante un termociclador "GeneE" de Techne, utilizando tubos de 0.5 ml y otro "Progene" utilizado con tubos de 0.2 ml, este último con placa termostaterizada superior (por lo que no se necesita cubrir con aceite las mezclas de reacción).

Temp (°C)	Tiempo (seg.)		Nº de ciclos
	"GeneE"	"Progene"	
94	150	120	1
95	20	15	25-30
7 <T <sub>m</sub> oligo> 3	30	20	
68	60	40	
72	300	240	1
4	∞	∞	1

∞: indica que el tiempo que se utiliza no está limitado; 7 <T<sub>m</sub> oligo> 3: indica que la temperatura de unión que se debe emplear puede variar entre 7 grados por debajo a tres grados por encima de la T<sub>m</sub> del oligo, si bien, inicialmente es recomendable utilizar la T<sub>m</sub>.

### IV.5.3. Detección y Caracterización de Pequeñas Mutaciones en el gen RLDL.

La búsqueda de mutaciones pequeñas se realizó en todos los probandos, sus familiares no consanguíneos y en los controles. La detección de las mutaciones se realizó mediante amplificación por PCR y análisis mediante SSCPs de cada región a estudiar. Para aumentar la probabilidad de detectar bandas anormales en el análisis de SSCPs, originadas por la presencia de mutaciones, cada región se analizó bajo varias condiciones de electroforesis. Los resultados de esta búsqueda y de la caracterización a nivel de secuencia de las mutaciones presentes en nuestra muestra se exponen a continuación.

#### IV.5.3.1. Región Reguladora.

El fragmento de DNA correspondiente a la región reguladora del gen RLDL que se amplificó se puede observar en la Fig. 48. Este fragmento contiene las secuencias reguladoras de la transcripción (dos secuencias Sp1 y una secuencia SRE1), por lo que es un sitio susceptible de presentar mutaciones que originen HF.

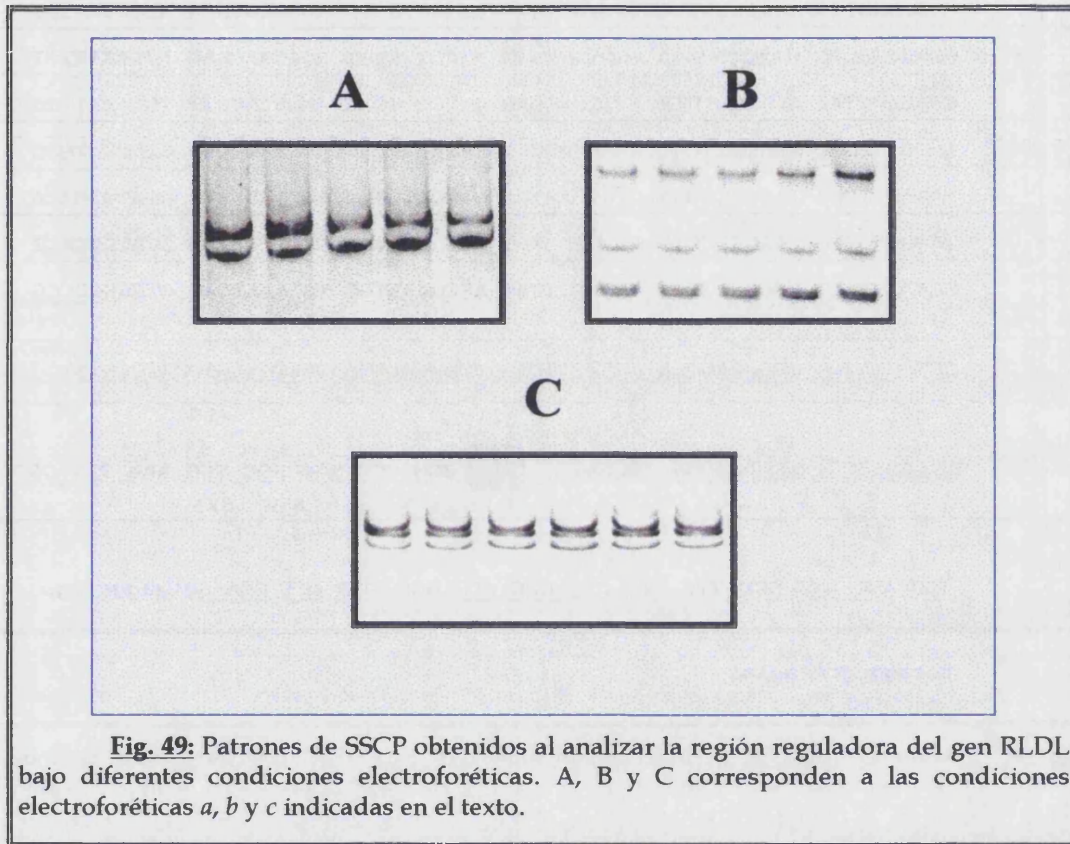
-688	GGATCCCACA AAACAAAAA TATTTTTTTG GCTGTACTTT TGTGAAGATT TTATTTAAAT
-628	TCCTGATTGA TCAGTGCTA TTAGGTGATT TGGATAACA ATGTAAAAAC AATATACAAC
-568	GAAAGGAAGC TAAAAATCTA TACACAATTC CTAGAAAGGA AAAGGCAAAT ATAGAAAGTG
-508	GCGGAAGTTC CCAACATTTT TAGTGTTTTC CTTTGTAGGC AGAGAGGACA ATGGCATTAG
-448	GCTATTGGAG GATCTTGAAA GGCTGTGTGT ATCCTTCTGT GGACAACAAC AGCAAAATGT
-388	TAACAGTTAA ACATCGAGAA ATTTCAGGAG GATCTTTCAG AAGATGCGTT TCCAATTTTG
-328	AGGGGGCGTC AGCTCTCAC CGGAGACCCA AATACAACAA ATCAAGTCGC CTGCCCTGGC
-268	GACACTTTCG AAGGACTGGA <u>GTGGGAATCA</u> <u>GAGCTTCACG</u> <u>GGTTAAAAGC</u> <u>CGATGTCACA</u> P-39 →
-208	<u>TCGGCCGTTC</u> <u>GAAACTCCTC</u> <u>CTCTGCGAGT</u> <u>GAGGTGAAGA</u> <u>CATTTGAAA</u> <u>TCACCCCACT</u>   REPETICIÓN 1     REPETICIÓN 2
-148	<u>GCAAACTCCT</u> <u>CCCCCTGCTA</u> <u>GAAACTCAC</u> <u>ATTGAAATGC</u> <u>TGTAATGAC</u> <u>GTGGGCCCCG</u>   REPETICIÓN 3   ← P-40 ↑
-088	<u>AGTGCAATCG</u> <u>CGGGAAGCCA</u> <u>GGTTTCCAG</u> <u>CTAGGACACA</u> <u>GCAGGTCGTG</u> <u>ATCCGGGTGC</u> ↑
-028	GGACACTGCC TGGCAGAGGC TCGGAGC <u>ATG</u> GGGCCCTGGG GCTGGAAATT GCGCTGGACC
048	GTCGCCTTGC TCCTCGCCGC GGCGGGGACT GCAG <u>gtaagg</u> <u>cttgetccag</u> <u>gcgccagaa</u>

**Fig. 48:** Secuencia de la región reguladora del gen RLDL, según Yamamoto *et al.* (1984). En la columna de la izquierda se indica la numeración de los nucleótidos de esta región; las bases con doble subrayado (negro y rojo) indican la región estudiada, en rojo se indican las repeticiones presentes en el promotor (las repeticiones 1 y 3 son las de unión de Sp1 y la repetición 2 es la secuencia SRE1), en azul se indica la zona de unión de los oligos utilizados en la amplificación (P-39 y P-40) y las regiones en azul subrayadas forman la secuencia TATA, la secuencia en subrayado simple entre las flechas negras verticales es la zona de inicio de la transcripción, la región traducida (indicada en verde) se inicia con el codón ATG subrayado; los nucleótidos en minúsculas pertenecen al intrón 1.

La búsqueda de mutaciones se realizó utilizando las condiciones de electroforesis:

- a) 18 % acrilamida 29:1, 1 x TEB, refrigerado a 2 °C y sometido a un voltaje constante de 400V.
- b) 15 % acrilamida 29:1, 10 % glicerol, 1 x TEB, 2 °C y voltaje constante de 400 V.
- c) 17.5 % acrilamida 29:1, 0.5 x TEB, 4 °C y voltaje constante de 400 V.

Mediante estas condiciones se obtenían bandas de SSCP muy claras, ver Fig. 49, si bien no se detectó ningún patrón anormal en esta región en todos los individuos analizados.

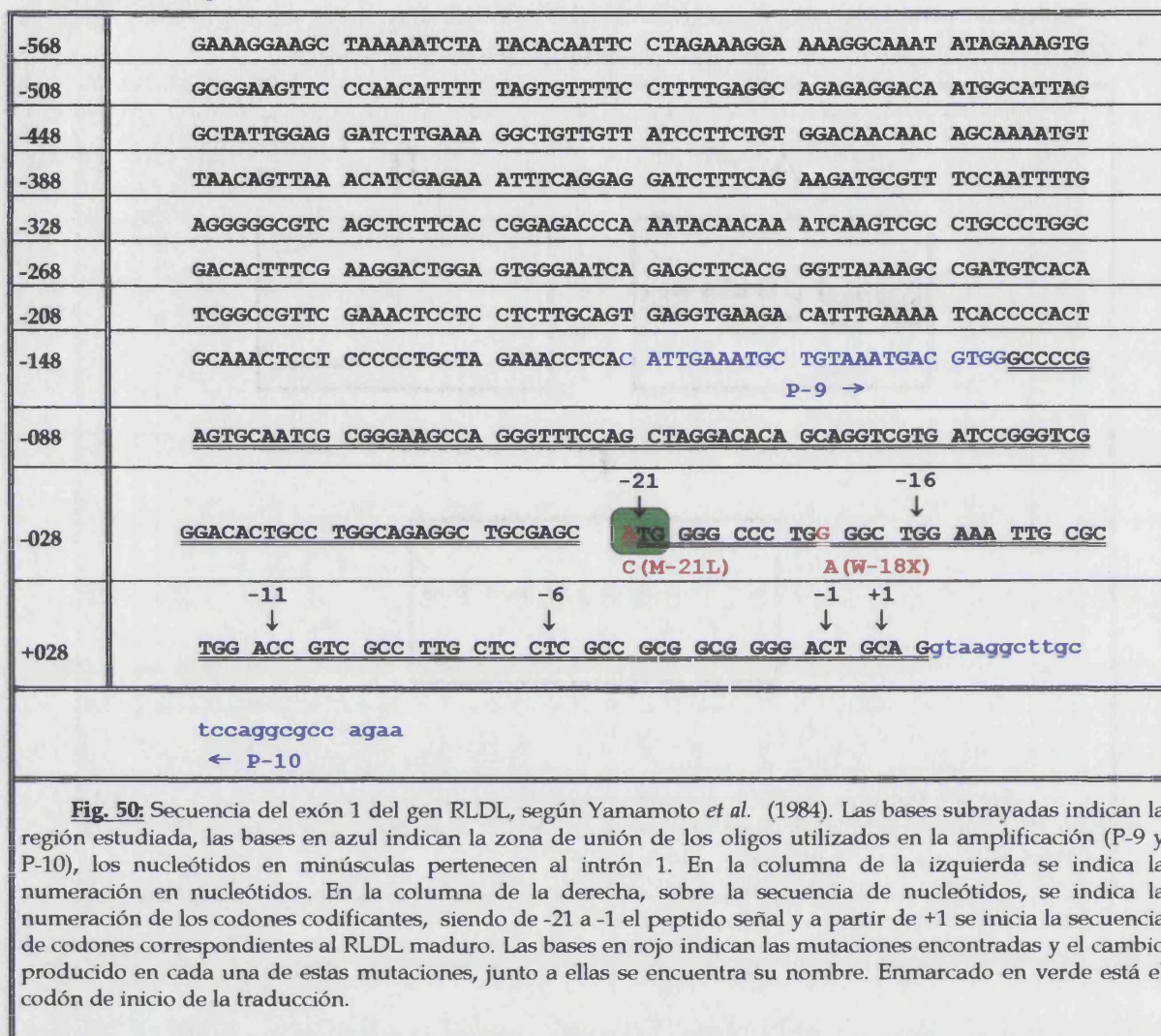


**Fig. 49:** Patrones de SSCP obtenidos al analizar la región reguladora del gen RLDL bajo diferentes condiciones electroforéticas. A, B y C corresponden a las condiciones electroforéticas *a*, *b* y *c* indicadas en el texto.



IV.5.3.2 Exón 1.

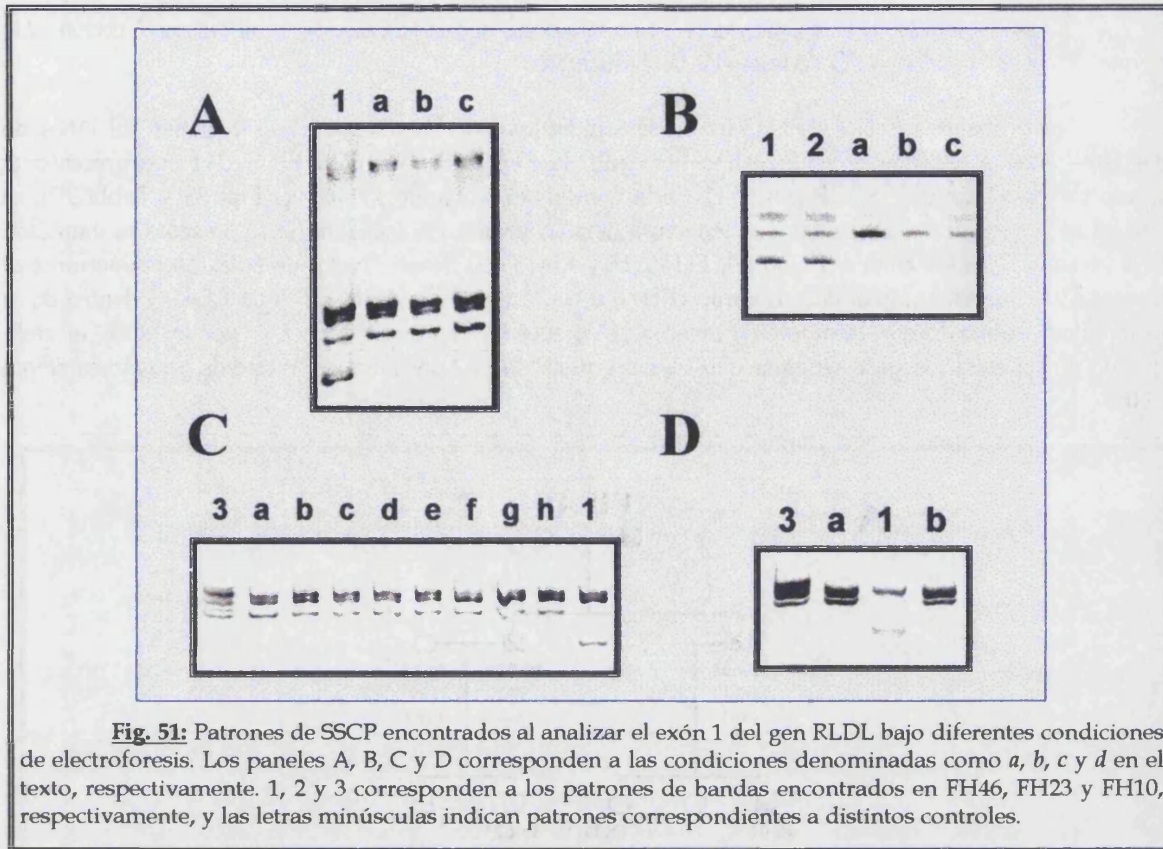
El exón 1 fue amplificado según las condiciones expuestas en Materiales y Métodos, desde la base -93 a la base 66 del cDNA según la numeración de Yamamoto *et al.* (1984), como se puede observar en la Fig. 50.



Las condiciones utilizadas para el análisis de SSCP fueron:

- 12 % acrilamida 29:1, 12 % glicerol, 1 x TEB, 18 °C y voltaje constante de 350 V.
- 20 % acrilamida 29:1, 20 % glicerol, 1 x TEB, 12 °C y voltaje constante de 300 V.
- 17.5 % acrilamida 29:1, 12.5 % glicerol, 0.5 x TEB, 14 °C y voltaje constante de 400 V.
- 17.5 % acrilamida 29:1, 12.5 % glicerol, 0.5 x TEB, 2 °C y voltaje constante de 400 V.

En las condiciones *a* y *b* se detectaron patrones anormales similares en los probandos FH23 y FH46, mientras que en las condiciones *c* y *d* se localizó un patrón de SSCPs anómalo en los mismos probandos y otro patrón, diferente al anterior, en el probando FH10 (ver Fig. 51). El patrón presentado por FH23 y FH46 fue igual en todas las condiciones comprobadas, lo que sugería que se trataba de la misma mutación.



**Fig. 51:** Patrones de SSCP encontrados al analizar el exón 1 del gen RLDL bajo diferentes condiciones de electroforesis. Los paneles A, B, C y D corresponden a las condiciones denominadas como *a*, *b*, *c* y *d* en el texto, respectivamente. 1, 2 y 3 corresponden a los patrones de bandas encontrados en FH46, FH23 y FH10, respectivamente, y las letras minúsculas indican patrones correspondientes a distintos controles.

La reacción de secuenciación se realizó, en un primer momento utilizando el sistema semiautomático y, finalmente, mediante secuenciación automática, utilizando los dos oligos empleados para la amplificación y las bandas anómalas de SSCP, para obtener amplificado solamente del alelo mutado.

La secuenciación de las mutaciones permitió confirmar que la mutación presente en FH23 y FH46 era la misma. La mutación consiste en una transición G→A en el nucleótido 12 del cDNA, que ocasiona la sustitución del codón -18 que codifica para triptofano (TGG) por un codón de parada (TGA), por lo que esta mutación pasaría a denominarse **W-18X** (según la nomenclatura propuesta por Beaudet & Tsui, 1993), cuya localización en la secuencia puede verse en la Fig. 50. La mutación presente en FH10 es una transversión A→C en el nucleótido 1, que supone el cambio del codón -21 que codifica de la metionina inicial (ATG) por un codón que codifica para una leucina (CTG), siendo su denominación **M-21L** (su localización y cambios de secuencia producidos pueden verse en la Fig. 50).

La mutación W-18X ha sido descrita previamente en China (Sun *et al.*, 1993) y posteriormente en población española por nuestro grupo y el del Dr. Pocoví en el "Xth European Atherosclerosis Society Meeting" realizado en Aarhus en septiembre de 1995, mientras que la mutación M-21L no ha sido previamente descrita.

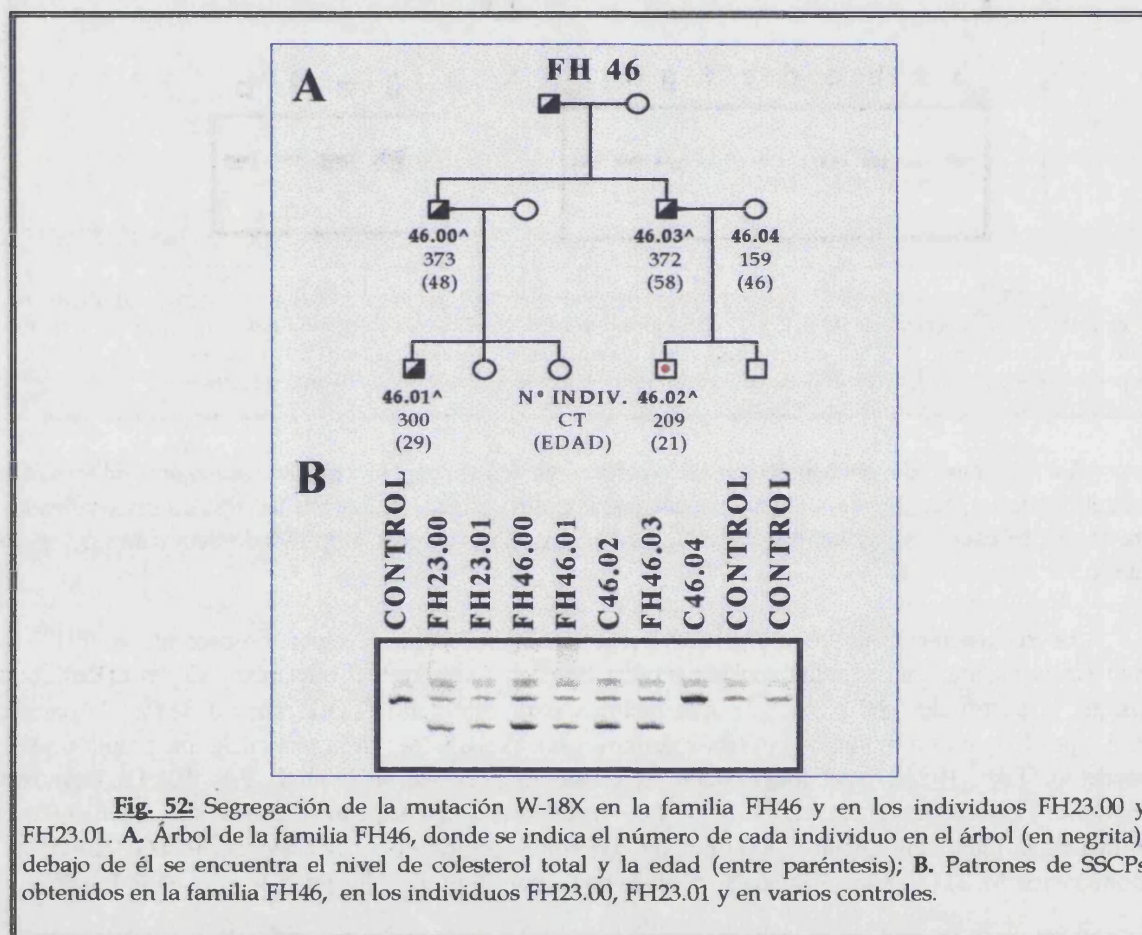
La secuencia de nucleótidos originada por estas mutaciones sugiere que se trata de mutaciones de tipo I (Hobbs *et al.*, 1990):

-La mutación W-18X origina un codón de parada en los primeros aminoácidos de la proteína, concretamente en el cuarto aminoácido del péptido señal, lo que supone que no existe síntesis del RLDL a partir de los mRNAs que contengan esta mutación



-La mutación M-21L impide, total o parcialmente, que la traducción se inicie en el codón -21, ya que destruye el codón ATG de inicio de la traducción.

Los probandos FH10 y FH23 han sido estudiados individualmente al no disponer del DNA de sus familiares, a excepción de un primo hermano de FH23 (denominado FH23.01) que presentó el mismo patrón alterado de SSCP (Fig. 52). En la familia del probando FH46 (ver Fig. 52 y Tabla 39), se estudió la segregación de la mutación respecto a la enfermedad. En esta familia se presenta la mutación en 4 varones, 3 de los cuales (FH46.00, FH46.01 y FH46.03) tienen niveles de colesterol superiores al percentil 95, mientras que el cuarto varón (FH46.02) presenta niveles de CT y de LDL-C dentro de la normalidad. Sabiendo que la mutación localizada en esta familia es de Tipo I y, por lo tanto, el alelo mutado no sintetiza receptor, tenemos que suponer que FH46.02 presenta algún tipo de protección frente a HF.



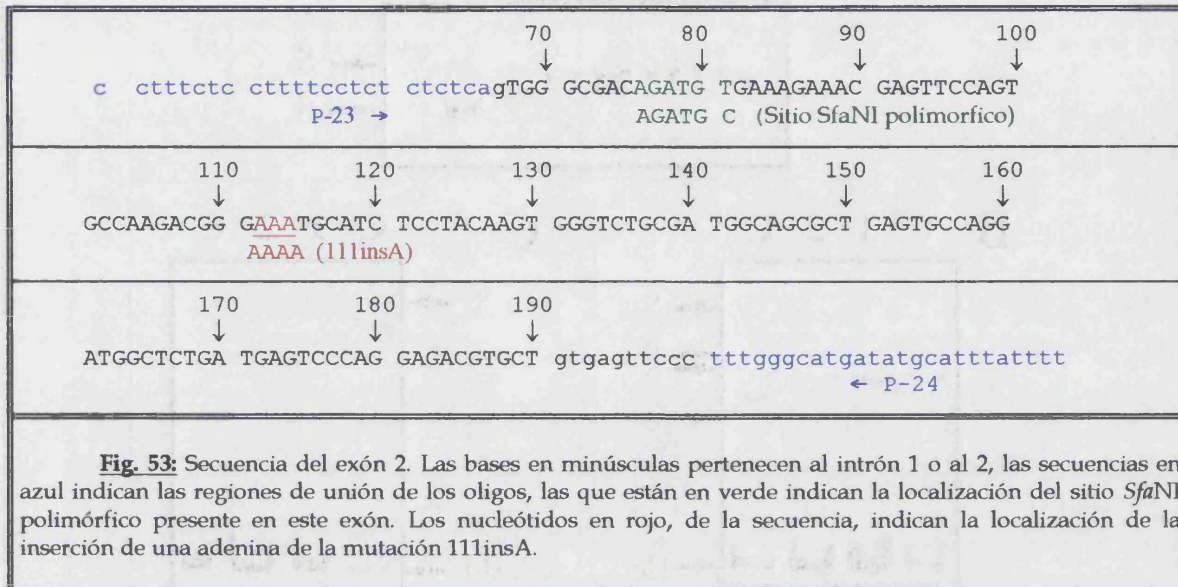
**Fig. 52:** Segregación de la mutación W-18X en la familia FH46 y en los individuos FH23.00 y FH23.01. **A.** Árbol de la familia FH46, donde se indica el número de cada individuo en el árbol (en negrita); debajo de él se encuentra el nivel de colesterol total y la edad (entre paréntesis); **B.** Patrones de SSCP's obtenidos en la familia FH46, en los individuos FH23.00, FH23.01 y en varios controles.

**Tabla 39:** Características de los miembros de la familia FH46.

	edad (años)	sexo	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo AI (mg/dl)	Mutación
<b>FH46.00</b>	48	v	373	89	42	314	190	109		W-18X
<b>FH46.01</b>	29	v	300	101	55	224	20			W-18X
<b>C46.02</b>	21	v	209	76	56	138	15	99	140	W-18X
<b>FH46.03</b>	58	v	372	100	34	318	20	157	97	W-18X
<b>C46.04</b>	46	m	159	67	63	83	13	65	147	

IV.5.3.3. Exón 2.

La amplificación del exón 2 realizada incluye desde el nucleótido 68 hasta el 190 del cDNA del gen RLDL (ver Fig. 53), un nucleótido del intrón 1 y 10 nucleótidos del intrón 2.



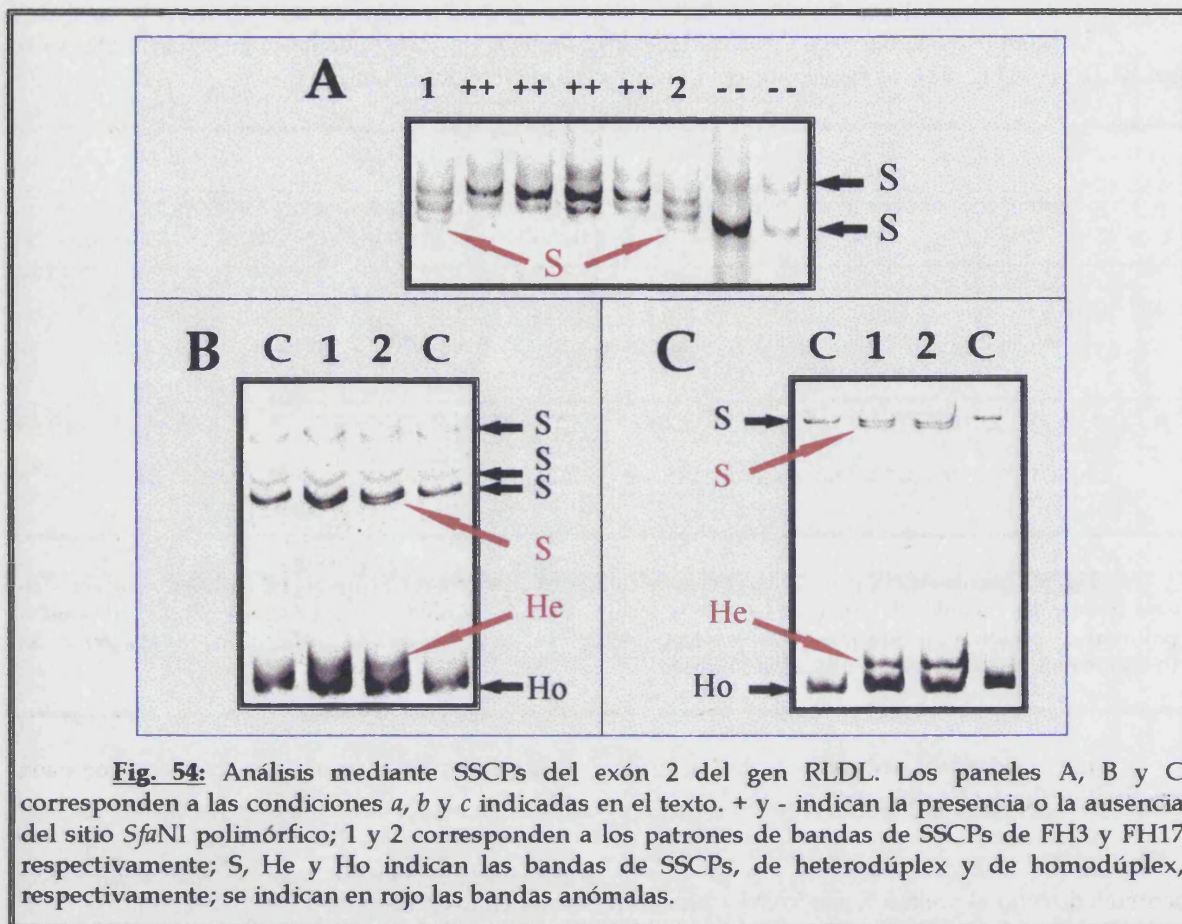
Las condiciones utilizadas en la búsqueda de mutaciones y los resultados obtenidos con cada una de ellas fueron (ver Fig. 54):

- a) 17 % acrilamida 29:1, 1 x TEB, 2 °C y voltaje constante de 400 V. Estas condiciones permiten detectar el polimorfismo *Sfa*NI y bandas anómalas en los probandos FH3 y FH17.
- b) 17.5 % acrilamida 29:1, 12.5 % glicerol, 0.5 x TEB, 14 °C y voltaje constante de 400 V. Estas condiciones no permiten detectar el polimorfismo pero sí bandas anormales en los probandos FH3, FH17, FH31, FH32, FH54 y FH61, que presentan el mismo patrón de bandas.
- c) 17.5 % acrilamida 29:1, 12.5 % glicerol, 0.5 x TEB, 2 °C y voltaje constante de 400 V. Estas condiciones tienen la misma capacidad de detección que las condiciones b.

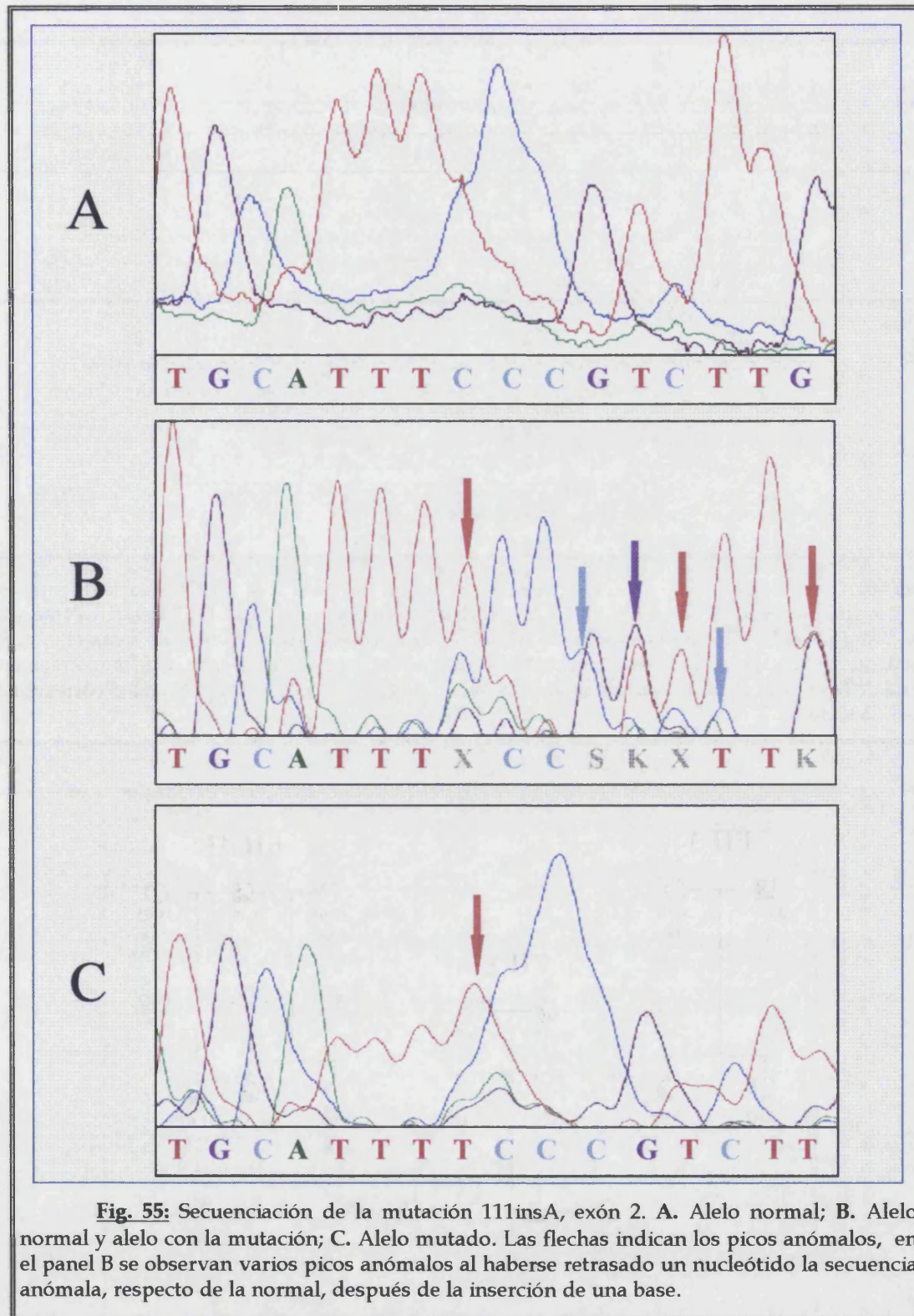
La secuenciación de este exón se realizó en todos los individuos que presentaban el patrón de bandas de SSCP alterado, comprobándose que todos ellos presentan la inserción de una adenina entre los nucleótidos 111 y 115 (Fig. 55), no se puede saber cual es el sitio exacto de la inserción, debido a que los nucleótidos 112 a 114 son tres adeninas consecutivas (ver Fig. 55 y Fig. 56). El nombre dado a esta mutación es 111insA, ya que después de esta base es el primer lugar donde puede haberse insertado la adenina.

La mutación 111insA origina el cambio de pauta de lectura desde el aminoácido 18, según se observa en la Fig. 56. La nueva pauta de lectura origina un codón de parada 13 aminoácidos después del primero modificado (Fig. 56), por lo que la mutación 111insA origina tan solo un pequeño péptido obligadamente no funcional y podemos decir que es una mutación de tipo I.





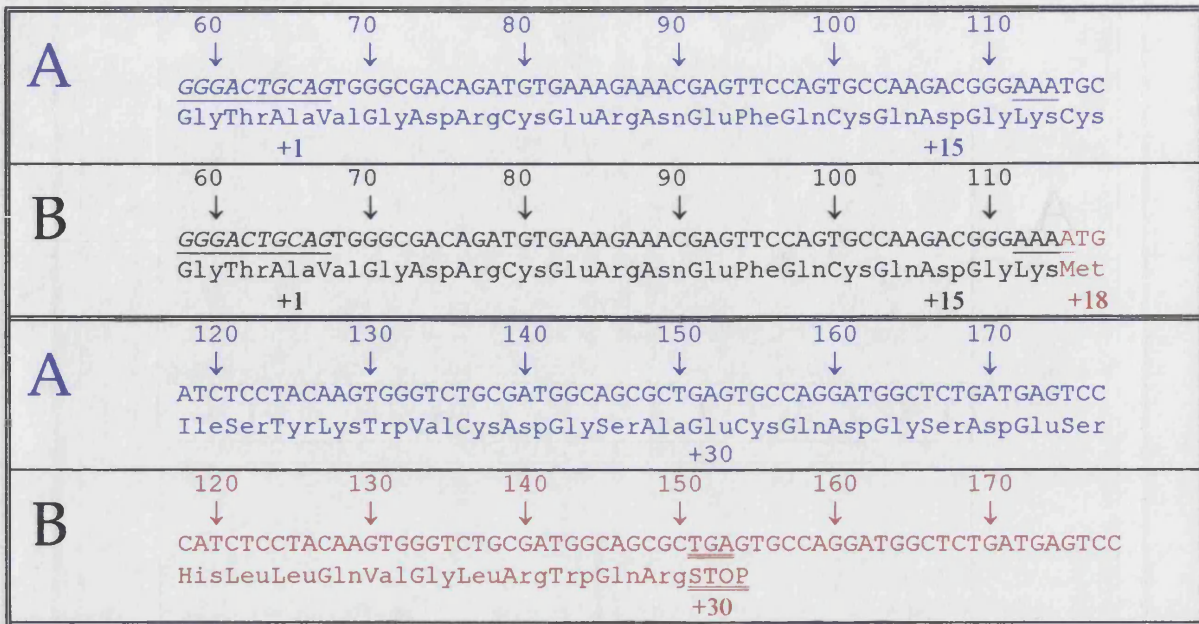
**Fig. 54:** Análisis mediante SSCPs del exón 2 del gen RLDL. Los paneles A, B y C corresponden a las condiciones *a*, *b* y *c* indicadas en el texto. + y - indican la presencia o la ausencia del sitio *Sfu*NI polimórfico; 1 y 2 corresponden a los patrones de bandas de SSCPs de FH3 y FH17 respectivamente; S, He y Ho indican las bandas de SSCPs, de heterodúplex y de homodúplex, respectivamente; se indican en rojo las bandas anómalas.



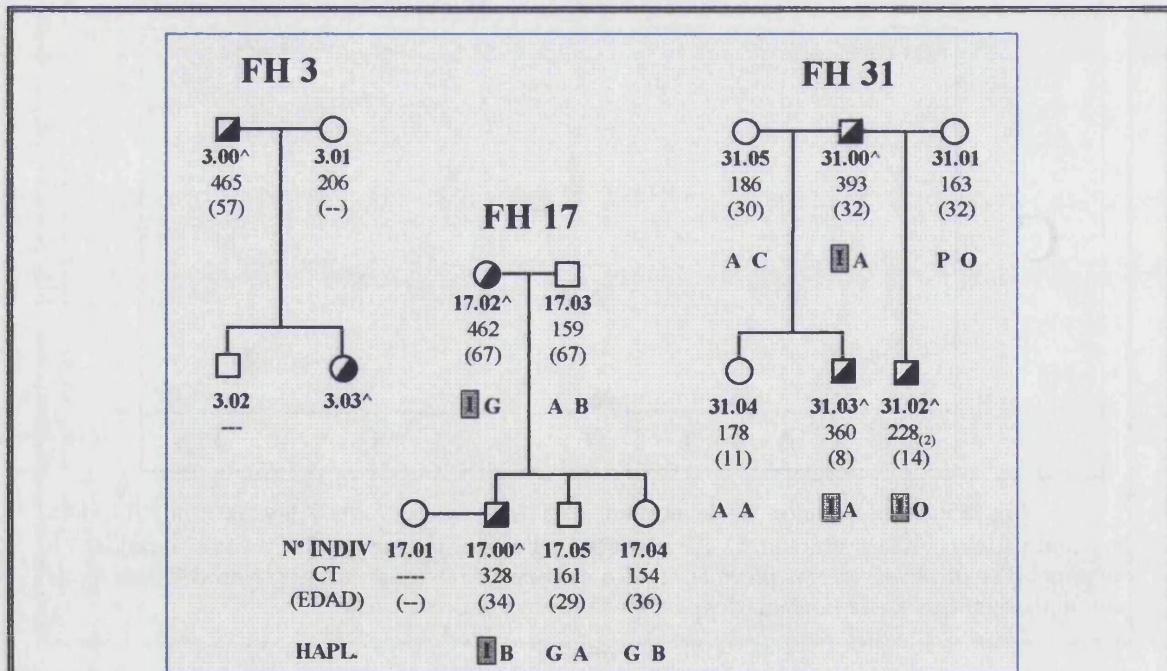
El estudio de la segregación se pudo realizar en tres familias, si bien el tamaño de éstas es muy reducido, ver Fig. 57. En todos los casos se podía observar la cosegregación de la enfermedad con la mutación y el estudio de haplotipos, que se realizó en dos de estas familias, muestra que la mutación cosegrega con el haplotipo I en ambas. La presencia de la mutación en un mismo haplotipo en dos familias diferentes hace suponer que la mutación procede de un antecesor común.



RESULTADOS



**Fig. 56:** Comparación entre la secuencia y su traducción del exón 2 de un alelo normal (paneles A) y el alelo que contiene la mutación 111InsA (paneles B). En rojo se indican las bases cuya traducción se ha visto alterada y los aminoácidos codificados por la nueva pauta de lectura hasta el codón de parada que ésta supone. Las bases con subrayado simple pertenecen al exón 1, la numeración por encima de la secuencia es la correspondientes a los nucleótidos y la que está por debajo corresponde a los aminoácidos.

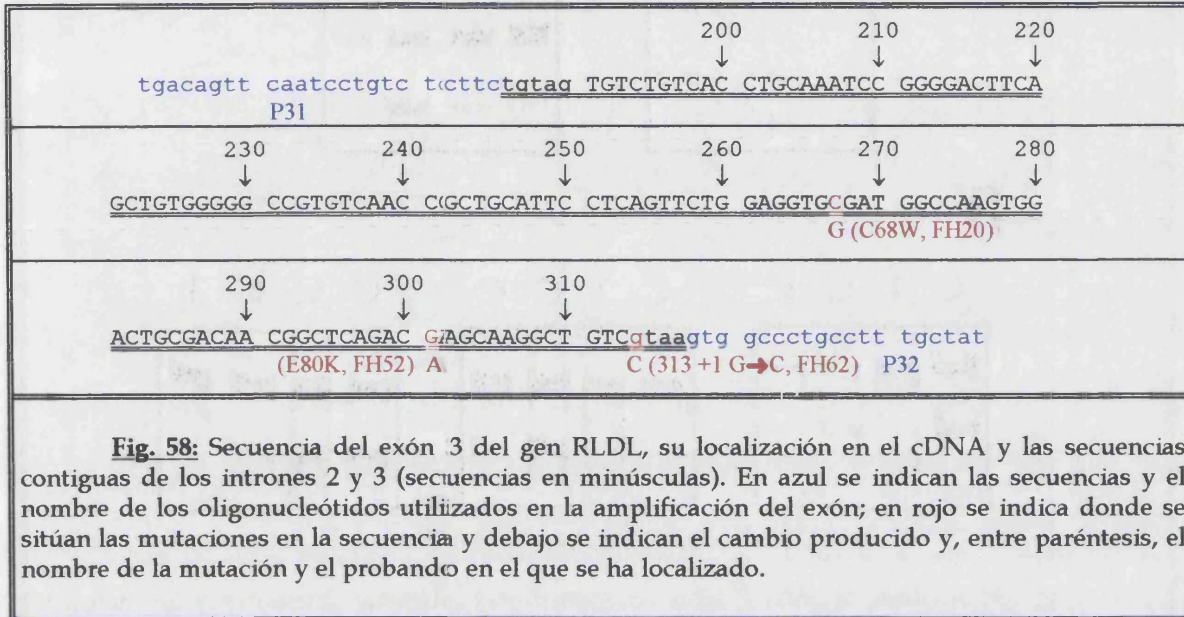


**Fig. 57:** Familias HF en las que se ha localizado la mutación 111insA. En los árboles se indican, cuando es posible, los niveles de CT de cada uno de los individuos, así como sus haplotipos. Como se puede observar, el haplotipo I cosegrega con la enfermedad en las familias FH17 y FH31 (en la familia FH3 no han sido analizados los haplotipos) y con la presencia de la mutación 111insA (^ indica la presencia de la mutación).



IV.5.3.4. Exón 3.

La amplificación del exón 3 realizada permite el estudio de la secuencia completa de este exón (ver Fig. 58).

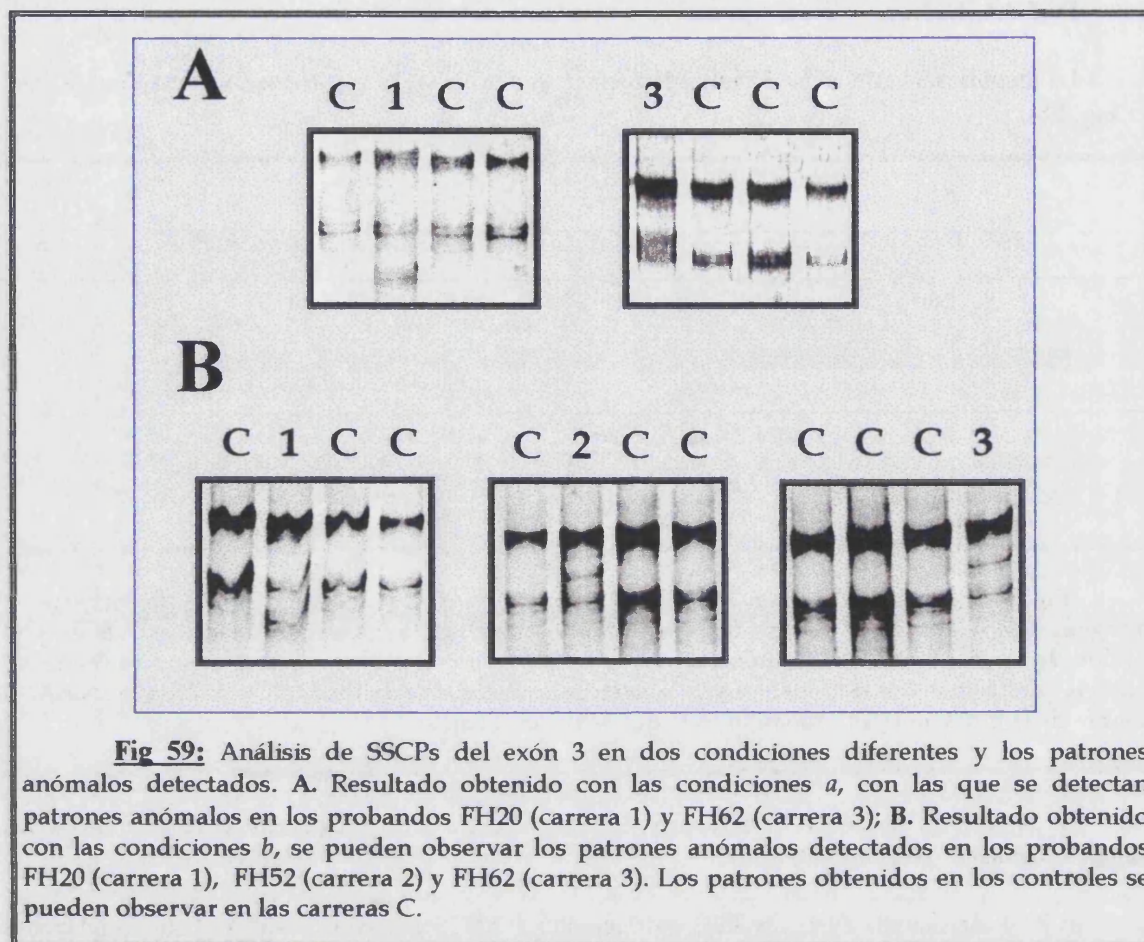


En el análisis de SSCP se utilizaron las condiciones de electroforesis y se obtuvieron los resultados siguientes (ver Fig. 59):

- a) 22 % acrilamida 29:1, 1 x TEB, refrigerado a 0.5 °C y sometido a 400 V. Estas condiciones permitieron la detección de dos patrones de bandas anormales en FH20 y FH62
- b) 20 % acrilamida 29:1, 1 x TEB, refrigerado a 8 °C y sometido a 400 V. Estas condiciones permitieron detectar tres patrones diferentes, en los probandos FH20, FH52 y FH62.

La secuenciación de estas mutaciones ha mostrado que:

- FH20 presenta la mutación C68W, que supone un cambio del aminoácido 68 de cisteína a triptófano debido al cambio de C por G en el nucleótido 267, que cambia el codón 68 de TGC a TGG.
- FH52 presenta la mutación E80K, que supone un cambio del aminoácido 80 de glutámico a lisina debido al cambio de G por A en el nucleótido 301, que cambia el codón de GAG a AAG.
- FH62 presenta la mutación 313+1 G→C, que supone el cambio del primer nucleótido del intrón 4 de G a C, lo que seguramente alterará el procesado de este intrón y, por tanto, ocasionará la síntesis de una proteína alterada.



**Fig 59:** Análisis de SSCPs del exón 3 en dos condiciones diferentes y los patrones anómalos detectados. A. Resultado obtenido con las condiciones *a*, con las que se detectan patrones anómalos en los probandos FH20 (carrera 1) y FH62 (carrera 3); B. Resultado obtenido con las condiciones *b*, se pueden observar los patrones anómalos detectados en los probandos FH20 (carrera 1), FH52 (carrera 2) y FH62 (carrera 3). Los patrones obtenidos en los controles se pueden observar en las carreras C.

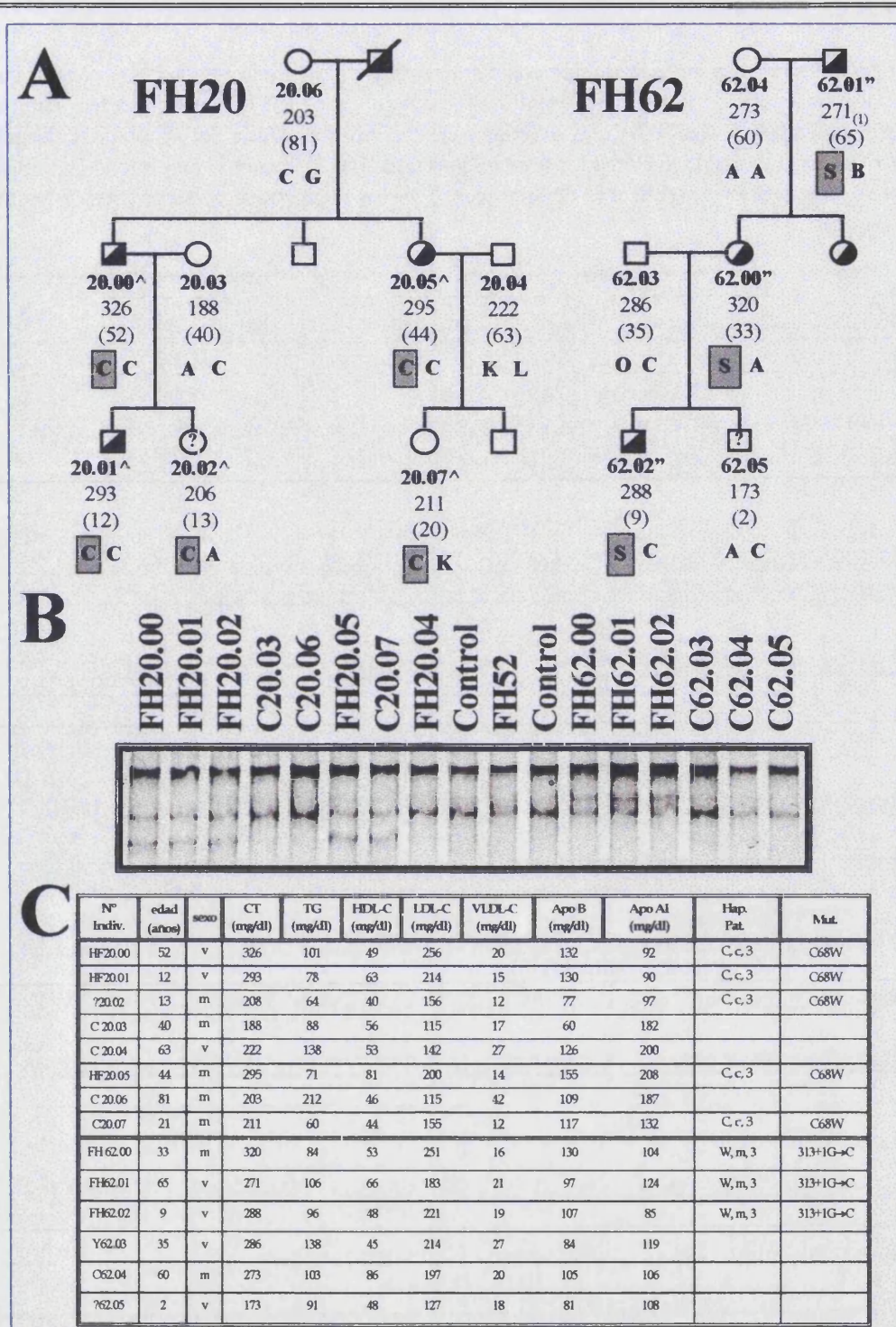
Todas estas mutaciones, en función de los cambios que originan en el receptor, pueden ser la causa de la HF en los probandos analizados, por lo que se analizó la segregación de las mutaciones en los miembros de las familias disponibles (FH20 y FH62), mediante las condiciones *b* de SSCP. En ambas familias se observó como el patrón anómalo segregaba conjuntamente con la enfermedad (ver Fig. 60).

De este análisis se deduce que:

- En la familia FH20 existen dos individuos, FH20.02 y FH20.07, que son portadores del patrón alterado de SSCP y que presentan niveles lipídicos dentro de los márgenes indicados como dudosos y de sanos, respectivamente, por lo que habían sido diagnosticados como tales.

- En la familia FH62 existe un individuo con niveles lipídicos dentro de los indicados como dudosos, ?62.05, que no es portador de la alteración.





**Fig. 60:** Segregación de los patrones anómalos de SSCP, localizados en el E3, en las familias FH20 y FH62. **A.** Árboles de las familias FH20 y FH62; **B.** Resultado del análisis de SSCPs del E3 en ambas familias, el probando FH52 y dos controles sanos con patrón normal de SSCPs. **C.** Datos bioquímicos de las familias FH20 y de la familia FH62. ^ y " indican la presencia del patrón de bandas anómalo en los miembros de las familias FH20 y FH62 debidas a la presencia de las mutaciones C66W y 313+1 G→C, respectivamente; <sup>(1)</sup> indica que el colesterol ha sido medido cuando el individuo estaba bajo dieta; el haplotipo que cosegrega con la enfermedad se encuentra enmarcado en cada familia (haplotipo C en la familia FH20 y S en la FH62).

IV.5.3.5. Exón 4.

El exón 4 es el más largo traducido completamente y codifica una región clave para la unión de ApoE y ApoB, las repeticiones 4 y 5 del receptor (Yamamoto *et al.*, 1984), por lo que, teóricamente, las mutaciones localizadas en este exón que supongan un cambio importante de un aminoácido por otro, serán defectivas en la unión de los ligandos (mutaciones tipo III). Mediante la amplificación realizada se pudo estudiar toda la región codificante de este exón y varios nucleótidos pertenecientes a los intrones contiguos (ver Fig. 61).

tg					
	320	330	340	350	
	↓	↓	↓	↓	
gtctcggcca tccatccctg	<u>cagCCCCAA</u>	<u>GACGTGCTCC</u>	<u>CAGGACGAGT</u>	<u>TTCGCTGCCA</u>	
P-33 →					
	360	370	380	390	400
	↓	↓	↓	↓	↓
<u>CGATGGGAAG</u>	<u>TGCATCTCTC</u>	<u>GGCAGTTCGT</u>	<u>CTGTGACTCA</u>	<u>GACCGGGACT</u>	<u>GCTTGGACGG</u>
	420	430	440	450	460
	↓	↓	↓	↓	↓
<u>CTCAGACGAG</u>	<u>GCCTCCTGCC</u>	<u>CGGTGCTCAC</u>	<u>CTGTGGTCCC</u>	<u>GCCAGCTTCC</u>	<u>AGTGCAACAG</u>
	480	490	500	510	520
	↓	↓	↓	↓	↓
<u>CTCCACCTGC</u>	<u>ATCCCCCAGC</u>	<u>TGTGGGCCTG</u>	<u>CGACAACGAC</u>	<u>CCCGACTGCG</u>	<u>AAGATGGCTC</u>
				P-55 →	
	540	550	560	570	580
	↓	↓	↓	↓	↓
<u>GGATGAGTGG</u>	<u>CCGCAGCGCT</u>	<u>GTAGGGGTCT</u>	<u>TTACGTGTTT</u>	<u>CAAGGGGACA</u>	<u>GTAGCCCCTG</u>
					G (P160R; Familia FH50)
	600	610	620	630	640
	↓	↓	↓	↓	↓
<u>CTCGGCCTTC</u>	<u>GAGTTCCACT</u>	<u>GCCTAAGTGG</u>	<u>CGAGTGCATC</u>	<u>CACTCCAGCT</u>	<u>GGCGCTGTGA</u>
	660	670	680	690	
	↓	↓	↓	↓	
<u>TGGTGGCCCC</u>	<u>GACTGCAAGG</u>	<u>ACAAATCTGA</u>	<u>CGAGGAAAAC</u>	<u>TGCGgtatgq.....caggg</u>	
tgggggcggg gcgt.....	gtcctatcacctgtccctgggtccc				
← P-34	← P-56				

**Fig. 61:** Secuencia del exón 4 y las regiones que lo limitan en el intrón 3 e intrón 4. Se encuentra subrayada la secuencia que permiten estudiar los oligos empleados. En azul, morado y rojo se encuentran las secuencias utilizadas para amplificar el exón 4 completo, la región 3' y la mutación detectada en la familia FH50; en minúsculas se encuentran las secuencias intrónicas. Se han indicado con puntos las zonas de secuencia a las que no hemos tenido acceso.

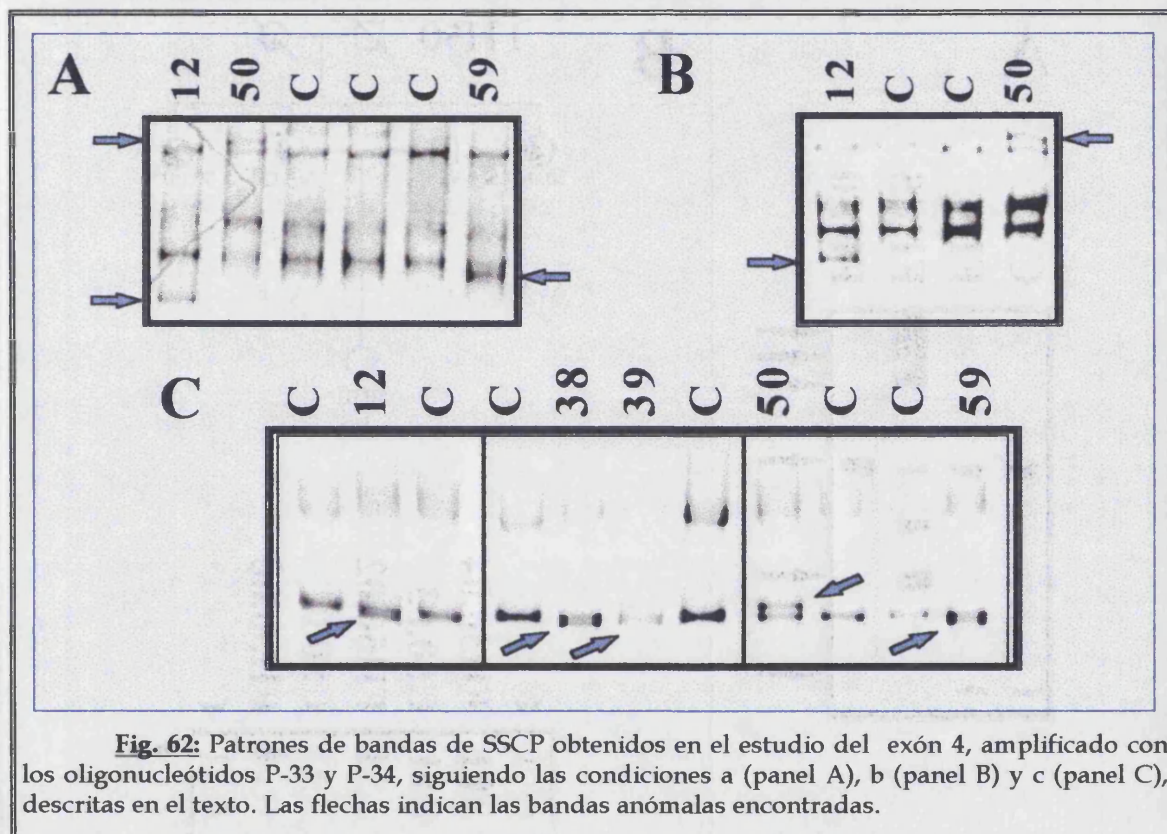


Para la búsqueda de mutaciones se utilizaron las condiciones de electroforesis que se indican a continuación, junto con los resultados obtenidos, (ver Fig. 62):

a) 10 % acrilamida 29:1, 15 % glicerol, 1 x TEB, 2 °C y voltaje constante de 350 V, durante 4 horas: se detectaron patrones anómalos de bandas en FH1, FH50 y FH59.

b) 12 % acrilamida 29:1, 15 % glicerol, 1 x TEB, 2 °C y 400 V, durante 4 horas: se detectaron patrones anómalos de bandas en FH1 y FH50.

c) 12 % acrilamida 29:1, 0.5 x TEB, 14 °C y 400 V, durante 4 horas: se detectaron patrones anómalos de bandas en FH1, FH12, FH38, FH39, FH41, FH50, FH56 y FH59.



**Fig. 62:** Patrones de bandas de SSCP obtenidos en el estudio del exón 4, amplificado con los oligonucleótidos P-33 y P-34, siguiendo las condiciones a (panel A), b (panel B) y c (panel C), descritas en el texto. Las flechas indican las bandas anómalas encontradas.

Debido a que en la bibliografía se indica que la región 3' de este exón presenta un gran número de mutaciones (Hobbs *et al.*, 1992, Gudnanson *et al.*, 1993) causantes de HF se decidió estudiar esta región de forma especial mediante su amplificación con los oligonucleótidos P-55 y P-56 (Gudnanson *et al.*, 1993; ver Fig. 61) y análisis mediante SSCP (Fig. 63), en el cual se emplearon las siguientes condiciones de electroforesis:

d) 12 % acrilamida 29:1, 15 % glicerol, 1 x TEB, 2 °C y voltaje constante de 400 V.

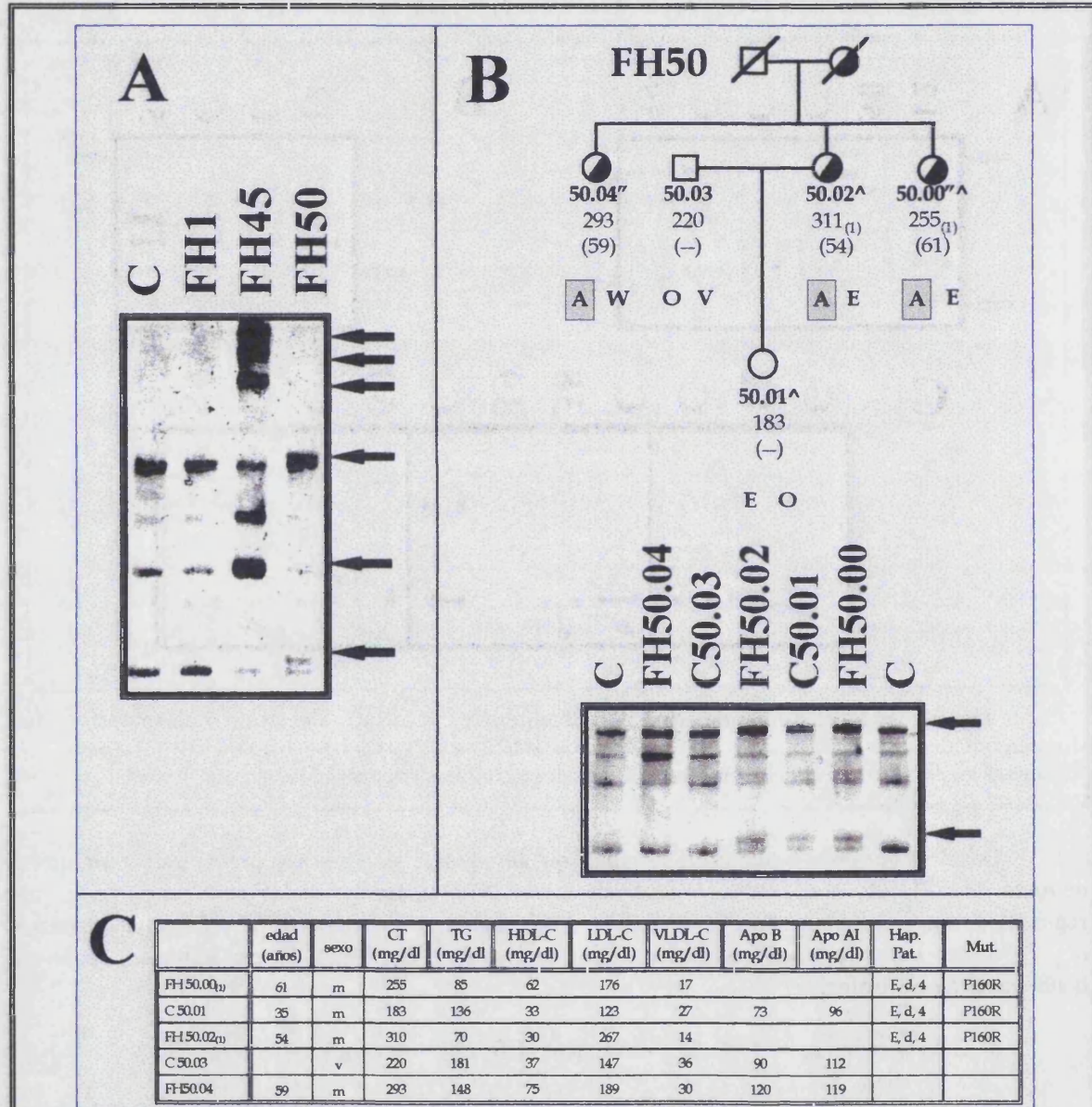
Estas condiciones mostraron patrones anómalos en FH50 y FH45 (ver Fig. 63.A), mientras que el patrón de bandas era completamente normal en el resto de los probandos (no se detectó ninguna banda anómala en todas las pruebas realizadas bajo diferentes condiciones), lo que sugiere que el resto de mutaciones detectadas previamente en este exón deben localizarse en la región 5' del mismo.

El estudio de segregación del patrón de bandas alterado con la enfermedad solo se pudo realizar en la familia del probando FH50, en la que se pudieron estudiar cinco miembros de esta familia (ver Fig. 63.B). Las bandas anómalas se encontraron en los individuos 50.00, 50.01 y 50.02, mientras que 50.03 y 50.04 no las presentaban. De esta segregación del patrón de SSCP se deduce que la mutación cosegrega con el haplotipo E. Esta mutación ha sido secuenciada recientemente y ha resultado ser un



cambio en el nucleótido 542 (C→G; ver Fig. 61) lo que supone el cambio de significado del codón 160 de Pro a Arg, mutación P160R, lo que hace que esta mutación sea potencialmente causante de HF.

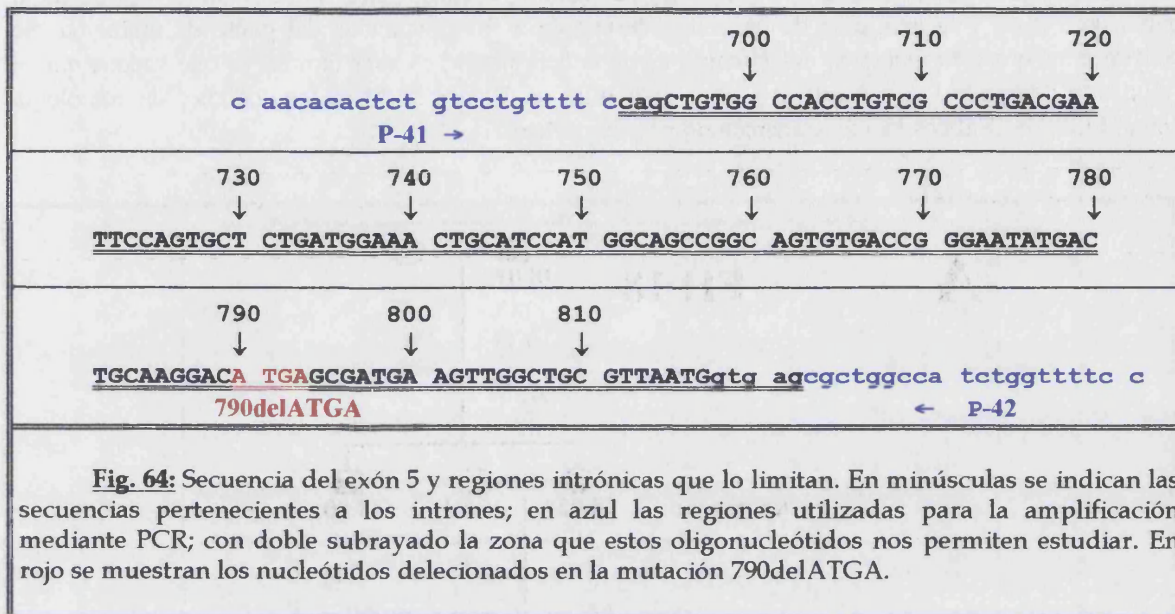
Los resultados obtenidos, aunque aparentemente, son contradictorios siempre que se considere la mutación P160R como causante de HF podrían ser explicados considerando que FH50.04 no sea realmente un paciente HF o que presente una mutación causante de HF, diferente a la localizada y que podría situarse en cualquiera de sus alelos (no podemos saber si el alelo A tiene el mismo origen que el de sus hermanas), siendo, por tanto, C50.01 portador de la enfermedad asintomático.



**Fig. 63:** Análisis mediante SSCPs del extremo 3' del exón 4. **A.** Detección de bandas anómalas mediante las condiciones *d* (indicadas en el texto). Se pueden observar bandas anómalas (indicadas con flechas) en FH45 y FH50 y no se detectaron en el resto de individuos; **B.** Segregación del patrón anómalo de bandas de SSCP en la familia FH50. ^: indica la presencia de la mutación P160R; " haplotipo deducido a partir de los polimorfismos y del contexto familiar; **C.** Datos bioquímicos de la familia FH50; (1) los datos de colesterol fueron obtenidos cuando el paciente estaba bajo dieta. El haplotipo A es el que aparentemente cosegrega con el fenotipo; sin embargo, la detección de la mutación P160R obliga a replantearse el diagnóstico (ver texto).

IV.5.3.6. Exón 5.

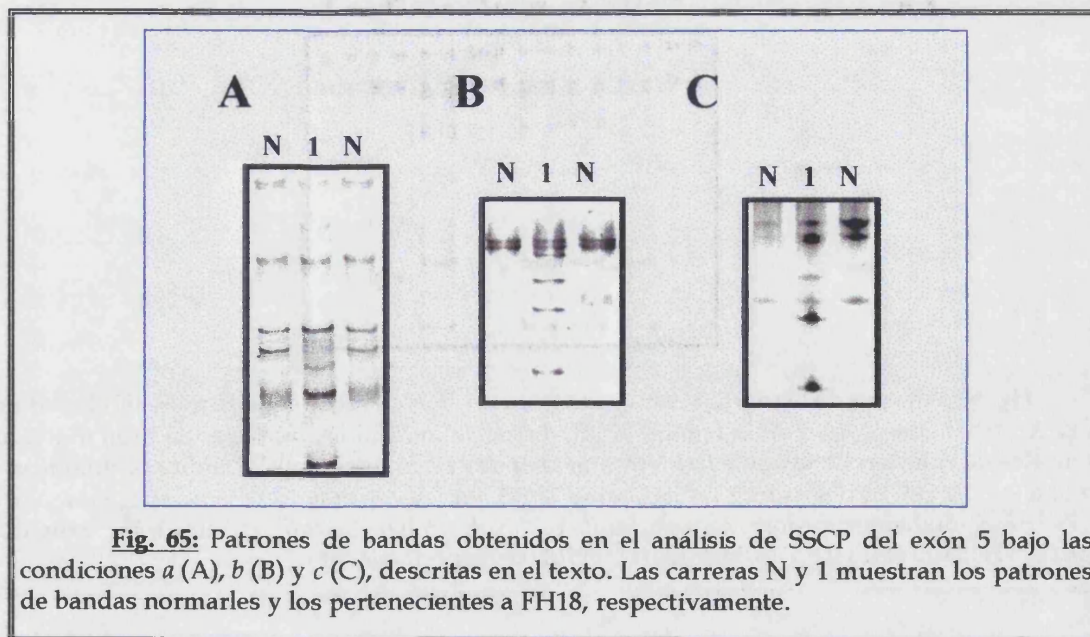
El exón 5 está compuesto por 122 nucleótidos localizados a partir del nucleótido 695 del cDNA (Fig. 64) y su secuencia codifica la repetición VI del dominio de unión al ligando.



El estudio para detectar las mutaciones en este exón se realizó en las siguientes condiciones:

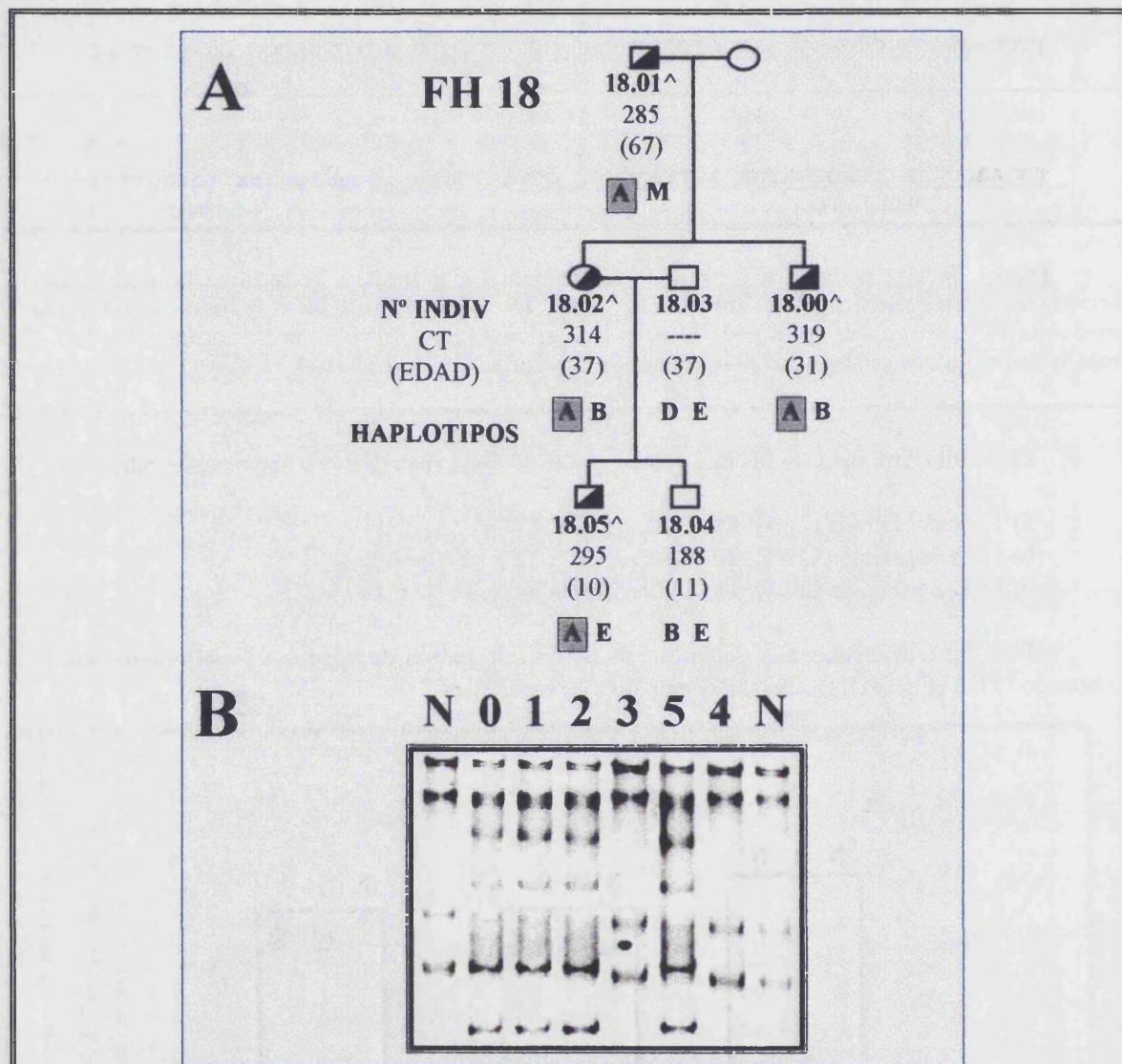
- a) 12 % acrilamida (29:1), 1 x TEB, 14 °C y 400 V.
- b) 15 % acrilamida (29:1), 10 % glicerol, 1 x TEB, 2 °C y 300 V.
- c) 15 % acrilamida (29:1), 18 % glicerol, 1 x TEB, 14 °C y 400 V.

Bajo las tres condiciones solamente se detectó un patrón de bandas anómalo perteneciente al probando FH18 (Fig. 65), fácilmente distinguible en todas ellas.



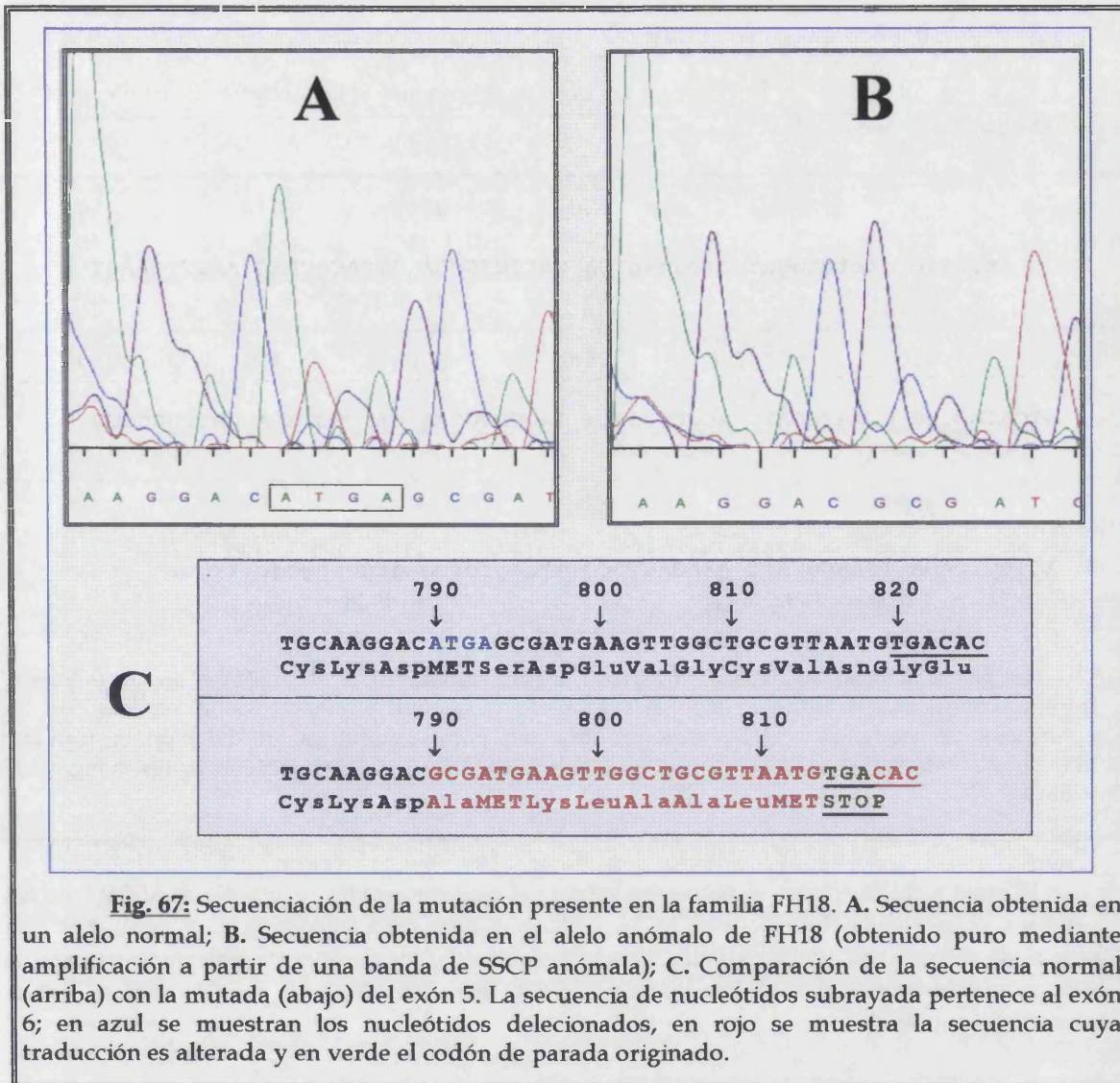


El estudio familiar se realizó en seis miembros de la familia del probando FH18 (Fig. 66), pertenecientes a tres generaciones (para más datos sobre esta familia ver Tabla 14, Pag. 75) comprobándose la cosegregación de la mutación con la enfermedad y con el haplotipo A (Fig. 23, Pag. 75). La posterior secuenciación de la mutación mostró que se trataba de una delección de 4 nucleótidos (ATGA) a partir del nucleótido 790 (Fig. 67), llamándose 790delATGA, que origina la ruptura de la pauta de lectura y la aparición de un codón de parada a 9 aminoácidos del punto de mutación. Se confirmó así que esta mutación era la causante de la enfermedad en esta familia ya que supone que el fragmento de proteína sintetizado sea totalmente afuncional, pues le faltan los dominios de homología con el EGF, de O-glicosilación, transmembrana y citosólico.



**Fig. 66:** Análisis de la segregación de la mutación 790delATGA en la familia FH18 mediante SSCP. A. Árbol genealógico de la familia FH18, donde se indican los números de cada individuo, sus niveles de colesterol total, su edad (entre paréntesis) y sus haplotipos; ^ indica la presencia de la mutación; B. SSCPs del exón 5 en la familia FH18, en las carreras N se muestran patrones de SSCPs correspondientes a controles y en las 0, 1, 2, 3, 4 y 5 los correspondientes a los individuos FH18.00, FH18.01, FH18.02, C18.03, C18.04 y FH18.05, respectivamente.

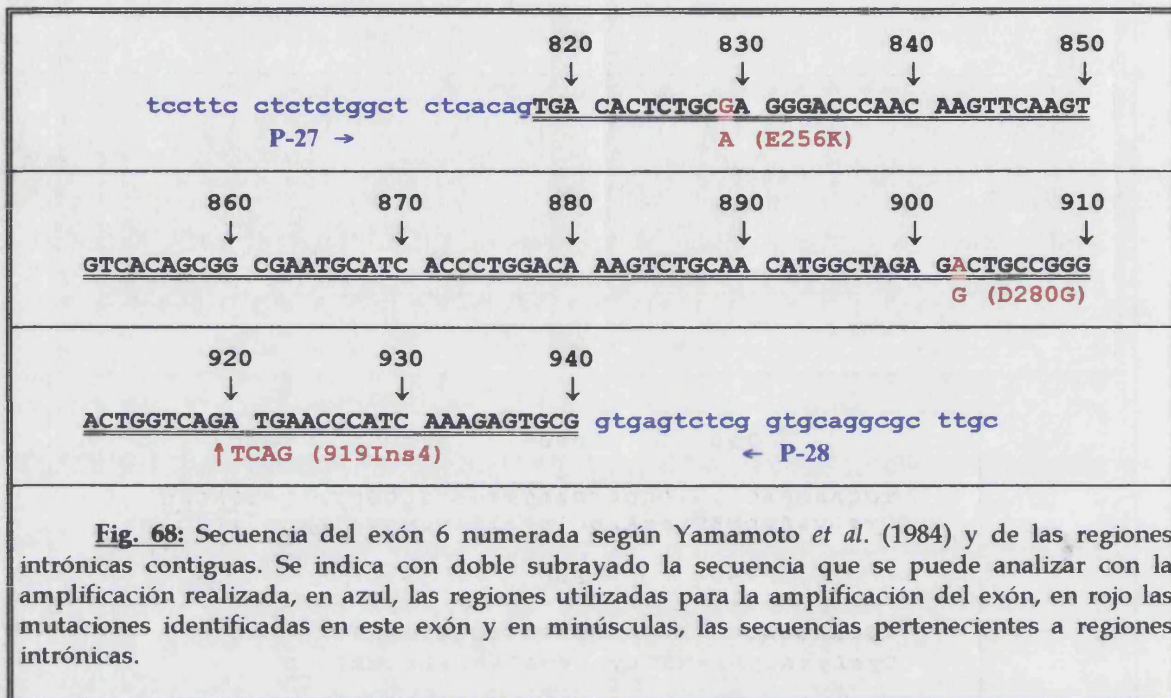




**Fig. 67:** Secuenciación de la mutación presente en la familia FH18. A. Secuencia obtenida en un alelo normal; B. Secuencia obtenida en el alelo anómalo de FH18 (obtenido puro mediante amplificación a partir de una banda de SSCP anómala); C. Comparación de la secuencia normal (arriba) con la mutada (abajo) del exón 5. La secuencia de nucleótidos subrayada pertenece al exón 6; en azul se muestran los nucleótidos delecionados, en rojo se muestra la secuencia cuya traducción es alterada y en verde el codón de parada originado.

IV.5.3.7. Exón 6.

En la Fig. 68 se muestra la secuencia del exón 6, indicándose la localización de los oligos (P-27 y P-28) utilizados en la amplificación.



El estudio del fragmento se ha realizado hasta el momento mediante análisis de SSCP bajo las siguientes condiciones de electroforesis: 15 % acrilamida 29:1, refrigerado a 8 °C y sometido a una diferencia de potencial de 400 V, durante 4 horas; estas condiciones mostraron diferentes patrones de SSCPs anormales en diferentes probandos (ver Fig. 69), estos patrones y los individuos en los que se localizaron fueron:

Patrón 1: FH6, FH23, FH46 y C58.1.

Patrón 2: FH14.

Patrón 3: FH35.

La secuenciación del exón de todos los individuos con los patrones anteriores mostró que cada patrón corresponde a una mutación diferente:

- El patrón 1 es producido por la mutación E256K, consistente en una transición de G a A en el nucleótido 829, que supone la sustitución de glutámico por lisina (como indica el nombre de la mutación). La sustitución en la secuencia de aminoácidos parece que deba tener un efecto importante en la funcionalidad del receptor al cambiarse un aminoácido cargado negativamente por uno con carga positiva, sobre todo por que este exón codifica la repetición VII (crucial para la unión de las LDL, Esser *et al.*, 1988). Sin embargo, hemos encontrado esta mutación en un individuo (C58.01) que es aparentemente sano y cuyo caso discutiremos más adelante (en este Apartado). Además, la mutación está presente en el probando FH6 (en el que hasta el momento no hemos encontrado otra mutación que explique su enfermedad). Finalmente, la mutación E256K está presente en FH23 y FH46 portadores, a su vez, de la mutación W-18K localizada en el exón 1.



- El patrón 2 es causado por la mutación 919Ins4, consistente en la inserción de 4 nucleótidos (TCAG) después del nucleótido 919, lo que origina el cambio de la pauta de lectura (ver Fig. 69). La nueva pauta supone la formación de un codón de parada un aminoácido después de la inserción por lo que funcionalmente esta mutación sería de tipo I. Por las características de esta mutación no queda duda de que es responsable de la enfermedad en los individuos portadores.

-El patrón 3 está producido por la mutación D280G, consistente en una transición de A a G en el nucleótido 902, que como indica el nombre de la mutación supone el cambio de aspártico 280 por glicina, lo que supone el cambio de un aminoácido cargado negativamente e hidrófilo por uno neutro. El cambio originado por esta mutación parece lo suficientemente importante como para ser causante de HF.

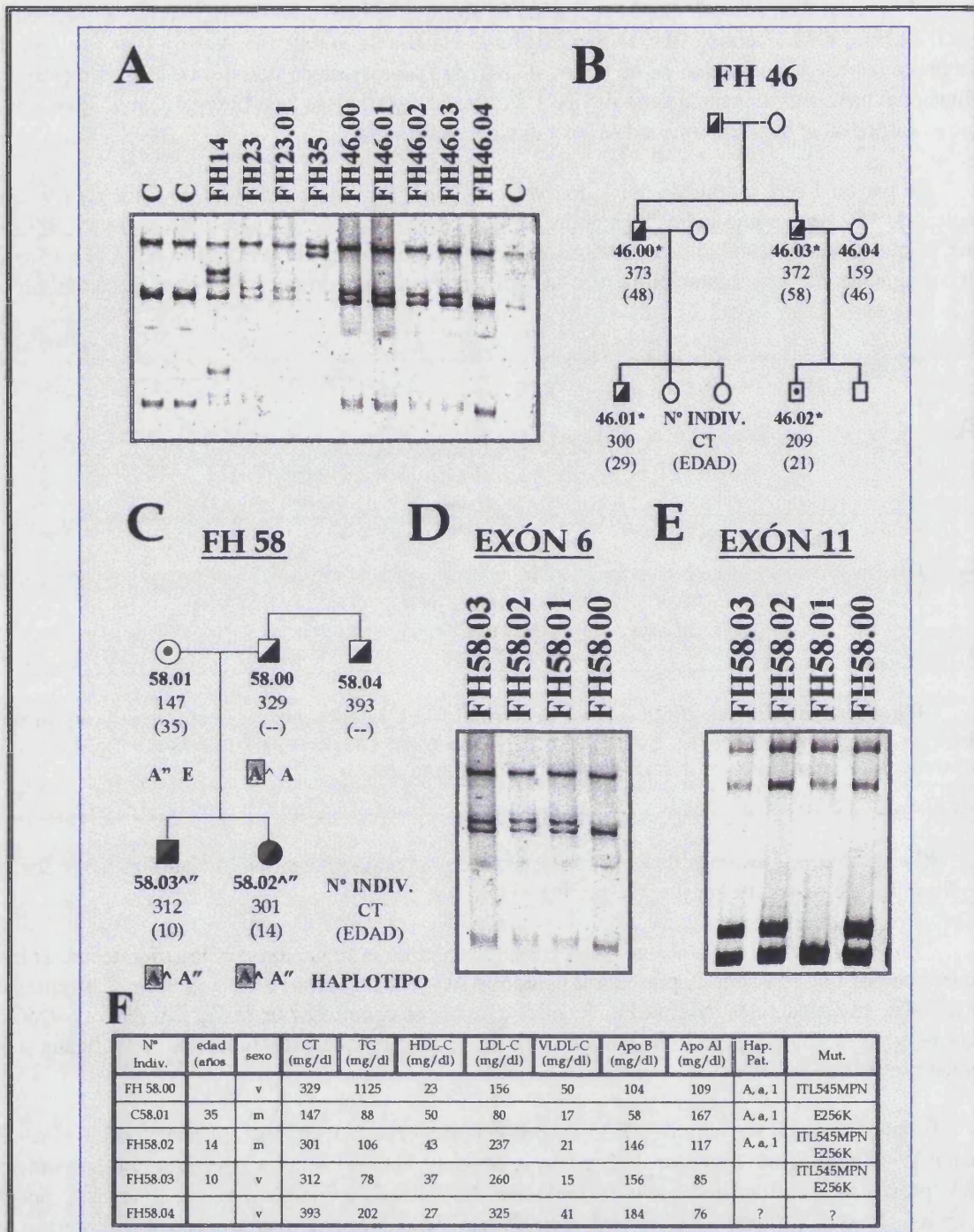
<b>A</b>	<p>910            920            930</p> <p>↓                ↓                ↓</p> <p>CGGGACTGGTCAGATGAACCCATCAAAGAGTGCG</p> <p>ArgAspTrpSerAspGluProIleLysGluCys</p>
<b>B</b>	<p>910            920            930</p> <p>↓                ↓                ↓</p> <p>CGGGACTGGTCAGTCAGATGAACCCATCAAAGAGTGCG</p> <p>ArgAspTrpSerValArgSTOP</p>
<p><b>Fig. 69:</b> Comparación de la secuencia normal (A) y la secuencia que contiene la mutación 919ins4 (B). Se indican en rojo los nucleótidos de la inserción y los posteriores a la misma, así como los aminoácidos cuya traducción ha sido alterada por la mutación.</p>	

El estudio de segregación de los patrones alterados se pudo realizar en las familias del probando FH46.00 y de C58.01 (perteneciente a la familia FH58), ver Fig. 70.

- En la familia FH46 se observa una cosegregación de la mutación con la enfermedad, si bien hay que recordar que esta familia presenta la mutación W-18X (Apartado IV.5.3.2., Pag. 120) que, sin lugar a dudas, es causante de enfermedad. También, se puede comprobar en la Fig. 70 que el patrón de bandas anormales cosegrega con la mutación W-18X, por lo que ésta mutación está ligada a la mutación presente en el exón 6.

El análisis de un pariente de FH23.00 denominado FH23.01, también paciente de HF y con la mutación W-18X, presentó el patrón 1. Por lo que podemos suponer que los pacientes con la mutación W-18X presentan en el mismo alelo la mutación E256K. Esta hipótesis se ve reforzada por la localización de otro probando HF no relacionado con los anteriores (de reciente incorporación en nuestra muestra y no incluido en este estudio) que presenta estas dos mutaciones.

- C58.01 presenta un fenotipo totalmente sano, ver Fig. 70. Se trata de la mujer del probando FH58.00 y plantea la posibilidad de que la mutación E256K no sea causante de HF. El problema procede de que sus dos hijos presentan la mutación y, además, también son portadores de la mutación de FH58 (ITL545MPN) sin presentar niveles de homocigotos (ver estudio realizado del exón 11, Apartado IV.5.3.8., Pag. 139). La imposibilidad de realizar el estudio de la familia de C58.01 ni en la del probando FH6 (también portador de la mutación E256K) dificulta las deducciones sobre el efecto de esta mutación en la funcionalidad del receptor. Independientemente, el estudio de esta mutación en células transfectadas con vectores portadores del cDNA del receptor en el que se haya introducido la mutación, por mutagénesis dirigida puede aportar una información válida sobre su efecto.



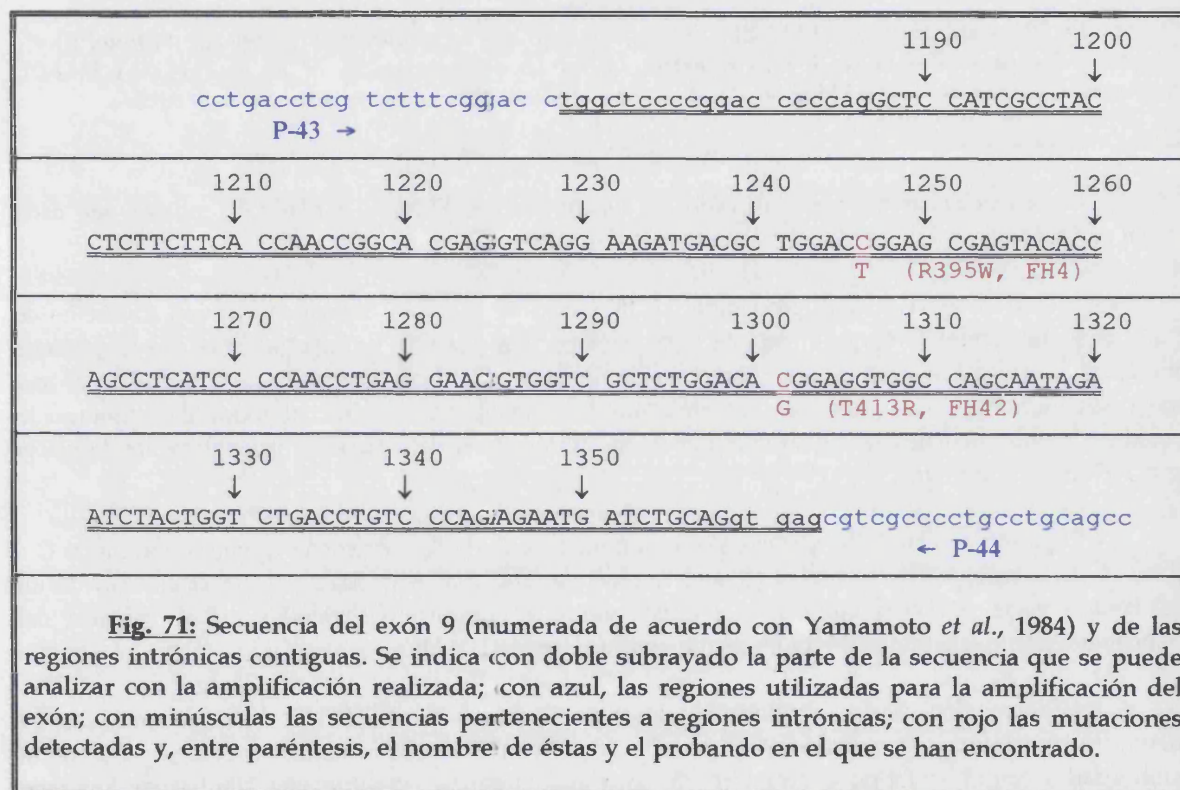
**Fig. 70:** Patrones de bandas de SSCP encontrados en el exón 6, segregación del patrón anómalo en la familia FH46 y estudio de la familia FH58. **A.** Patrones de SSCP obtenidos en las condiciones descritas en el texto y análisis de la familia FH46; **B.** Árbol de la familia FH46, donde se indican el número de cada individuo, los datos de colesterol total y edad de cada miembro (entre paréntesis); \* indica la presencia de las mutaciones W-18X y E256K. **C.** Árbol familiar FH58; **D.** Resultado del análisis mediante SSCP de la mutaciones E256K (exón 6) en la familia FH58; **E.** Resultado del análisis mediante SSCP de la mutación ITL545MPN (exón 11) en la familia FH58; **F.** Datos bioquímicos de la familia FH58. " y ^ indican la presencia de la mutación E256K e ITL545MPN; ? indica que su DNA no ha sido estudiado y presenta síntomas de HF.



IV.5.3.8. Exón 9.

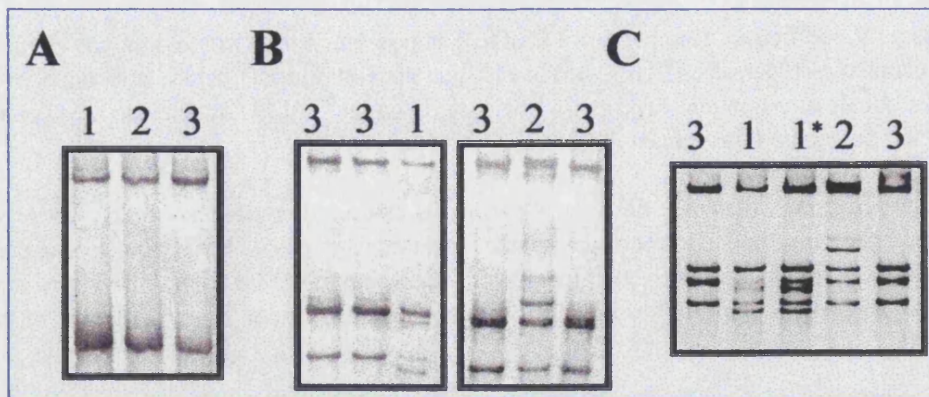
El exón 9 codifica un fragmento del RLDL que posee una gran homología con el precursor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), siendo esta una zona importante debido a su papel estructural y funcional, ya que de este dominio depende la liberación de las LDL en los endosomas, dependiente de la acidificación del medio (Davis *et al.*, 1987).

La amplificación realizada del exón 9 permite el estudio de toda la secuencia del exón y de las secuencias más próximas de los intrones colindantes mediante análisis de SSCP, por lo que teóricamente podríamos detectar todas las mutaciones localizadas en este exón y las alteraciones que supongan el cambio de las secuencias importantes para el "splicing" situadas en la unión entre los intrones y los exones (Fig. 71).



El estudio del fragmento se realizó mediante análisis de SSCPs (Fig. 72), indicándose a continuación las condiciones utilizadas y los resultados obtenidos:

- a) 15 % acrilamida 29:1, refrigerado a 14 °C y sometido a una diferencia de potencial de 400 V durante 4 horas: no se detectó ningún patrón de bandas alterado.
- b) 12 % acrilamida 29:1, refrigerado a 2 °C y sometido a una diferencia de potencial de 400 V durante 4 horas: se detectaron dos patrones de bandas anómalos, uno en FH4 y otro en FH42.
- c) 17 % acrilamida 29:1, refrigerado a 2 °C y sometido a una diferencia de potencial de 400 V durante 4 horas: se obtuvo el mismo resultado que en las condiciones b.



**Fig. 72:** Análisis mediante SSCPs del exón 9 bajo las condiciones *a* (panel A), *b* (panel B) y *c* (panel C), descritas en el texto. 1 y 1\* muestran el patrón de bandas de SSCPs en FH4.00 y FH4.01, 2 muestra el patrón obtenido FH42.00 y 3 el de los patrones obtenidos en diferentes controles.

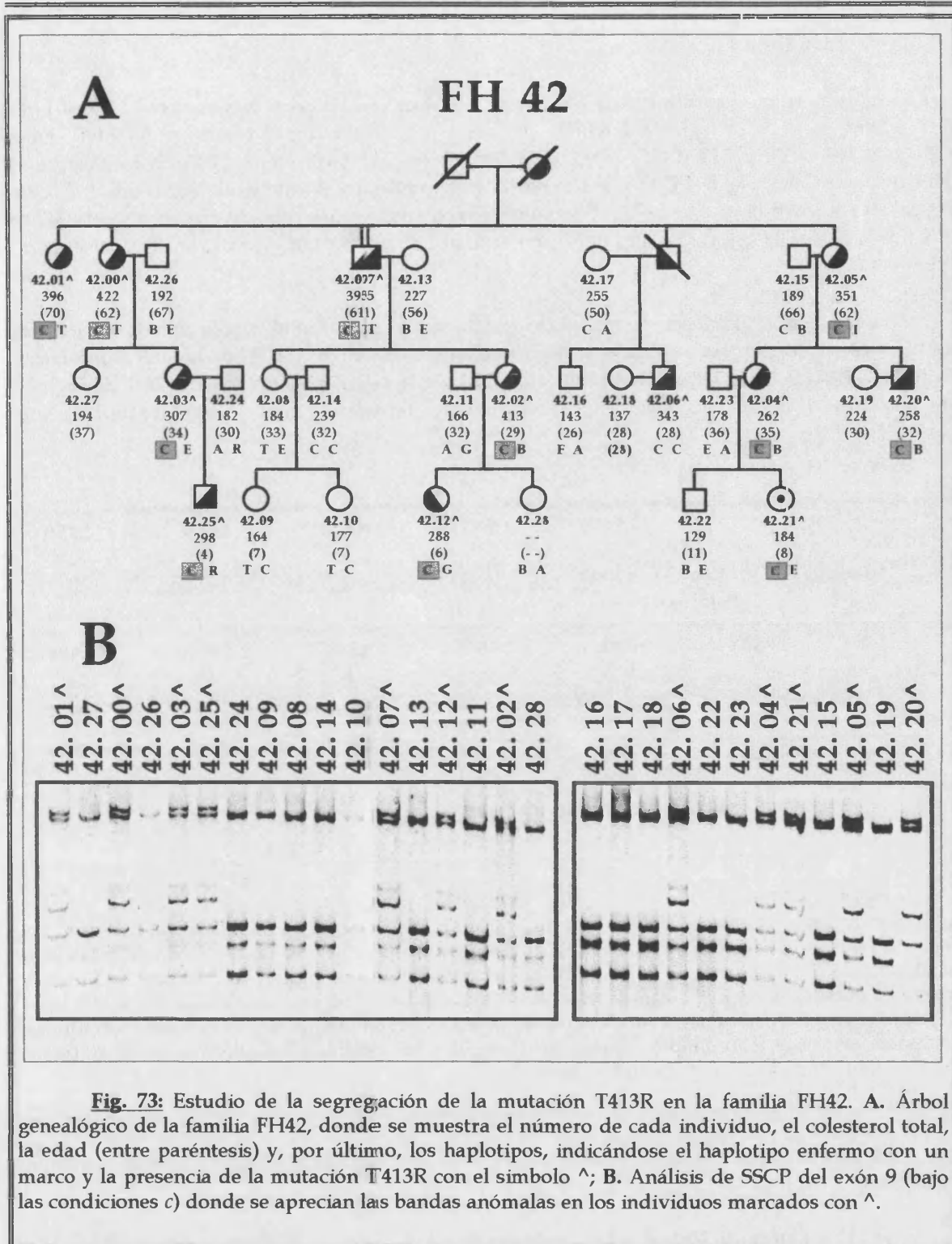
La secuenciación del alelo alterado en los probandos FH4.00 y FH42.00 mostró que cada patrón correspondía a una mutación diferente (ver Fig. 71):

- El patrón de FH4.00 es producido por la mutación R395W, consistente en una transición de C a T en el nucleótido 1246, que supone la sustitución de Arg por Trp. La sustitución en la secuencia de aminoácidos parece que sea muy importante al cambiarse uno cargado positivamente e hidrófilo por uno sin carga e hidrófobo, además de cambiar considerablemente el volumen, lo cual podría desestabilizar la región en la que se encuentra el cambio; por tanto, la mutación detectada es, probablemente, la causa de la HF en los portadores.

- El patrón de FH42.00 es causado por la mutación T413R, consistente en una transversión C a G en el nucleótido 1301, lo que origina el cambio de Thr por Arg. Esto supone el cambio de un aminoácido polar por otro con carga positiva y un incremento considerable en el volumen del aminoácido, por lo que también esta mutación podría ser causa de HF.

La segregación de esta mutación pudo seguirse en la familia FH42, la cual consta de 29 miembros, mediante análisis de SSCP. El estudio familiar mostró que la mutación cosegregaba con la enfermedad y con el haplotipo C (ver Fig. 73; para más información sobre esta familia ver Apartado IV.4.1.9., Pag. 82). Como resultado más interesante hay que indicar que la niña C42.21 fue clasificada como sana por los datos clínico-bioquímicos (ver Tabla 19, Pag. 83) pero el análisis genético, tanto indirecto como directo indica que es una portadora asintomática, por ahora, de HF.



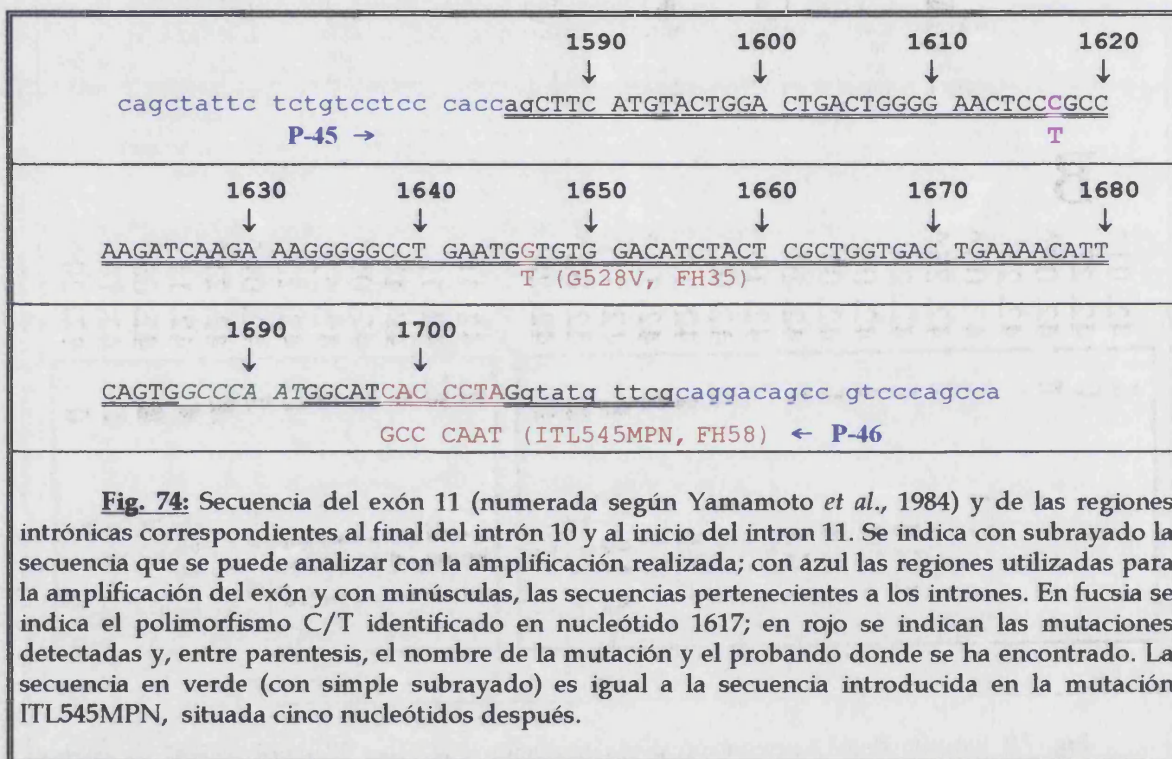


**Fig. 73:** Estudio de la segregación de la mutación T413R en la familia FH42. A. Árbol genealógico de la familia FH42, donde se muestra el número de cada individuo, el colesterol total, la edad (entre paréntesis) y, por último, los haplotipos, indicándose el haplotipo enfermo con un marco y la presencia de la mutación T413R con el símbolo ^; B. Análisis de SSCP del exón 9 (bajo las condiciones c) donde se aprecian las bandas anómalas en los individuos marcados con ^.

IV.5.3.8. Exón 11.

El exón 11 es una secuencia de 199 nucleótidos, localizados entre las posiciones 1586 y 1785, que codifica parte de la región del RLDL que posee homología con el precursor del EGF. En el nucleótido 1617, codón 518 (CCC=Pro), se ha descrito un polimorfismo de secuencia que supone un cambio de una C por una T (CCT) y que no provoca un cambio en el aminoácido que codifica el codón (Yamakawa-Kobayashi *et al.*, 1993). Este polimorfismo se presenta con una frecuencia del 28/72% (T/C) en la población japonesa, única población en la que se ha descrito (Yamakawa-Kobayashi *et al.*, 1993).

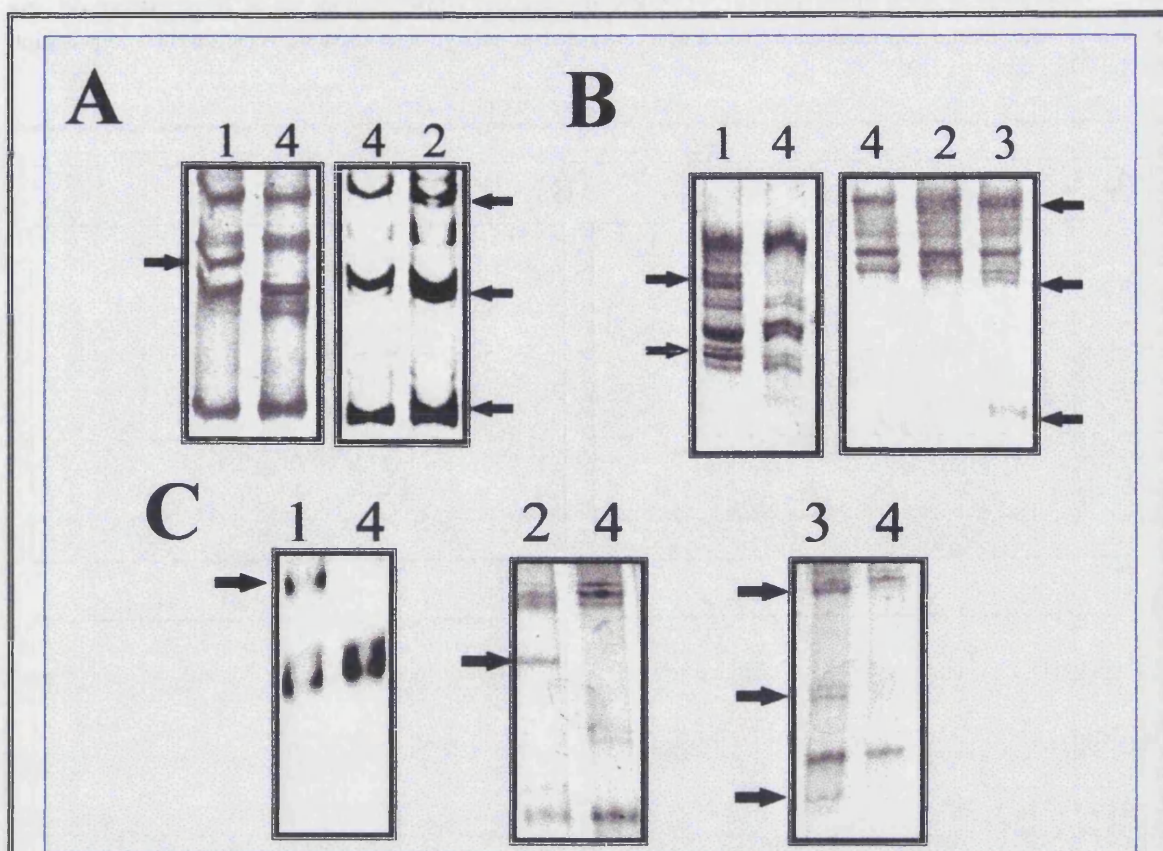
Los oligos empleados en la amplificación del exón 11 permiten el estudio de todo el exón y de las regiones de los intrones contiguas al exón mediante análisis de SSCP por lo que, teóricamente, podríamos detectar todas las mutaciones localizadas en este exón y las alteraciones que supongan el cambio de las secuencias más importantes en el "splicing" situadas en la unión entre los intrones y los exones (Fig. 74).



El estudio del fragmento se realizó mediante análisis de SSCP (Fig. 75) bajo las siguientes condiciones:

- 15 % acrilamida 29:1, 1 x TEB, refrigerado a 1 °C y sometido a 400 V durante 3 horas: se detectaron dos patrones anómalos diferentes en FH35 y FH58, presentando este último una banda de heteroduplex.
- 15 % acrilamida 29:1, 10 % glicerol, 1 x TEB, refrigerado a 2 °C y sometido a una diferencia de potencial de 400 V: además de patrones anómalos en FH35 y FH58, se detectó un tercer patrón anómalo en los probandos 8, 21, 50, 47.06, 57 y 62, así como en los controles 24, 28, 44, 45, 63, 66, 68 y 72.
- 15 % acrilamida 29:1, 18 % glicerol, 1 x TEB, refrigerado a 2 °C y sometido a una diferencia de potencial de 400 V: se detectaron los tres patrones anómalos en los mismos individuos.





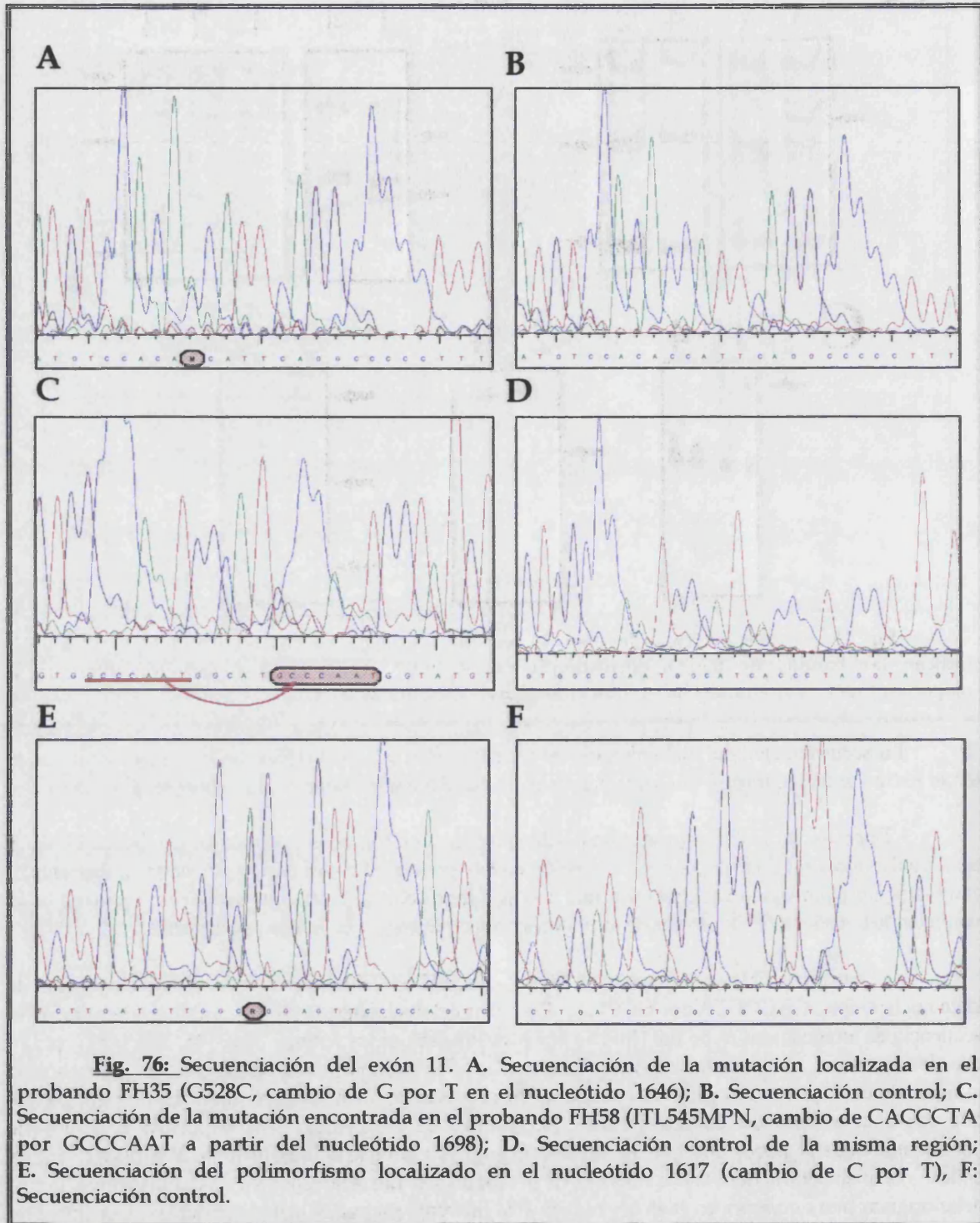
**Fig. 75:** Análisis de SSCP del exón 11 bajo las condiciones *a* (A), *b* (B) y *c* (C). 1, 2, 3 y 4 indican las bandas de SSCP correspondientes a FH35, FH58, FH8 e individuos control, respectivamente; con una flecha se indican las bandas anómalas de SSCP.

La secuenciación del alelo alterado de los probandos FH35, FH58 y de los que presentaron el tercer patrón anómalo mostró que cada patrón correspondía a una mutación diferente (ver Fig. 76):

- El patrón de FH35 es producido por la mutación G528V, consistente en un cambio de G por T en el nucleótido 1646, que supone la sustitución de Gly por Val. La sustitución parece ser importante al cambiarse un aminoácido sin carga por uno apolar e hidrófobo, a la vez que supone un aumento en el volumen de la cadena del aa, lo cual podría desestabilizar la región en la que se encuentra.

- El patrón de FH58 es causado por la mutación ITL545MPN, consistente en una sustitución de siete nucleótidos: CACCCTA por GCCCAAT a partir del nucleótido 1698. El cambio que origina en la secuencia de aminoácidos es de Ile-Thr-Leu por Met-Pro-Asn en los aminoácidos 545, 546 y 547, por lo que la mutación es lo suficientemente importante (los cambios producidos en los aminoácidos individualmente, son muy significativos menos en el primer aminoácido sustituido) como para pensar que causa la enfermedad en este paciente. El cambio de siete nucleótidos explicaría la banda de heteroduplex que se puede observar en FH58 (ver Fig. 77), ya que el alelo mutado al asociarse con la cadena complementaria dejaría dos nucleótidos desapareados, dos apareados y tres desapareados, lo que debe originar una curvatura en la doble cadena y la diferente migración del heteroduplex. El cambio de secuencia producido afecta desde el nucleótido 8° hasta el 2°, anteriores al final del exón, por lo que la alteración podría afectar al "splicing" de este exón y tendría un efecto mucho mayor sobre la síntesis de la proteína que la mera sustitución de tres aminoácidos. La alteración del "splicing" seguramente ocasionaría la pérdida total de la funcionalidad del receptor y determinaría que la mutación fuese de tipo I. La verificación de este extremo se realizará en breve mediante el análisis del mRNA en los pacientes con esta mutación.

Por otro lado la mutación ITL545MPN parece ser consecuencia de la duplicación de una secuencia localizada 5 nucleótidos antes en el exón y que sustituye a la secuencia original en la posición 1698-1705 (ver Fig. 76).

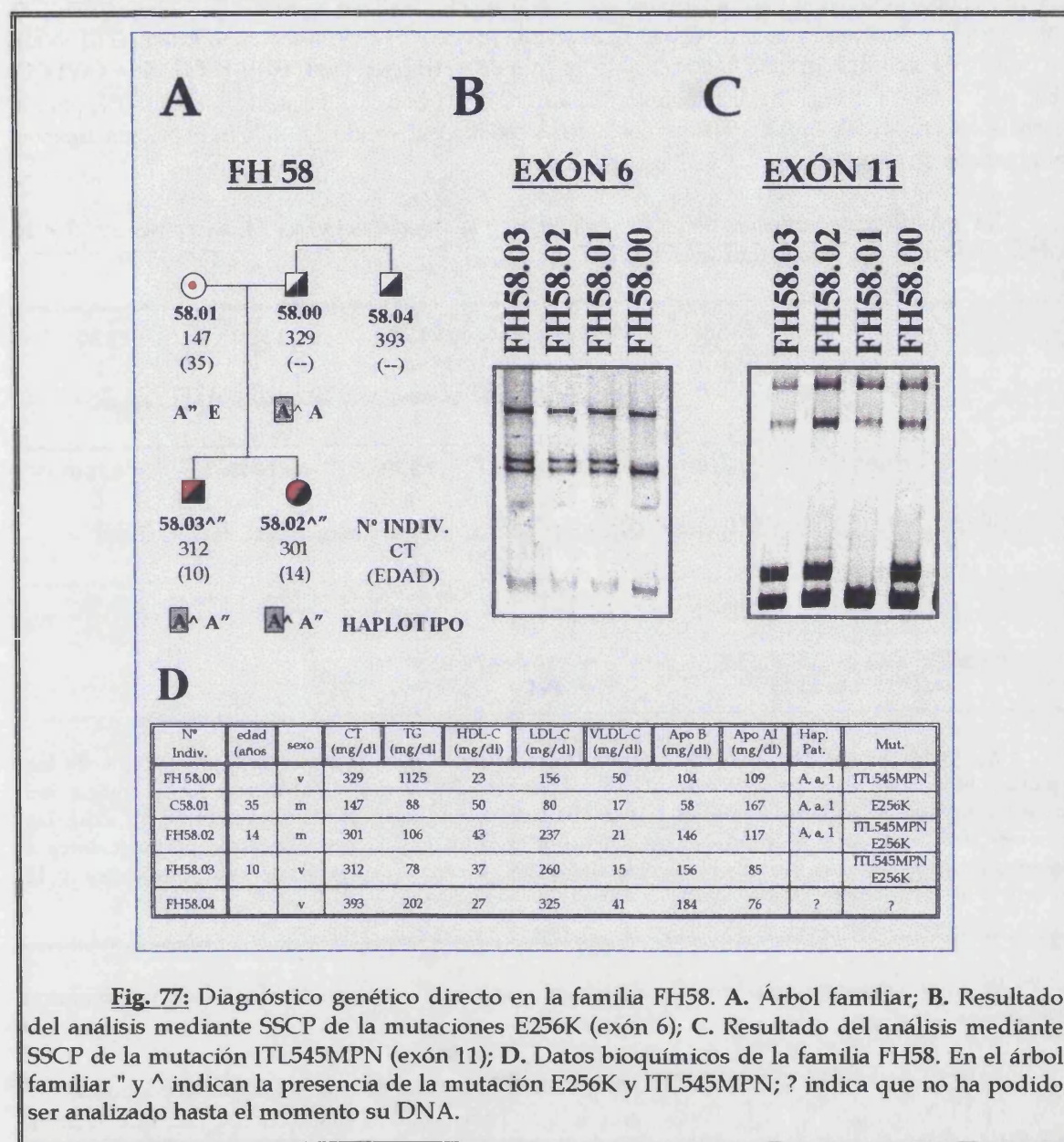


**Fig. 76:** Secuenciación del exón 11. A. Secuenciación de la mutación localizada en el probando FH35 (G528C, cambio de G por T en el nucleótido 1646); B. Secuenciación control; C. Secuenciación de la mutación encontrada en el probando FH58 (ITL545MPN, cambio de CACCCTA por GCCCAAT a partir del nucleótido 1698); D. Secuenciación control de la misma región; E. Secuenciación del polimorfismo localizado en el nucleótido 1617 (cambio de C por T), F: Secuenciación control.

La segregación de la mutación ITL545MPN pudo estudiarse en 4 miembros de la familia FH58 mediante el análisis por SSCP del exón 11 en cada uno de ellos. El estudio se realizó utilizando las condiciones *b*, con las que se pudo observar que los individuos FH58.00, FH58.02 y FH58.03 presentan la alteración, mientras que C58.01 no la presenta (ver Fig. 77). C58.01 presenta la mutación E256K, como ya se comentó en el Apartado IV.5.3.7. (Pag. 136), en el exón 6 que también presentan sus dos



hijos (FH58.02 y FH58.03). Según esto, los pacientes FH58.02 y FH58.03 son heterocigotos compuestos para la enfermedad, si bien los niveles de CT no son propios de estos pacientes. Por lo tanto, o han heredado un factor protector de su madre, la cual sería asintomática, o la mutación E256K no afecta funcionalmente al receptor.



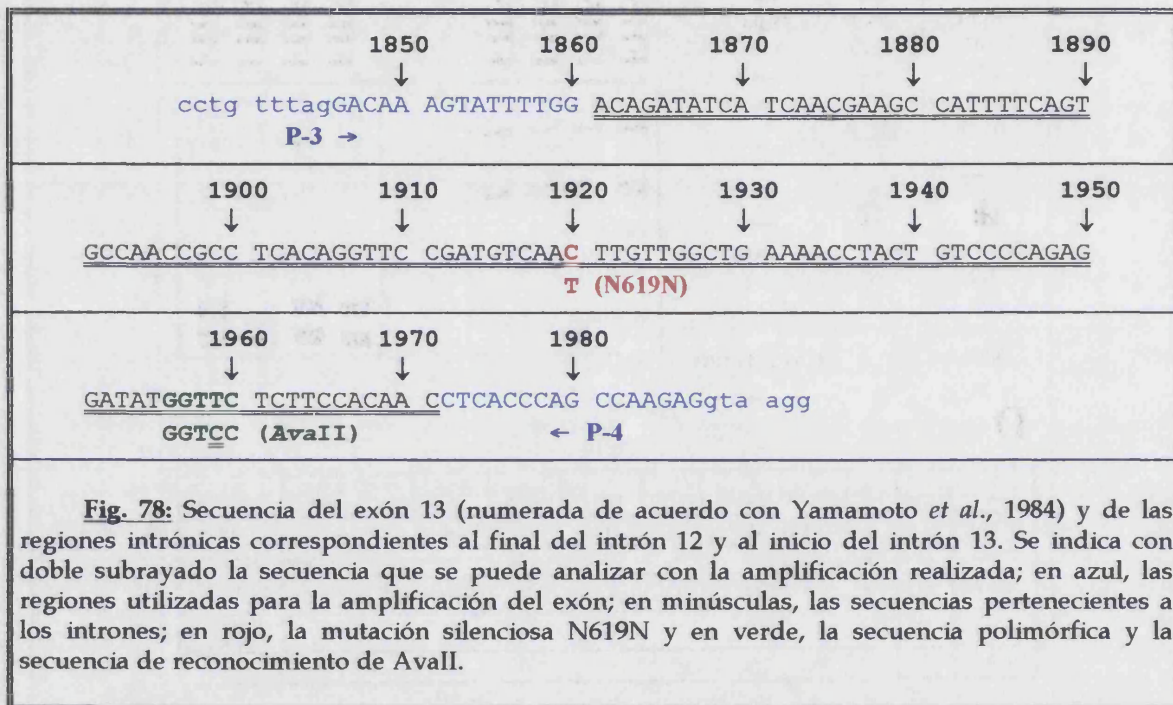
**Fig. 77:** Diagnóstico genético directo en la familia FH58. **A.** Árbol familiar; **B.** Resultado del análisis mediante SSCP de la mutaciones E256K (exón 6); **C.** Resultado del análisis mediante SSCP de la mutación ITL545MPN (exón 11); **D.** Datos bioquímicos de la familia FH58. En el árbol familiar " y ^ indican la presencia de la mutación E256K y ITL545MPN; ? indica que no ha podido ser analizado hasta el momento su DNA.

- El tercer patrón de SSCP, encontrado en enfermos, familiares no consanguíneos y controles, corresponde al polimorfismo descrito por Yamakawa-Kobayashi *et al.* (1993). La frecuencia de este polimorfismo en la población española es de 4.4/95.6% y 7.8/92.2% T/C en HF y en Controles, respectivamente. Esta frecuencia es significativamente diferente de la dada en población japonesa. La baja frecuencia de este polimorfismo, su bajo contenido informativo (PIC de 0.078 y 0.132 para HF y Controles, respectivamente) y, posiblemente, su alto grado de ligamiento con otros polimorfismos más frecuentes (como los presentes en el exón 12, supone que no sea muy útil su uso en el diagnóstico de la HF en población española), si bien, siempre puede ayudar a resolver la cosegregación en alguna familia.

IV.5.3.9. Exón 13.

El exón 13 está formado por una secuencia de 142 nucleótidos, localizados entre 1846 y 1997 del cDNA, que codifican parte de la región del RLDL que posee homología con el precursor del EGF. En el nucleótido 1959, en la tercera base del codón 632 (GTC=Val), se ha descrito un polimorfismo de secuencia que supone un cambio de C por T, teniendo el codón 632 el mismo significado (GTT=Val); este cambio de secuencia origina la creación de un sitio de restricción para *AvaII* (GGTTC → GGTCC) (Ahn. et al., 1994, ver Fig. 78). Este polimorfismo se presenta con una frecuencia del 40-50%, para la presencia del sitio *AvaII*, en las diferentes poblaciones estudiadas, siendo del 40% en población española (para más datos ver Apartado IV.3.2., Pag. 57).

La amplificación realizada de esta región permite el estudio del exón 13, exceptuando 15 y 16 bp de los extremos 5' y 3' respectivamente (Fig. 78).



El estudio del fragmento amplificado se realizó mediante análisis de SSCP bajo las siguientes condiciones:

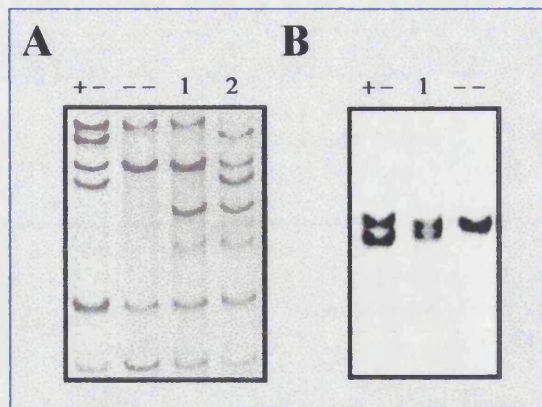
- 12 % acrilamida 29:1, 1 x TEB, refrigerado a 8 °C y sometido a 350 V, durante 2 horas.
- 13 % acrilamida 29:1, 10 % glicerol, 1 x TEB, a 20 °C y sometido a una diferencia de potencial de 400 V.

En ambas condiciones se detectó en algunos miembros de la familia FH13 y en el probando FH37 un patrón de bandas diferente al correspondiente al polimorfismo *AvaII*, (ver Fig. 79).

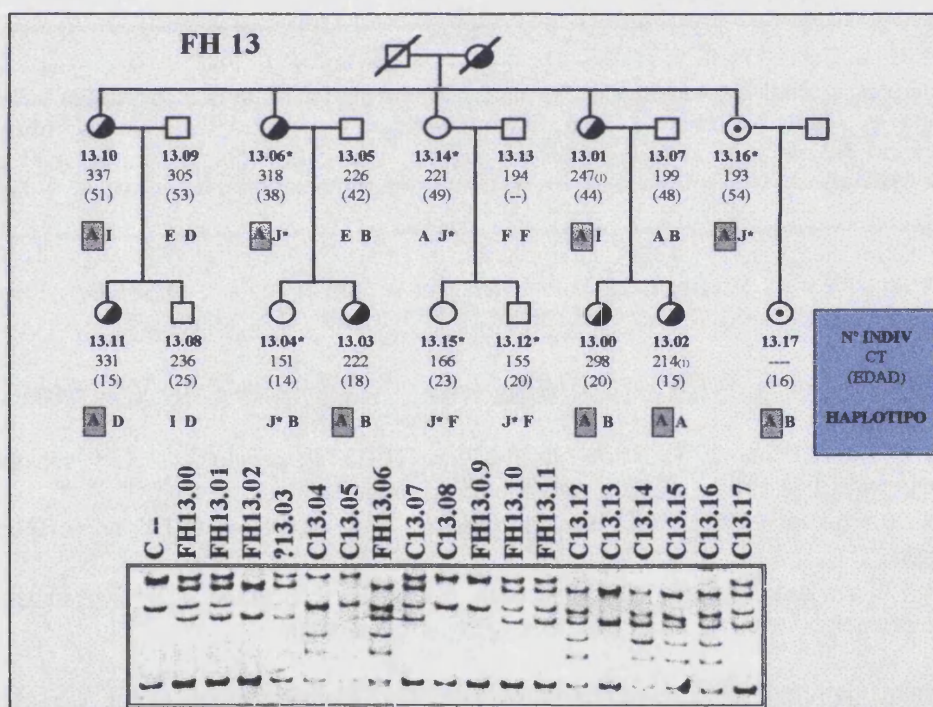
La secuenciación del alelo diferente en los individuos C13.04, C13.15 y FH37 permitió comprobar que se trataba de la misma alteración de la secuencia. La mutación encontrada en estos individuos consiste en un cambio de C por T en el nucleótido 1920; este nucleótido es el tercero del codón 619 (AAC → AAT) y la mutación no supone cambio de aminoácido (Asn), siendo denominada por tanto N619N. Debido a que solo hemos encontrado esta alteración en 1 probando y en familiares de otro probando (ver Fig. 80), deducimos que la frecuencia de este polimorfismo de secuencia es muy baja (en



torno al 1 %) y, por tanto, la información potencial que ofrece es muy pequeña, si bien puede ser interesante en el diagnóstico para algunas familias donde otros polimorfismos no sean informativos.



**Fig. 79:** Análisis de SSCP del exón 13. A. Resultados obtenidos con las condiciones a; B. Resultados obtenidos con las condiciones b. + y - indican la presencia o ausencia del sitio *Avall*; 1 y 2 indican los patrones obtenidos con FH13.04 y FH37. FH13.04 y FH37 son - - y +- para *Avall*, respectivamente.

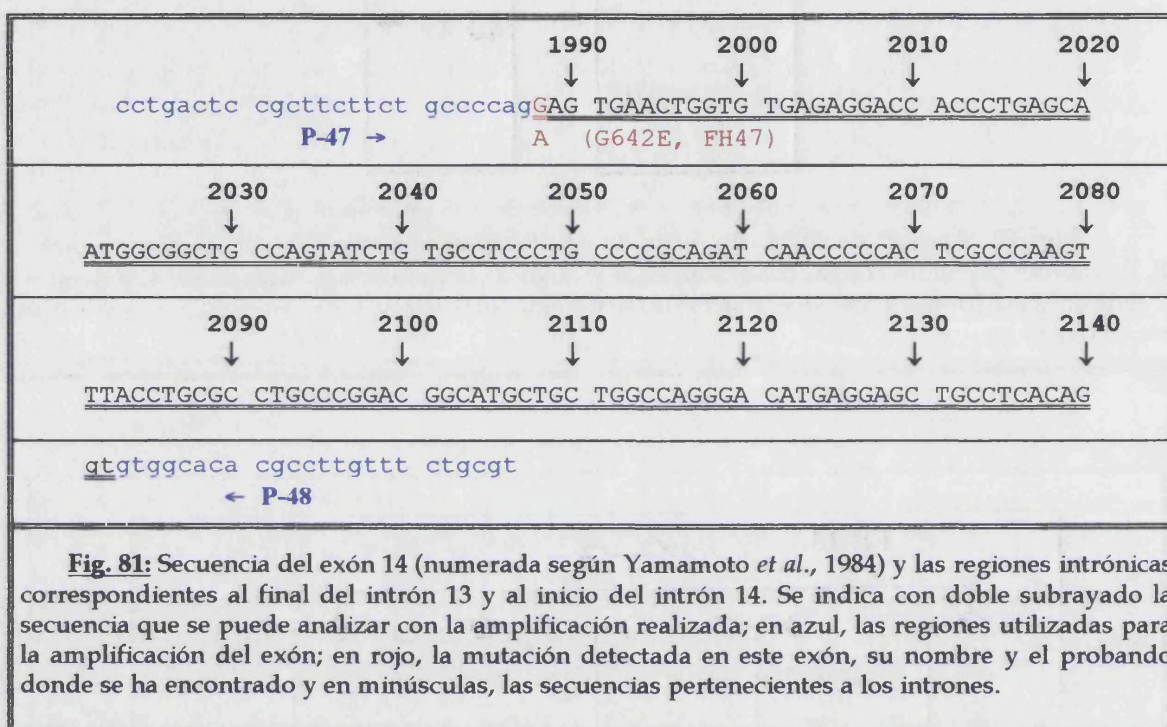


**Fig. 80:** Estudio de la segregación de N619N y de haplotipos en la familia FH13. El haplotipo enmarcado segrega con la enfermedad (presenta la alteración Valencia-5) y el asterisco indica la presencia de la mutación N619N; C y FH indican diagnóstico sano y enfermo de HF clínico-bioquímico, respectivamente; (1) indica que los datos bioquímicos se han obtenido cuando el paciente se encontraba bajo tratamiento con dieta.

IV.5.3.10. Exón 14.

El exón 14 consta de 153 nucleótidos, localizados entre las posiciones 1988 y 2140, y codifica la tercera repetición de la región del RLDL que posee homología con el precursor del EGF.

Los oligos empleados en la amplificación del exón 14 permiten el estudio de todo el exón y los dos nucleótidos iniciales del intrón 14 mediante análisis de SSCP (Fig. 81).

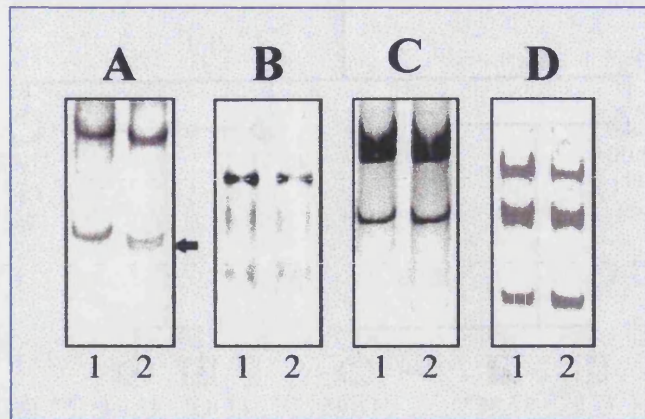


A continuación se describen las condiciones usadas para el análisis de SSCPs y los resultados obtenidos (ver Fig. 82):

- a) 15 % acrilamida 29:1, 1 x TEB, refrigerado a 2 °C y sometido a 400 V: se detectó un patrón anómalo en FH47.
- b) 15 % acrilamida 29:1, 10 % glicerol, 1 x TEB, refrigerado a 2 °C y sometido a una diferencia de potencial de 400 V: no se detectó ningún patrón anómalo.
- c) 20 % acrilamida 29:1, 1 x TEB, refrigerado a 2 °C y sometido a 400 V: no se detectó ningún patrón anómalo.
- d) 12 % acrilamida 29:1, 12 % glicerol, 1 x TEB, refrigerado a 2 °C y sometido a una diferencia de potencial de 400 V: no se detectó ningún patrón anómalo.

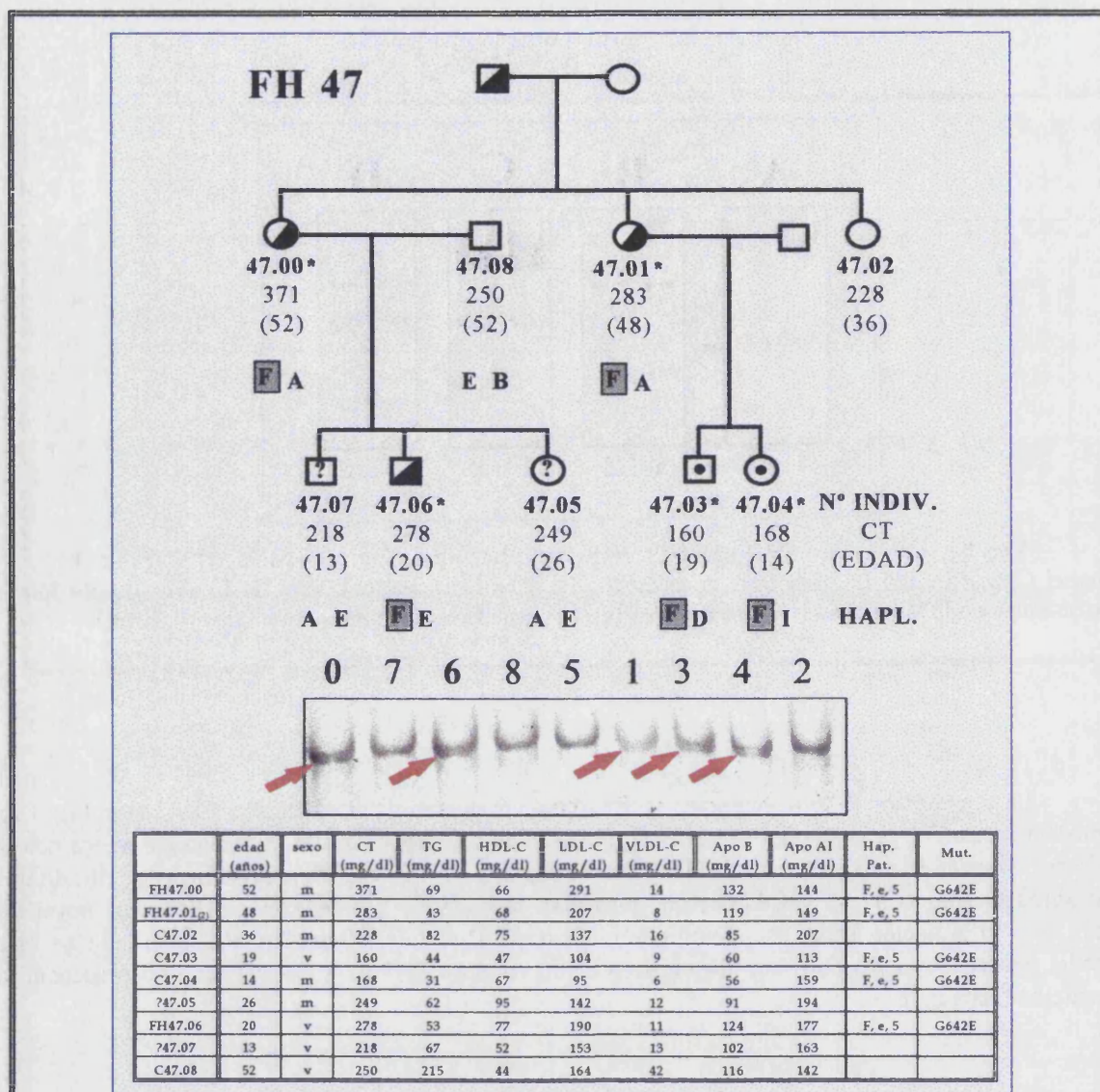
La mutación responsable del patrón alterado de FH47 es un cambio de G por A en el nucleótido 1988; este nucleótido es el segundo del codón 642 (GGA) que codifica Gly, mientras que el resultante de la mutación (GAA) codifica Glu. Por lo tanto, la mutación se denomina G642E (ver Fig. 81). El cambio originado en la secuencia peptídica de la proteína parece suficiente para considerarla responsable de la enfermedad en este probando, ya que introduce un aminoácido con carga negativa e hidrófilo en lugar de uno neutro no polar, a la vez que el volumen de la cadena lateral aumenta considerablemente con el aminoácido codificado por la mutación. Además, la localización de la mutación puede originar una alteración en el proceso de "splicing", ya que se localiza en el primer nucleótido del exón y este nucleótido es importante en el procesado del RNA mensajero.





**Fig. 82:** Análisis de SSCP del E14. Siguiendo las condiciones *a* (panel A), *b* (panel B), *c* (panel C) y *d* (panel D), descritas en el texto. 1 y 2 indican los patrones de bandas de SSCPs normales y en FH47, respectivamente. Se indica con una flecha la banda anómala encontrada.

La segregación de esta mutación se estudió en 9 miembros de la familia FH47 (ver Fig. 83), pertenecientes a dos generaciones. En este estudio se pudo comprobar que la mutación cosegrega con la enfermedad en la rama familiar de FH47 y con el haplotipo F. En esta familia se han encontrado dos miembros jóvenes (C47.03 y C47.04) que presentan la mutación y tienen niveles lipídicos normales (para más información sobre esta familia ver Apartado IV.4.1.11., Pag. 86). Por otro lado en esta familia existen dos individuos con diagnóstico clínico dudoso, ?47.05 y ?47.07, que no presentan la alteración (ver Fig. 83).



**Fig. 83:** Diagnóstico clínico-bioquímico y genético de la familia FH47. En esta figura se puede ver, en la parte superior, el árbol genealógico de la familia FH47 (donde se indica el número de cada individuo, el colesterol total, la edad, entre paréntesis, y el haplotipo, señalándose el que cosegrega con la enfermedad mediante un marco y la presencia de la mutación con un asterisco), debajo, la detección de la mutación mediante las condiciones *a* de SSCPs y, en la parte inferior, los datos bioquímicos de la familia FH47. Los números 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 corresponden con los respectivos números 47.00, 47.01, etc. de los miembros de la familia; ? indica que el diagnóstico clínico-bioquímico es dudoso.



# ***DISCUSIÓN***



## V.1. INNOVACIONES TECNOLÓGICAS EN EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE LA HF.

En los últimos años ha habido una eclosión de técnicas de ADN que están suponiendo un avance considerable en el conocimiento del genoma humano. Estas técnicas pueden aplicarse al diagnóstico de enfermedades genéticas, haciéndolo más seguro y rápido, facilitando, cuando es posible, un tratamiento preventivo. Uno de los objetivos de nuestro trabajo ha sido adecuar algunas de las técnicas desarrolladas recientemente (como son el PCR, tanto en su versión "corta" como "larga", el análisis de SSCPs y la secuenciación automática) al diagnóstico genético de la HF.

### V.1.1. Análisis de SSCPs.

1- El análisis de los polimorfismos mediante amplificación por PCR y análisis por SSCPs presenta diversas ventajas, tales como:

a) La obtención de resultados más fiables en el caso de RFLPs, ya que se evitan los resultados confusos proporcionados por digestiones parciales, relativamente frecuentes cuando los polimorfismos se analizan en fragmentos de DNA, amplificados por PCR, de pequeño tamaño.

b) Obtención más rápida de resultados, al realizarse el protocolo completo (una vez se ha obtenido el amplificado), en 4 horas aproximadamente, frente a las más de 12 horas aconsejables para obtener un resultado mediante digestión con enzimas de restricción.

c) Posibilidad de detectar, al mismo tiempo, la mutación responsable de la enfermedad, con lo que, una vez caracterizada ésta por secuenciación, se podría realizar el diagnóstico directo de la enfermedad en la familia analizando el patrón de SSCPs de sus miembros.

2- La utilización del análisis de SSCPs para detectar polimorfismos nos ha permitido la identificación de un sistema trialélico constituido por los polimorfismos *HincII* y  $C \rightarrow T_{1725}$ , situados en el exón 12, que pueden analizarse conjuntamente con esta técnica y ofrecen un valor PIC de 0.54 en nuestra población (O. Puig *et al.*, 1996), con lo cual se obtiene un rendimiento diagnóstico elevado con un solo experimento.

3- El rastreo de mutaciones en las diferentes regiones exónicas nos ha permitido la detección de la mayoría de las mutaciones localizadas en las mismas, ya que al hacer el análisis de SSCPs en diferentes condiciones, aumenta la capacidad de la técnica para detectarlas (Leren *et al.*, 1993; Sheffield *et al.*, 1993).

Una limitación que presenta la técnica de SSCPs en la detección de polimorfismos y mutaciones es que se deben analizar fragmentos de un tamaño no superior a 500-600 pb, pues si son mayores la técnica va perdiendo resolución y se requieren tiempos más largos de electroforesis (Sharkar *et al.*, 1992; Sheffield *et al.*, 1993). Por el momento, esta limitación impide la aplicación de esta técnica a polimorfismos situados en regiones intrónicas amplias cuya secuencia no se conoce o bien en regiones de difícil amplificación (por localizarse entre secuencias repetitivas o variables). Como alternativa, están ya empezándose a aplicar técnicas basadas en el empleo de "Cleavase I" (Life Technologies, Boehringer Mannheim).

Por otro lado, se ha indicado (Sheffield *et al.*, 1993) que la técnica de SSCP es menos sensible para detectar variaciones de secuencia que se localicen en los extremos del fragmento analizado; sin embargo, nosotros hemos encontrado una mutación en la primera y en la tercera base siguientes al oligonucleótido, lo que podría indicar que con una distancia de unas, aproximadamente, 20 pb entre el extremo del fragmento y la mutación puede ser suficiente para la detección de la misma.

Otra limitación puede ser el desconocimiento de las secuencias intrónicas cercanas a un exón pues imposibilita el diseño de oligos que permitan la amplificación de las secuencias necesarias para el "splicing" donde, con cierta frecuencia, pueden encontrarse mutaciones que afecten la función del gen. Así ocurre en varios de los exones del gen RLDL que hemos analizado. Sin embargo, esta limitación es parcialmente subsanable ya que disponemos, ahora, de información más amplia sobre las secuencias intrónicas que bordean los exones mencionados.

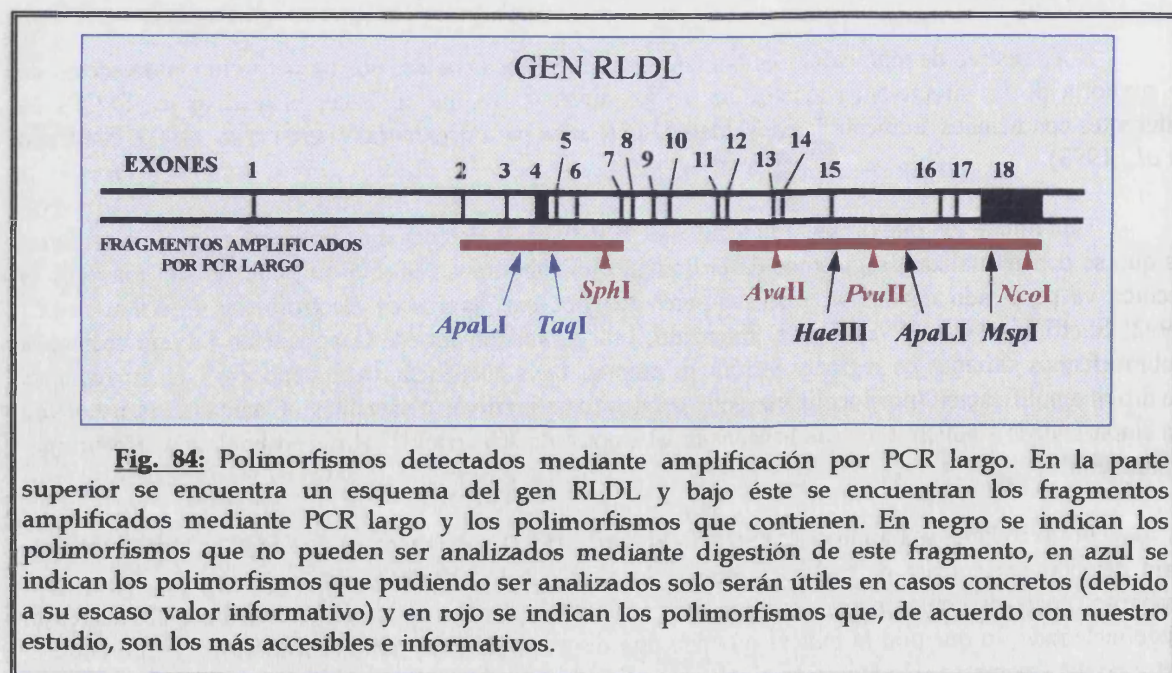
### V.1.2. Utilización de PCR Largo.

El PCR largo permite la amplificación de fragmentos de DNA genómico humano de hasta unas 20-25 Kb lo que facilita su estudio posterior con diferentes objetivos (Cheng *et al.*, 1994; Cohen, 1994). Nosotros hemos querido analizar la utilidad de esta técnica para el estudio de RFLPs del gen RLDL con la intención de sustituir a la técnica Southern y obtener resultados de forma más simple y rápida.

Para comprobar la utilidad del PCR largo en el diagnóstico genético indirecto de la HF, amplificamos la región del gen RLDL comprendida entre el exón 12 y el final del exón 18 (ver Fig. 84). Esta región tiene un tamaño aproximado de 17.5 Kb y contiene los polimorfismos *AvaII* (exón 13), *HaeIII* (exón 15), *PvuII* (intrón 15), *ApaLI* (intrón 15), *MspI* (exón 18) y *NcoI* (exón 18). La digestión del fragmento amplificado con las enzimas capaces de reconocer tales polimorfismos (Apartado IV.3.4 de Resultados, Pag. 59) nos permitió concluir:

1- Los polimorfismos *HaeIII* y *MspI* no pueden ser analizados mediante la amplificación realizada, debido al gran número de fragmentos de pequeño tamaño que originan las enzimas correspondientes y que dificultan su identificación.

2- Los polimorfismos *AvaII*, *PvuII* y *NcoI* pueden ser analizados mediante esta técnica, ya que se pueden identificar fácilmente los fragmentos originados por la presencia o ausencia del sitio polimórfico.



**Fig. 84:** Polimorfismos detectados mediante amplificación por PCR largo. En la parte superior se encuentra un esquema del gen RLDL y bajo éste se encuentran los fragmentos amplificados mediante PCR largo y los polimorfismos que contienen. En negro se indican los polimorfismos que no pueden ser analizados mediante digestión de este fragmento, en azul se indican los polimorfismos que pudiendo ser analizados solo serán útiles en casos concretos (debido a su escaso valor informativo) y en rojo se indican los polimorfismos que, de acuerdo con nuestro estudio, son los más accesibles e informativos.



3- El polimorfismo *Apa*LI de esta región no puede ser analizado mediante amplificación por PCR y digestión con la enzima, ya que todos los individuos aparecen como homocigotos para la presencia del sitio de corte; estos resultados no concuerdan con los obtenidos cuando se analiza el DNA genómico de los mismos individuos por transferencia Southern.

El análisis posterior del polimorfismo *Apa*LI situado en el intrón 6, mediante la amplificación de la región del gen comprendida entre los exones 2 y 7, mostró resultados similares a los obtenidos mediante transferencia Southern respecto al sitio polimórfico, pero puso de manifiesto la presencia de 2 nuevos sitios de corte para esta enzima no descritos previamente (ver Fig. 85).

Los nuevos sitios de restricción *Apa*LI detectados por restricción de producto de PCR no los hemos caracterizado a nivel de secuencia y no conocemos los mecanismos moleculares por los que estos sitios de reconocimiento de *Apa*LI están ocultos para la enzima en el DNA genómico. La hipótesis más sencilla consiste en proponer que son ocultos por una modificación postreplicativa de la secuencia *Apa*LI, posiblemente por metilación o acetilación, promovida por secuencias adyacentes o solapantes con el sitio *Apa*LI. Además, para explicar la situación encontrada en el sitio *Apa*LI del intrón 15 proponemos dos posibilidades:

**Hipótesis A:** Existe un sitio *Apa*LI constante, oculto en las transferencias Southern y muy próximo al sitio polimórfico (indicado como N? en la Fig. 85A). El corte que ocasiona en los productos amplificados por PCR impide la detección del sitio polimórfico (muy cercano o solapante) ya que la electroforesis que realizamos carece de la resolución necesaria. Dado que el sitio *Apa*LI constante no es reconocido en el DNA genómico, permanece sin ser cortado en las digestiones con *Apa*LI del mismo y, en consecuencia, no obstaculiza la detección del polimorfismo (Fig. 85B, I y II).

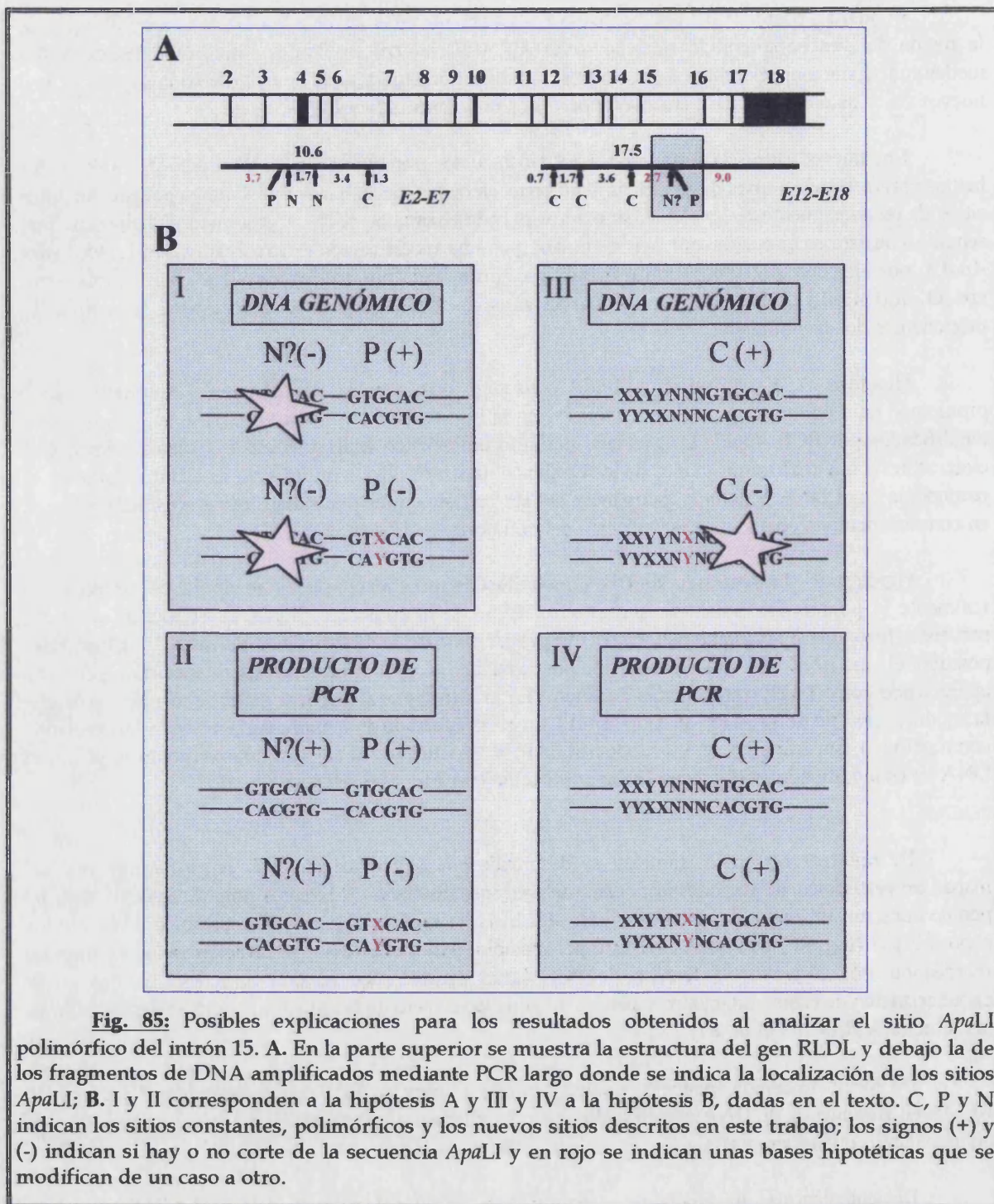
**Hipótesis B:** La secuencia de DNA que induce la modificación del sitio *Apa*LI del intrón 15 es realmente la polimórfica, mientras que el sitio *Apa*LI sería constante. Según la estructura de dicha secuencia (próxima o solapante con *Apa*LI) se produciría o no la modificación del sitio *Apa*LI; en caso positivo, el sitio *Apa*LI no sería reconocible por la enzima en DNA genómico (permaneciendo oculto) y apareciendo como (-) en transferencia Southern. En la estructura alternativa de tal secuencia, en la que la modificación no se produce, el sitio *Apa*LI no sería afectado y siempre sería cortado, apareciendo como sitio (+). Sin embargo, en los productos de PCR, el sitio *Apa*LI siempre aparece como +, ya que el DNA no es modificado en el proceso de amplificación (ver Fig. 85B, III y IV).

De nuestros resultados también se desprende que la técnica de PCR largo permite realizar mapas de restricción de regiones concretas del genoma diseñando diferentes amplificaciones. Así, he podido construir un mapa de restricción para *Apa*LI en la región del gen RLDL comprendida entre los exones 2 y 7 (Fig. 86) que podría ser útil, por ejemplo, para la detección y caracterización de grandes reordenamientos. Además, la técnica de PCR largo presenta, en general, grandes ventajas en la caracterización de estas mutaciones y para el diagnóstico directo de las mismas, como he demostrado en la mutación Valencia-4 (Fig. 87).

De forma resumida, podemos concluir que la técnica de PCR largo posibilita el análisis de RFLPs en fragmentos de DNA amplificados, pero es altamente recomendable un estudio previo de los polimorfismos que se van a usar.

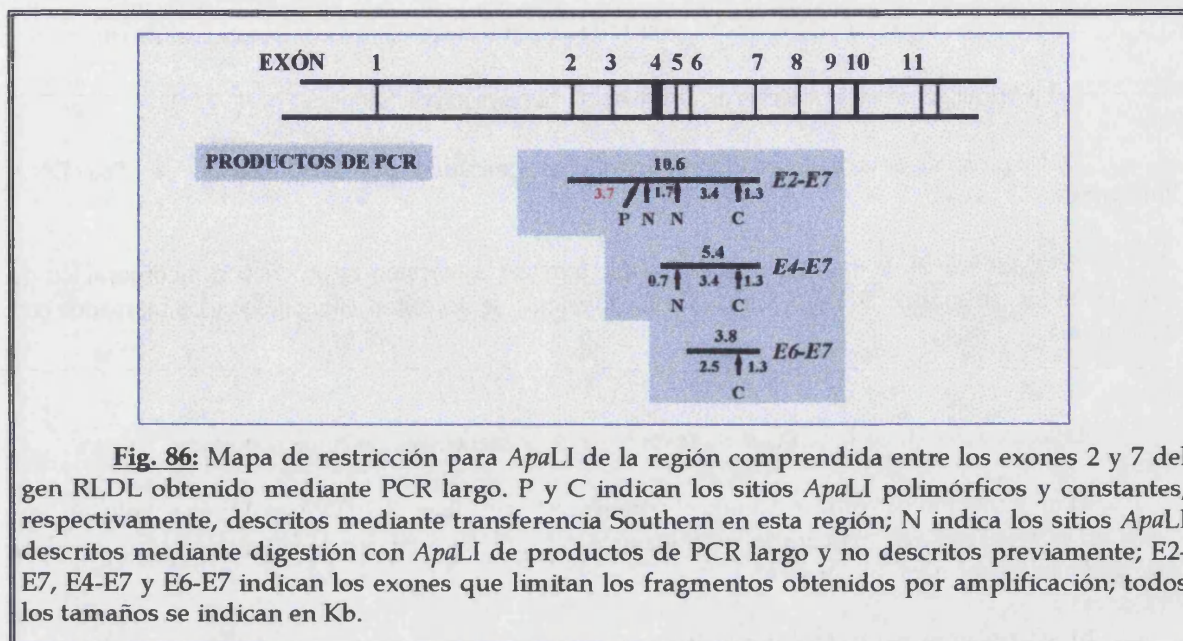
Recientemente se ha analizado el polimorfismo *Sph*I del intrón 6 del gen RLDL en nuestro laboratorio, por Amparo Baviera, y se ha encontrado que este polimorfismo presenta una frecuencia de 0.568 para el sitio +, un PIC individual de 0.369 y no se encuentra significativamente ligado a los otros polimorfismos presentes en la mitad 3' del gen RLDL estudiados mediante amplificación por PCR largo y digestión con *Ava*II, *Pvu*II y *Nco*I. Los cuatro polimorfismos conjuntamente presentan un PIC acumulativo de 0.838. Esto supone que mediante 2 amplificaciones por PCR y utilizando 4 polimorfismos se pueden diagnosticar teóricamente el 84% de la descendencia, obteniéndose el resultado

en 24 horas, mientras que si se utiliza la transferencia tipo Southern (necesaria hasta el momento para analizar *PvuII* y *SphI*) el tiempo requerido puede ser de 4 días, además de la mayor cantidad de trabajo y de reactivos que hay que utilizar y de los mayores costes que presenta el sistema en su conjunto.

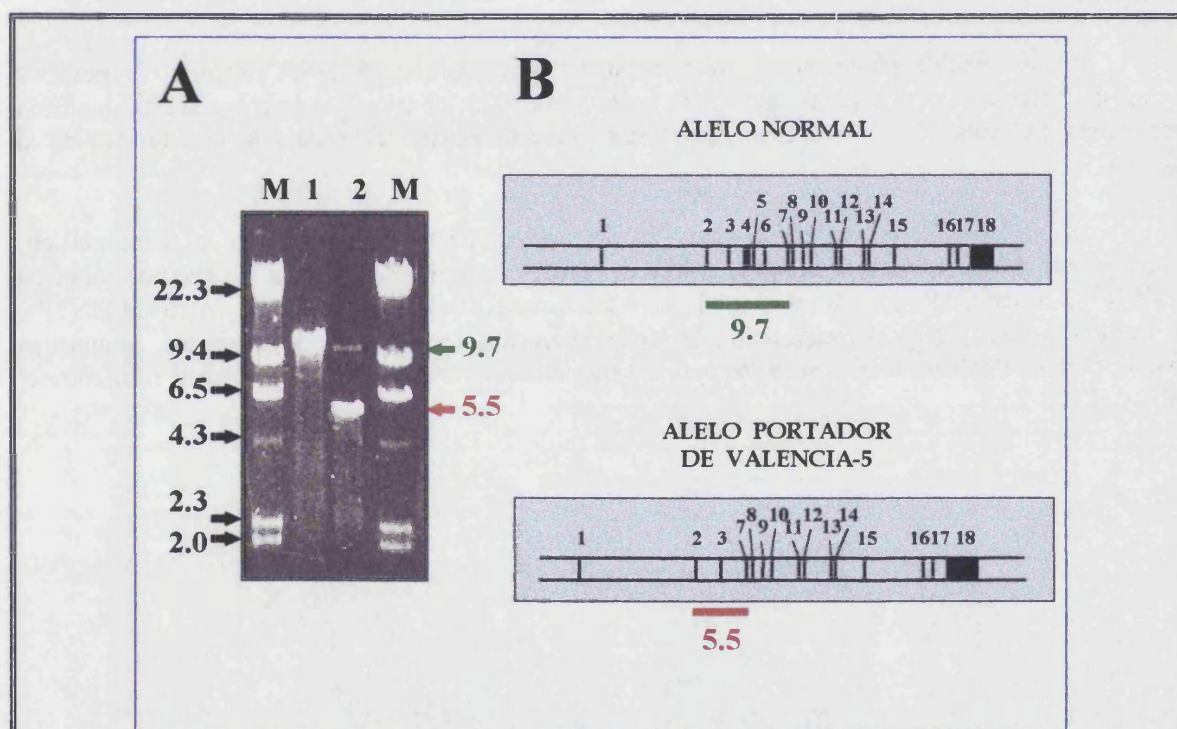


**Fig. 85:** Posibles explicaciones para los resultados obtenidos al analizar el sitio *ApaLI* polimórfico del intrón 15. **A.** En la parte superior se muestra la estructura del gen RLDL y debajo la de los fragmentos de DNA amplificados mediante PCR largo donde se indica la localización de los sitios *ApaLI*; **B.** I y II corresponden a la hipótesis A y III y IV a la hipótesis B, dadas en el texto. C, P y N indican los sitios constantes, polimórficos y los nuevos sitios descritos en este trabajo; los signos (+) y (-) indican si hay o no corte de la secuencia *ApaLI* y en rojo se indican unas bases hipotéticas que se modifican de un caso a otro.





**Fig. 86:** Mapa de restricción para *Apa*I de la región comprendida entre los exones 2 y 7 del gen RLDL obtenido mediante PCR largo. P y C indican los sitios *Apa*I polimórficos y constantes, respectivamente, descritos mediante transferencia Southern en esta región; N indica los sitios *Apa*I descritos mediante digestión con *Apa*I de productos de PCR largo y no descritos previamente; E2-E7, E4-E7 y E6-E7 indican los exones que limitan los fragmentos obtenidos por amplificación; todos los tamaños se indican en Kb.



**Fig. 87:** Detección de la mutación Valencia-4 por PCR largo. Se amplifica el DNA genómico comprendido entre los exones 2 y 7. A. Gel donde se pueden observar los fragmentos amplificados: el normal de 9.7 Kb (carrera 1) y el anómalo de 5.5 Kb del probando FH30 (carrera 2), M indica el marcador de tamaño molecular II de Boehringer Mannheim; B. En la parte superior se encuentra la estructura de un alelo normal donde se indica la región amplificada y en la parte inferior se encuentra la estructura del alelo portador de Valencia-4, donde se indica la región amplificada. Todos los tamaños se indican en Kb.

### V.1.3. Secuenciación Automática Directa de Productos de PCR.

En mi proyecto de investigación he desarrollado una técnica de secuenciación basada en:

- 1) La terminación de la síntesis de DNA según la reacción de Sanger *et al.* (1977),
- 2) Una reacción cíclica, característica que es permitida por la utilización de Taq DNA Polimerasa,
- 3) Una reacción de marcaje interno, ya que durante la reacción se produce la incorporación de F-dUTP en las cadenas de DNA sintetizadas, por lo que no se necesitan oligonucleótidos marcados con fluoresceína,

Estas características hacen que el procedimiento de secuenciación empleado sea:

a) muy sencillo de realizar, ya que el sistema de purificación del DNA molde es simple, no hay que realizar pasos extra de marcaje de los oligonucleótidos ni del producto de la reacción y se visualiza mediante un secuenciador automático.

b) repetitivo, el resultado depende principalmente de la concentración y calidad del DNA molde; los reactivos y disoluciones son de fácil preparación y los ciclos de la reacción se realizan en un termociclador.

c) muy sensible, pudiéndose utilizar cantidades muy pequeñas de DNA molde (son necesarios menos de 50 femtomoles) ya que la reacción se repite hasta 30 ciclos y cada cadena puede estar marcada por varias moléculas de fluoresceína, por lo que aumenta considerablemente la sensibilidad de la técnica.

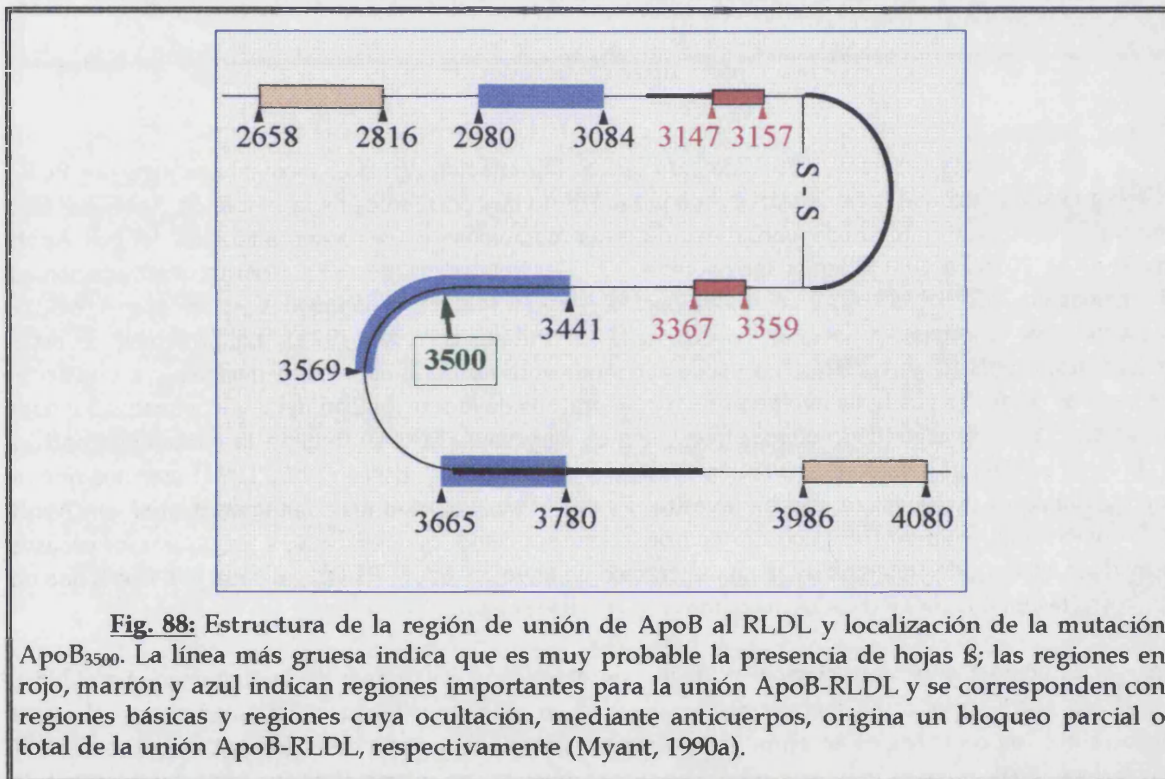
d) muy resolutivo, ya que la aparición de indeterminaciones, paradas en la secuenciación, compresiones de la secuencia se evitan al utilizarse altas temperaturas de reacción, un alto porcentaje de DMSO y 7-deaza-GTP; además, las cantidades y las características de los distintos reactivos (dNTPs, la Taq Polimerasa, etc.) y la composición del tampón han sido seleccionados de forma que, en nuestras manos, permiten obtener unos resultados óptimos (llegándose a una fiabilidad que podría estar entre el 99.5 y el 100 %).



## V.2. PREVALENCIA DE LA MUTACIÓN ApoB<sub>3500</sub> EN PACIENTES ESPAÑOLES DIAGNOSTICADOS CLÍNICAMENTE COMO HF.

El defecto familiar de ApoB-100 o DFB es una enfermedad dislipémica causada por la mutación ApoB<sub>3500</sub> (R3500E) en el gen que codifica la ApoB-100 (Soria *et al.*, 1989) y que se sitúa en la región de unión de ApoB con el receptor de LDL, codificada por parte del exón 26 (Ver Fig. 88). La frecuencia de esta mutación es elevada en gran número de poblaciones caucásicas, como la suiza (1/200, según Miserez *et al.*, 1994b), la americana (1/500, según Innerarity *et al.*, 1990), la inglesa (1/700, según Tybjaerg-Hansen *et al.*, 1990) y la alemana (1/700 según Schuster *et al.*, 1990) aunque también existen poblaciones, como la Finesa o la Franco-Canadiense, donde no se ha encontrado esta mutación (Tikkanen & Helio, 1992; Minnich *et al.*, 1995).

La DFB presenta síntomas clínico-bioquímicos similares a la HF, por lo que la discriminación entre HF y DFB es difícil (Schuster *et al.*, 1990; Myant *et al.*, 1991), tanto es así que en varias poblaciones estudiadas se ha encontrado que, aproximadamente, un 5% de los pacientes diagnosticados como HF son realmente portadores de la mutación ApoB<sub>3500</sub> (Schuster *et al.*, 1990; Tybjaerg-Hansen *et al.*, 1990; Myant, 1993, Defesche *et al.*, 1993).

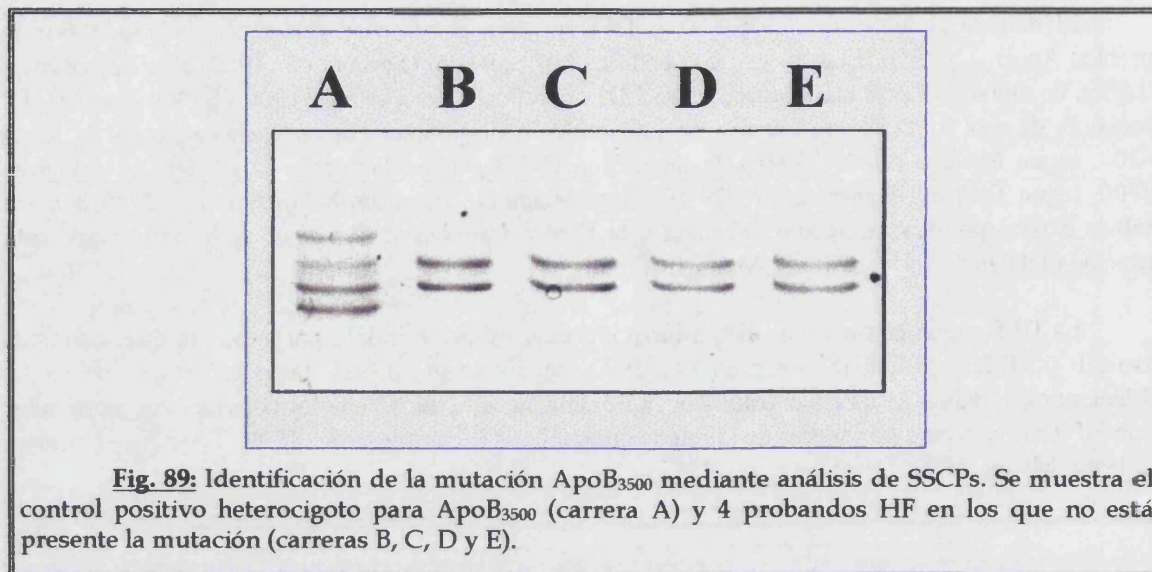


**Fig. 88:** Estructura de la región de unión de ApoB al RLDL y localización de la mutación ApoB<sub>3500</sub>. La línea más gruesa indica que es muy probable la presencia de hojas  $\beta$ ; las regiones en rojo, marrón y azul indican regiones importantes para la unión ApoB-RLDL y se corresponden con regiones básicas y regiones cuya ocultación, mediante anticuerpos, origina un bloqueo parcial o total de la unión ApoB-RLDL, respectivamente (Myant, 1990a).

Para conocer la presencia o no de esta mutación en nuestra muestra HF se realizó una búsqueda de la misma mediante la amplificación por PCR de la región apropiada del exón 26 (Shuster *et al.*, 1992) y análisis de SSCPs, utilizando como control positivo el DNA de un individuo heterocigoto para ApoB<sub>3500</sub> (Ver Fig. 89).

En nuestra muestra HF, constituida por 58 probandos, no hemos encontrado portadores de la mutación ApoB<sub>3500</sub>; sabiendo que un 5% de los pacientes diagnosticados como HF podrían ser realmente portadores de la mutación ApoB<sub>3500</sub> (Tybjaerg-Hansen *et al.*, 1990) y, suponiendo que esta frecuencia es la que se da en los pacientes diagnosticados como HF en España, deberíamos haber encontrado 2 ó 3 portadores de ApoB<sub>3500</sub> en la muestra analizada. El hecho de no haberlos encontrado sugiere que la frecuencia de esta mutación en población española es inferior a la de otras poblaciones de nuestro

entorno, mencionadas anteriormente. Sin embargo, esta sugerencia debe tomarse con precaución dado el tamaño de la muestra analizada en nuestro estudio, requiriendo su comprobación una ampliación de la misma.



**Fig. 89:** Identificación de la mutación ApoB<sub>3500</sub> mediante análisis de SSCPs. Se muestra el control positivo heterocigoto para ApoB<sub>3500</sub> (carrera A) y 4 probandos HF en los que no está presente la mutación (carreras B, C, D y E).

La estrategia que hemos diseñado para buscar la mutación ApoB<sub>3500</sub> mediante análisis por PCR-SSCP no sólo indica que entre nuestros probandos HF no hay portadores de la mutación ApoB<sub>3500</sub>, sino que también sugiere que no hay portadores de otras mutaciones en la región analizada del gen ApoB (nucleótidos 10569 a 10866, aminoácidos 3454 a 3552). Recientemente se ha descrito una mutación en el aminoácido 3531 (R3531C) y en el aminoácido 3480 (R3480P), denominadas ApoB<sub>3531</sub> y ApoB<sub>3480</sub>, que producen síntomas similares a los de ApoB<sub>3500</sub> (Pullinger *et al.*, 1995). La presencia de estas mutaciones, ApoB<sub>3531</sub> y ApoB<sub>3480</sub>, no puede ser totalmente excluida de nuestra muestra, ya que no se disponía de controles positivos que permitiera cerciorarnos de la sensibilidad del análisis realizado para detectarlas. Sin embargo, dado que su frecuencia es muy baja (1/3000) frente a la mutación ApoB<sub>3500</sub> (1/114) en población hipercolesterolémica (Pullinger *et al.*, 1995; Nissen *et al.*, 1995) creemos que es poco probable su presencia en nuestra muestra. Es posible que existan más mutaciones en el gen ApoB que ocasionen un fenotipo IIA, pero su frecuencia debe ser menor que ApoB<sub>3500</sub>, a juzgar por los escasos individuos encontrados que presenten una alteración en la unión ApoB-RLDL causada por ApoB que no presenten las mutaciones indicadas anteriormente (Pullinger *et al.*, 1995).

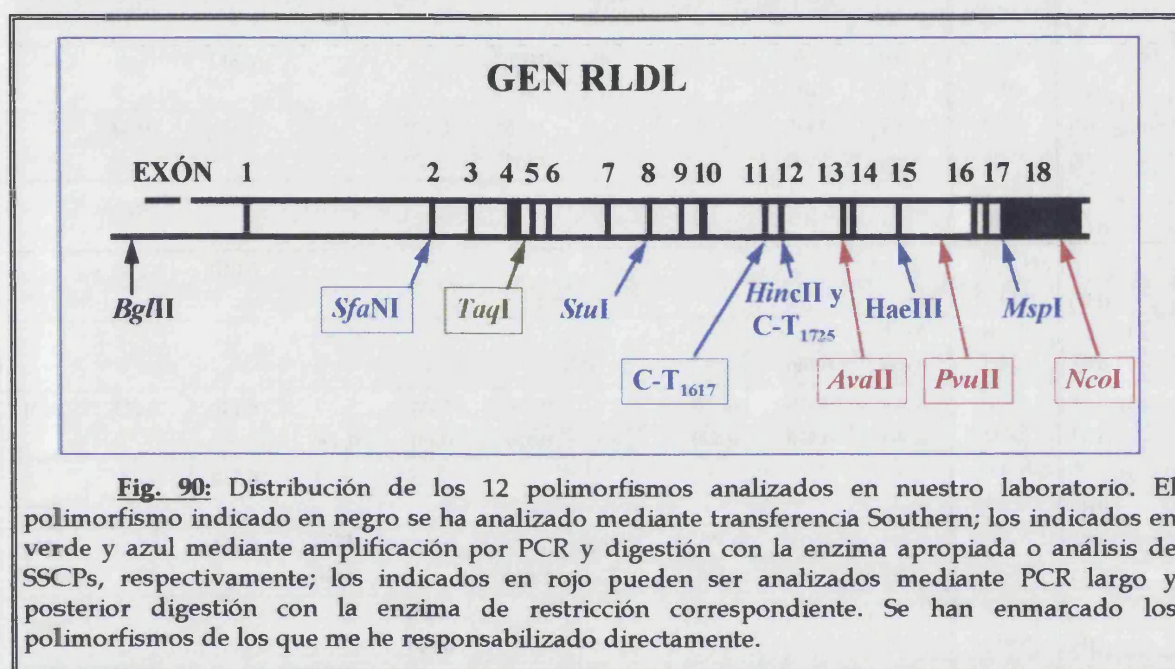
Es posible que en población española los individuos portadores de la mutación ApoB<sub>3480</sub>, ApoB<sub>3500</sub>, ApoB<sub>3531</sub> y otras mutaciones localizadas en esta región, presenten niveles de colesterol menores que los encontrados en otras poblaciones; esta situación se ha descrito para los pacientes HF heterocigotos de nuestra muestra, que presentan niveles de colesterol inferiores a los de otras poblaciones (Tesis Doctoral de J. Real); por lo tanto, es probable que los portadores de estas mutaciones no se hayan clasificado como pacientes HF ya que, en general, los síntomas bioquímicos de la DFB (niveles de colesterol) son menos acusados que los de la HF; esta hipótesis refuerza la necesidad de realizar un estudio más amplio sobre la frecuencia de ApoB<sub>3480</sub>, ApoB<sub>3500</sub> y ApoB<sub>3531</sub> en nuestra población.



### V.3. DIGANÓSTICO INDIRECTO DE HF.

#### V.3.1. Estudio de Polimorfismos del Locus RLDL.

En nuestro laboratorio se han estudiado, hasta el momento de redactar esta memoria, 12 polimorfismos distribuidos a lo largo de todo el gen RLDL (ver Fig. 90), seis de los cuales han sido analizados por mí (incluyendo el polimorfismo C→T<sub>1619</sub> localizado en el exón 11, que solamente ha sido analizado a nivel de frecuencia), y presentados independientemente en esta Tesis. Recordemos que la utilización de polimorfismos distribuidos a lo largo de todo el gen es importante para poder detectar los posibles casos de recombinación intragénica en el análisis de segregación.



**Fig. 90:** Distribución de los 12 polimorfismos analizados en nuestro laboratorio. El polimorfismo indicado en negro se ha analizado mediante transferencia Southern; los indicados en verde y azul mediante amplificación por PCR y digestión con la enzima apropiada o análisis de SSCPs, respectivamente; los indicados en rojo pueden ser analizados mediante PCR largo y posterior digestión con la enzima de restricción correspondiente. Se han enmarcado los polimorfismos de los que me he responsabilizado directamente.

El análisis de los polimorfismos se realizó en 41 individuos HF (una vez excluidos los portadores de grandes alteraciones) y en 56 controles normolipidémicos. Los resultados obtenidos que se presentaron en la Tablas 8 y 9 (Pags. 65 y 66) indican que:

1- Todos los polimorfismos se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg.

2- No existen diferencias significativas entre las frecuencias de los polimorfismos obtenidas en los probandos HF y en los Controles. Éste hecho es similar al encontrado en poblaciones abiertas (revisado por Miserez *et al.*, 1993 y 1994), mientras que en poblaciones donde se ha producido un efecto fundador o han permanecido aisladas se encuentran diferencias entre los dos grupos de población, como ocurre en la población "Africaner" (Kotze *et al.*, 1989 y 1991).

3- Existen diferencias significativas en las frecuencias de algunos polimorfismos entre nuestra población y otras poblaciones estudiadas. Las frecuencias obtenidas para cada polimorfismo en la población española se compararon mediante un test  $\chi^2$  (para un grado de libertad y  $P < 0.05$ ) y los resultados obtenidos (ver Tabla 40) indican que:

- Existen diferencias significativas entre la población HF española y la población HF sudafricana, ya que se han encontrado diferencias en todos los polimorfismos estudiados. Posiblemente, esto es debido al efecto fundador que se ha producido en la población HF sudafricana (Kotze, 1989,

1991), que origina diferencias entre la población HF y Control del mismo país y con otras poblaciones estudiadas (Miserez *et al.*, 1993, 1994).

**Tabla 40:** Comparación de las frecuencias de RFLPs del gen RLDL en población española y otras poblaciones. El fondo rojo indica la presencia de diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), el fondo azul indica la presencia de diferencias ligeramente significativas ( $P < 0.10$ ) y el fondo blanco indica que no las hay.

POBLAC.	Española	Suiza <sup>a</sup>	Alemana <sup>b</sup>	Italia <sup>c</sup>	Islandesa <sup>d</sup>	Sudafricana <sup>e</sup>	Noruega <sup>f</sup>	Inglesa <sup>g</sup>	Japonesa <sup>h</sup>	Israelí <sup>i</sup>	Norteamericana <sup>j</sup>
POLIM.											
BglIII (C)	0.893										
(HF)	0.841							0.920			
SfaNI (C)	0.848							0.835			
(HF)	0.866							0.860			
TaqI (C)	0.098	0.108	0.067			0.036*			0.512		
(HF)	0.073	0.173	0.040			0.0*					
StuI (C)	0.955	0.961	0.899			0.946*	0.980	0.940		0.964	
(HF)	0.976	0.942	1.000			0.899*	0.927	0.960			
C→T <sub>1617</sub> (C)	0.078 <sup>^</sup>								0.28		
(HF)	0.044 <sup>^</sup>										
C→T <sub>1725</sub> (C)	0.170 <sup>^</sup>								0.010		
(HF)	0.146 <sup>^</sup>										
HincII (C)	0.616	0.569	0.618								
(HF)	0.537	0.629	0.600								
AvaII (C)	0.375	0.426	0.360	0.387		0.378*	0.496		0.149	0.473	0.431
(HF)	0.402	0.308	0.440	0.439		0.020*	0.451	0.490			
HaeIII (C)	0.795								0.940		
(HF)	0.793										
PvuII (C)	0.223	0.299	0.315	0.371*	0.229	0.297*		0.250	0.074	0.243	0.244
(HF)	0.244	0.250	0.240	0.190*	0.077	0.121*		0.240			
MspI (C)	0.661						0.680				
(HF)	0.683						0.740				
NcoI (C)	0.589	0.725	0.596		0.688	0.667*	0.682	0.740	0.545	0.721	0.724
(HF)	0.549	0.750	0.760		0.769	0.131*	0.569	0.740			

<sup>^</sup> indica la frecuencia de la presencia del nucleótido T en la posición indicada y \* indica que existen diferencias entre la población HF y Control.

a: Miserez *et al.* (1993, 1994): 52 haplotipos HF y 204 haplotipos control.

b: Miserez *et al.* (1993,1994): 25 haplotipos HF y 89 haplotipos control.

c: Daga *et al.* (1990): 57 haplotipos HF y 256 haplotipos control.

d: Taylor *et al.* (1989): 13 haplotipos HF y 48 haplotipos control.

e: Kotze *et al.* (1989): 99 haplotipos HF y 111 haplotipos control.

f: Rodninger *et al.* (1993): 51 haplotipos HF y 139 haplotipos control.

g: Taylor *et al.* (1988): 59, 61 y 126 haplotipos HF, 147, 154 y 117 haplotipos control para PvuII, StuI y NcoI, respectivamente. Humphries (1993): 120 haplotipos HF en SfaNI y AvaII.

h: Yamakawa *et al.* (1991): 121 haplotipos control, en TaqI, AvaII, PvuII y NcoI; Yamakawa (1993): 67, 93 y 74 haplotipos controles para 1725, HaeIII y MspI.

i: Berkman (1992): 112 cromosomas control.

j: Leitersdorf (1989): 123 haplotipos control.

- Existen diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) con la población control japonesa en 6 de los 7 polimorfismos en los que se ha podido realizar la comparación de las frecuencias. Estas diferencias se pueden explicar por la distancia genética existente entre ambas poblaciones, ya que, suponiendo que el origen de los polimorfismos no es independiente en cada población, estos debieron originarse antes de la divergencia entre las razas caucásica y mongoloide (hace unos 40.000 años; Nei & Roychoudhury, 1982) y, posteriormente, se ha ido produciendo la variación entre las frecuencias de los diferentes polimorfismos.



- El polimorfismo *NcoI* presenta diferencias significativas entre el grupo control de la población española y 5 (Suiza, Italiana, Inglesa, Israelí y Norteamericana) de las 8 poblaciones estudiadas. Curiosamente, las diferencias se han encontrado con poblaciones de origen caucásico. Esto podría deberse a que *NcoI* ha evolucionado de forma ligeramente divergente en la población española, respecto a otras poblaciones caucásicas (mediante deriva génica, fenómenos de migración, etc.).

En cualquier caso, aunque existen diferencias en las frecuencias de varios polimorfismos entre poblaciones caucásicas (Miserez, 1993; Chaves, 1996, esta Tesis), éstas no son lo suficientemente importantes como para alterar en gran medida la informatividad de los polimorfismos. Así, en poblaciones caucásicas (Italiana, Inglesa, Norteamericana, Noruega, Española) los polimorfismos más interesantes para realizar diagnóstico genético indirecto no varían mucho de unas a otras (Daga *et al.*, 1990; Taylor *et al.*, 1988; Leitersdorf *et al.*, 1989; Rodninger *et al.*, 1993; Miserez *et al.*, 1993, 1994, Chaves *et al.*, 1996 y esta Tesis).

En cambio, las diferencias encontradas con la población japonesa (de raza mongoloide) si que suponen diferencias importantes en la frecuencia e informatividad de los polimorfismos. Estas diferencias en la informatividad son importantes en todos los polimorfismos que se han podido comparar (exceptuando *NcoI*), como indica la Tabla 40.

Una vez calculada la frecuencia de cada polimorfismo se calculó el valor PIC (Botstein *et al.*, 1980) y el desequilibrio de ligamiento, mediante el valor  $\Delta$  (Chakravarti *et al.*, 1984 y 1985) de los once polimorfismos estudiados inicialmente (*BglIII*, *SfaNI*, *TaqI*, *StuI*,  $C \rightarrow T_{1725}$ , *HincII*, *AvaII*, *HaeIII*, *PvuII*, *MspI* y *NcoI*); los resultados obtenidos indican que:

- Los polimorfismos *HincII*, *AvaII*, *MspI* y *NcoI* (localizados en la región 3' del gen), presentan el mayor contenido informativo, por lo que, junto con los polimorfismos *BglIII* y *SfaNI* (los más informativos localizados en la región 5'), podrían ser los más apropiados para iniciar el diagnóstico genético indirecto.

- Existen varios polimorfismos en desequilibrio de ligamiento, lo que supone que los alelos de estos polimorfismos presentan una asociación entre si mayor que la debida al azar; el máximo valor del desequilibrio de ligamiento debido al azar (calculado en nuestro caso como  $\Delta_{\text{límite}}$ ) es de 0.23, para una  $P=0.05$  y 55 comparaciones. El valor de  $\Delta$  es especialmente elevado en las parejas *HincII-AvaII* (0.83) y *PvuII-HaeIII* (0.62) por lo que la utilización de los dos polimorfismos de cada pareja supone un aumento relativamente bajo del valor informativo obtenido con el más informativo de cada una.

Los valores PIC y  $\Delta$  de los polimorfismos, tomados de dos en dos, tienen solo un valor orientativo, aunque interesante, ya que los cálculos realizados introducen cierto error que puede aumentar o disminuir el valor de ambos parámetros. El valor  $\Delta$  puede verse alterado cuando se utilizan polimorfismos de frecuencia baja (Leitersdorf *et al.*, 1989), mientras que en el cálculo del valor PIC acumulado solamente son útiles aquellos individuos que son homocigotos para uno de los dos marcadores analizados, por lo que se puede perder parte de la información obtenida en el análisis de los individuos, principalmente si la muestra analizada no es lo suficientemente grande (Botstein *et al.*, 1980).

Hay que tener en cuenta que la información aportada por el análisis de los polimorfismos individualmente o de dos en dos presenta varias ventajas frente al estudio de haplotipos (que veremos más adelante), ya que nos indica el grado de informatividad de los diferentes polimorfismos y nos permite comparar las frecuencias obtenidas en población Control y HF. Evidentemente, tales frecuencias podíamos deducirlas del estudio de haplotipos pero si la muestra es pequeña (como ocurre en nuestro caso, donde solo obtendríamos 15 haplotipos HF) los resultados obtenidos podrían ser poco representativos. Sin embargo, el estudio individual o por parejas de los polimorfismos no nos permite

---

deducir el orden de máxima informatividad de todos los polimorfismos, ni su valor PIC acumulado. Para ello, como discutiré más adelante, podemos contar con los 75 haplotipos sanos, deducidos a partir del estudio familiar.

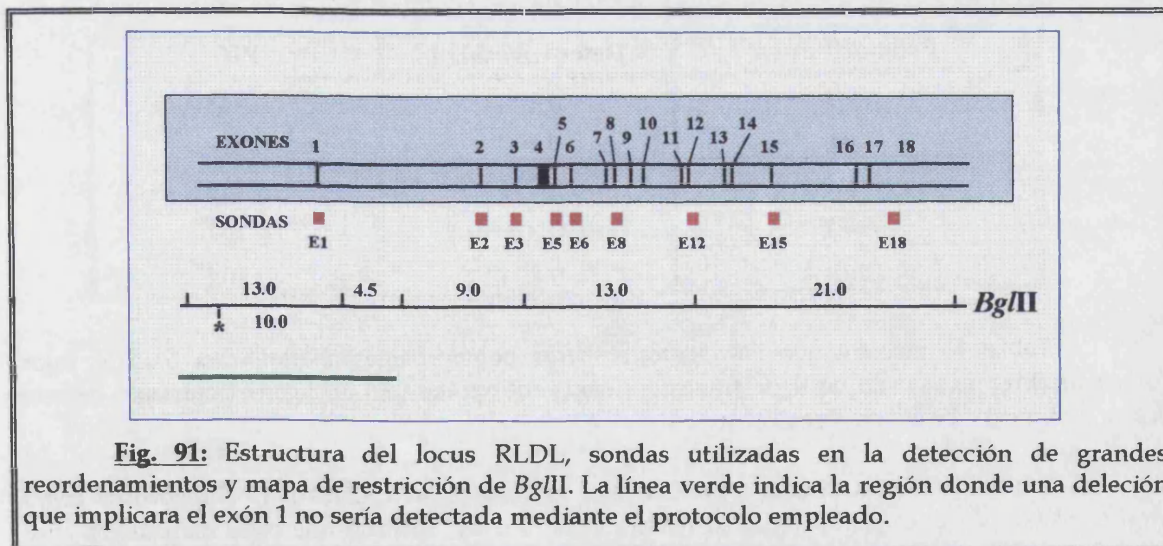
Por otro lado, desde 1995 se han hecho accesibles, en las distintas bases de datos, diferentes polimorfismos de tipo minisatélite y microsatélite cartografiados en la región del gen RLDL, como es el caso de los polimorfismos D19S394, D19S535 y D19S221 que presentan una heterozigosidad del 0.90, 0.85 y 0.87, pero que se sitúan a unas 50 Kb en dirección p13.3, 500 Kb en dirección p13.3 y 1500 Kb en dirección p13.1 (GDB Probe Detail, cromosoma 19 accesible por Internet, y Ashworth, 1995), respectivamente. El empleo de estos polimorfismos facilitará el diagnóstico genético indirecto aunque para utilizarlos será conveniente realizar un estudio poblacional previo, similar al ya hecho con los diferentes RFLPs, localizarlos precisamente y comprobar que la tasa de mutación es lo suficientemente baja como para permitir su utilización con los fines mencionados.

### V.3.2. Análisis de Segregación del Gen RLDL: Construcción de Haplotipos.

En poblaciones no endogámicas, como la española, recurrir al diagnóstico indirecto, si se cuenta con los familiares del paciente, permite de forma rápida detectar el alelo patológico y clasificar adecuadamente a los miembros de la familia, siendo el único abordaje genético posible mientras no se haya identificado la mutación responsable de la enfermedad en la misma. Para el trabajo presentado en esta Tesis pudimos reclutar familiares de 22 de los probandos de nuestra muestra HF, tres de los cuales eran portadores de grandes reordenamientos (FH16, FH26 y FH29) y uno que presentaba la mutación W-18X (FH46) y en sus familiares pudo, por tanto, hacerse un diagnóstico directo. El análisis de segregación en las 18 familias restantes indicó que:

1- La familia FH13 es portadora de una gran alteración (Valencia-5) no detectada previamente mediante la búsqueda realizada con *Bgl*III. La alteración pudo ser detectada por la segregación aparentemente anómala del polimorfismo *Bgl*III situado en la región 5' del locus RLDL. Esta mutación supone la deleción de la región 5' del gen hasta el intrón 1 y está siendo caracterizada más detalladamente en la actualidad.

Este hecho muestra que la detección de grandes alteraciones en el locus RLDL mediante la digestión con *Bgl*III del DNA genómico es limitada, principalmente en la región 5' del gen (Fig. 91). En esta región existe una gran separación entre los exones 1 y 2 (unas 10 Kb) que incluye un fragmento de 4.5 Kb cuando se digiere con *Bgl*III, indetectable mediante las sondas utilizadas; estas circunstancias hacen que las mutaciones que afecten al exón 1 y no sobrepasen el fragmento mencionado no se puedan detectar mediante el protocolo utilizado (como ha sucedido con la mutación Valencia-5); esto significa que otros probandos en los que no hemos podido estudiar la segregación del polimorfismo *Bgl*III, puedan ser portadores de la mutación Valencia-5 u otras similares que han escapado al rastreo mediante transferencia Southern del DNA genómico digerido con *Bgl*III o *Apa*LI. Además, no se puede descartar que probandos portadores de grandes alteraciones puedan escapar a este tipo de rastreo por otros motivos como son la coincidencia en el tamaño entre una banda normal y una alterada la generación de fragmentos demasiado pequeños, etc.



**Fig. 91:** Estructura del locus RLDL, sondas utilizadas en la detección de grandes reordenamientos y mapa de restricción de *Bgl*III. La línea verde indica la región donde una deleción que implicara el exón 1 no sería detectada mediante el protocolo empleado.

Debido a la posibilidad de no detectar algunas de las grandes alteraciones, estamos diseñando, en la actualidad, estrategias que permitan soslayar algunas de las limitaciones mencionadas. Estas estrategias implican:

- Búsqueda de sondas situadas en la región 5' del locus RLDL que permitan analizar los fragmentos de restricción originados en esta región, lo que requiere dilucidar la secuencia nucleotídica de la misma.

- Experimentos semicuantitativos que permitan detectar la disminución de la intensidad de banda originada por la ausencia de un alelo.

- Búsqueda de grandes alteraciones mediante PCR largo, amplificando regiones extensas y solapantes del locus RLDL (Puig, Tesis Doctoral); incluso se podría tratar de hacerlo de forma semicuantitativa para detectar la ausencia de amplificación de un alelo.

2- En dos familias (FH27 y FH60) no hemos podido confirmar el diagnóstico clínico de HF pues, aparentemente, no hay cosegregación del fenotipo HF y el gen RLDL; además, no hemos encontrado, por el momento, una mutación en el gen RLDL en alguno de los afectados que pudiera ser responsable de la enfermedad en los mismos.

3- Se puede realizar el diagnóstico genético indirecto en 13 de las 15 familias restantes, lo que supone un 86.6%. En las dos familias restantes se ha podido identificar el haplotipo patológico pero no se puede seguir su herencia ya que los progenitores enfermos son homocigotos para todos los polimorfismos.

4- Los haplotipos obtenidos en el estudio familiar nos permiten deducir cuál es el orden en el que se deben escoger los polimorfismos para obtener el mayor grado de información utilizando el menor número posible de ellos. Este orden de informatividad se basa en la frecuencia de cada uno de los haplotipos y se calculó mediante el algoritmo de Chakravarti & Buetow (1985). La aplicación de este algoritmo a nuestros resultados se puede ver en la Tabla 41 y 42, donde se muestra el orden obtenido para los 5 polimorfismos presentados en esta Tesis y para los 11 polimorfismos estudiados en el laboratorio, respectivamente.

**Tabla 41:** Orden de máxima información para los 5 polimorfismos presentados en esta Tesis.

Polimorfismo	Heterocigosidad	PIC
<i>AvaII</i>	0.480	0.365
<i>NcoI</i>	0.697	0.632
<i>PvuII</i>	0.791	0.759
<i>SfaNI</i>	0.820	0.797
<i>TaqI</i>	0.824	0.802

La Tabla 41 muestra que los cuatro primeros polimorfismos aportan casi todo el valor informativo (PIC acumulado de 0.797) mientras que *TaqI* aporta solo un ligero incremento de este valor, si bien puede ser útil en casos concretos.

La Tabla 42 muestra la gran informatividad de algunos marcadores muy polimórficos como *HincII-C→T<sub>1725</sub>* y *NcoI*, que aparecen en los primeros lugares, mientras que otros marcadores muy polimórficos son relegados a las últimas posiciones (*AvaII* y *MspI*) ya que, al estar en desequilibrio de ligamiento con otros, aportan menos información que RFLPs menos polimórficos como *TaqI* y *StuI*. Además, se puede observar que prácticamente toda la informatividad de los polimorfismos procede de los que aparecen en los 6 primeros lugares (PIC=0.862), el resto de polimorfismos aportará información en casos muy concretos donde los otros no sean útiles.



**Tabla 42:** Valores de heterocigosidad y PIC acumulados de los 11 polimorfismos estudiados en el laboratorio. Los polimorfismos *HincII* y  $C \rightarrow T_{1725}$  se utilizan conjuntamente, ya que el resultado se obtiene en un solo experimento.

Polimorfismo	Heterocigosidad	PIC
<i>HincII-1725</i>	0.621	0.541
<i>NcoI</i>	0.778	0.743
<i>PvuII</i>	0.828	0.806
<i>BglII</i>	0.855	0.839
<i>TaqI</i>	0.865	0.852
<i>HaeIII</i>	0.873	0.862
<i>StuI</i>	0.876	0.865
<i>SfaNI</i> o <i>MspI</i>	0.877	0.866
<i>MspI</i> o <i>SfaNI</i>	0.878	0.867
<i>AvaII</i>	0.878	0.867

Para realizar el diagnóstico genético indirecto podemos, a la hora de seleccionar los RFLPs, seguir diferentes criterios:

1) Si queremos obtener el máximo valor informativo con el mínimo número de polimorfismos, emplearemos los polimorfismos según el orden de la Tabla 42, empezando por el primero e incorporando sucesivamente los polimorfismos siguientes hasta construir un haplotipo que nos permita hacer el diagnóstico. Este criterio ha sido aplicado tradicionalmente mientras las técnicas de DNA sólo han permitido el análisis individualizado de cada polimorfismo.

2) El desarrollo de nuevas técnicas, como el PCR largo utilizado en este trabajo, permite aplicar un criterio basado en la simplicidad, rapidez y eficacia del proceso de obtención de datos. La posibilidad de analizar de forma prácticamente simultánea tres polimorfismos (*AvaII*, *NcoI* y *PvuII*) que constituyen una combinación altamente informativa (valor PIC acumulado de 0.759, ver Tabla 43) nos permite colocarlos en primera posición a la hora de escoger los polimorfismos para un estudio familiar. Siguiendo este criterio, de contenido metodológico, podemos analizar a continuación, también por PCR largo, el polimorfismo *SphI*, lográndose entre los cuatro un PIC acumulado de 0.844 (Tabla 43), y después, el sistema trialélico constituido por los polimorfismos *HincII* y  $C \rightarrow T_{1725}$  que, al poder ser analizados conjuntamente por la técnica de SSCPs, incrementan significativamente la capacidad informativa (PIC acumulado de 0.868, ver Tabla 43). Finalmente, aplicando ya un criterio basado estrictamente en la información proporcionada, podemos ir añadiendo, secuencialmente, el resto de los polimorfismos que se indican en la Tabla 43. Sin embargo, ya que es aconsejable hacer, en primer lugar, el rastreo de grandes alteraciones por digestión del DNA genómico con *BglII* es posible, rehibridando la misma membrana con la sonda correspondiente al exón 1, obtener rápidamente información sobre el polimorfismo *BglII* situado en la región 5' del locus RLDL. Por ello, es razonable proponer la combinación constituida por *AvaII*, *NcoI*, *PvuII*, *SphI* y *BglII*, con un PIC acumulado de 0.848, como la más conveniente para obtener la máxima información con un mínimo esfuerzo (2 amplificaciones por PCR largo y 1 transferencia Southern inexcusable).

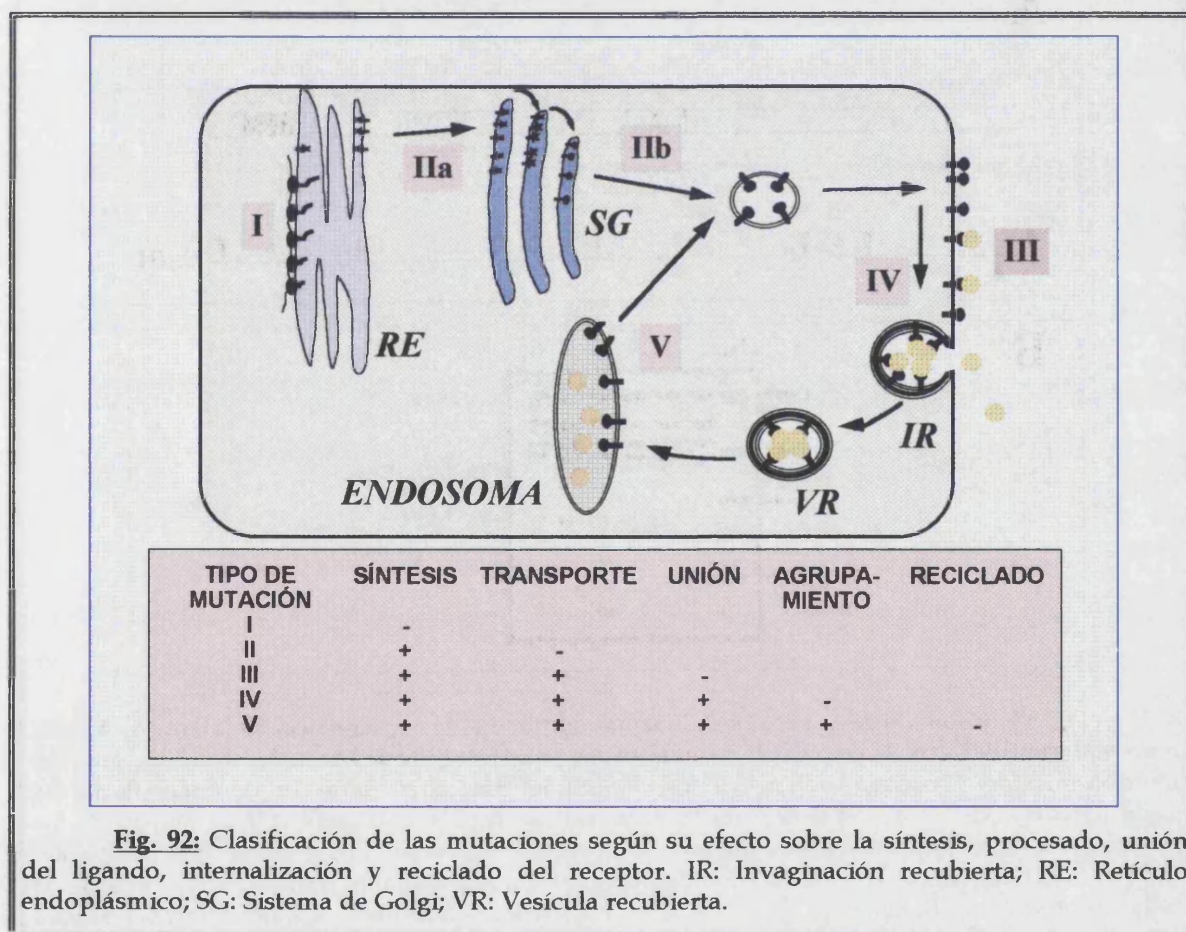
**Tabla 43:** Valor PIC acumulado de los 11 polimorfismos seleccionados según un criterio metodológico. Los polimorfismos *HincII* y 1725 se utilizan conjuntamente, ya que el resultado se obtiene en un solo experimento.

<b>Polimorfismo</b>	<b>PIC</b>
<i>AvaII</i>	0.365
<i>NcoI</i>	0.632
<i>PvuII</i>	0.759
<i>SphI</i>	0.844
<i>HincII</i> y <i>C→T</i> <sub>1725</sub>	0.868
<i>HaeIII</i>	0.878
<i>TaqI</i>	0.882
<i>BglII</i>	0.883
<i>SfaNI</i> , <i>StuI</i> o <i>MspI</i> ,	0.883

#### V.4. DIAGNÓSTICO DIRECTO DE LA HF.

Uno de los objetivos de esta Tesis es identificar y caracterizar las mutaciones en el gen RLDL responsables de HF en España. La identificación de estas mutaciones permite el diagnóstico directo en los miembros de familias afectas y facilita el cribado en pacientes HF de nueva captación. Además, la identificación de mutaciones es importante para conocer los efectos de las mismas sobre el RLDL y su repercusión en los síntomas, más o menos graves, de la enfermedad. En este sentido, las mutaciones se han clasificado en función de su efecto sobre el receptor (Hobbs *et al.*, 1990), según indica la Fig. 92. Finalmente, y como veremos más adelante en esta Discusión, la identificación de mutaciones proporciona una información valiosa sobre la penetrancia de la HF en la población española y abre vías para el descubrimiento y estudio de otros factores genéticos que controlan los niveles plasmáticos del colesterol y, en consecuencia, el desarrollo de la arteriosclerosis.

Por el procedimiento seguido para la detección de mutaciones así como por las estrategias experimentales utilizadas para su caracterización, conviene dividir las mutaciones del gen RLDL en dos grupos: grandes alteraciones (cuya búsqueda y caracterización se realiza por transferencia Southern y PCR largo) y pequeñas mutaciones (detectadas mediante análisis de SSCPs y caracterizadas mediante secuenciación).



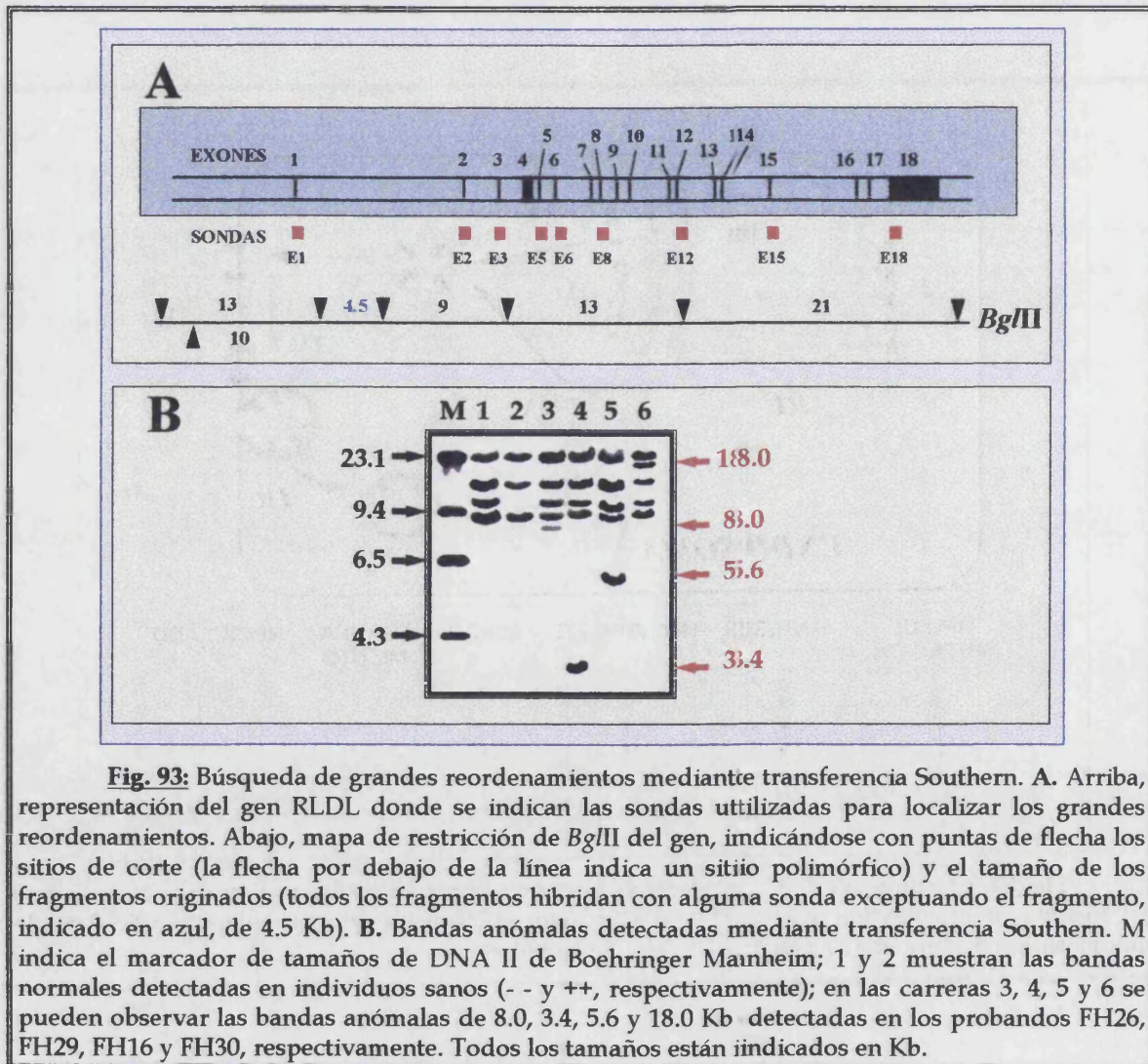
**Fig. 92:** Clasificación de las mutaciones según su efecto sobre la síntesis, procesado, unión del ligando, internalización y reciclado del receptor. IR: Invaginación recubierta; RE: Retículo endoplásmico; SG: Sistema de Golgi; VR: Vesícula recubierta.



#### V.4.1. Detección y Caracterización de Grandes Reordenamientos.

Es sabido que, en poblaciones no endogámicas, el 3-10% de las mutaciones responsables de HF son grandes reordenamientos del gen RLDL. Por lo tanto, en el estudio de nuestros probandos era necesario, en primer lugar, hacer un cribado para determinar los portadores de grandes mutaciones y separarlos del resto que se iban a utilizar en el estudio de polimorfismos y mutaciones puntuales.

Los diferentes análisis realizados en los 58 probandos (tres de los cuales son homocigotos) han permitido localizar 5 grandes alteraciones, lo que supone que un 8.2% de los alelos defectuosos presenta un gran reordenamiento. De estas alteraciones, 4 se detectaron al observar un fragmento anómalo por transferencia Southern (Fig. 93) en los individuos FH16 (mutación Valencia-1), FH26 (mutación Valencia-2), FH29 (mutación Valencia-3) y FH30 (mutación Valencia-4), (ver Apartado IV.2., Pág. 48), y 1 se detectó al observar una segregación anómala del polimorfismo *Bgl*II en la familia FH13, mutación Valencia-5, (Apartado IV.4.1.2., Pág. 71). Es posible que el porcentaje de grandes mutaciones pudiese incrementarse ligeramente debido a la presencia de la mutación Valencia-5 u otras similares en probandos en los que, por no haber familiares disponibles, no se ha podido analizar la segregación de *Bgl*II y el resto de los polimorfismos. Actualmente, en nuestro laboratorio se están desarrollando métodos para mejorar la detección de mutaciones que por afectar los extremos del gen RLDL pueden escapar a la detección cuando no es posible el estudio familiar.





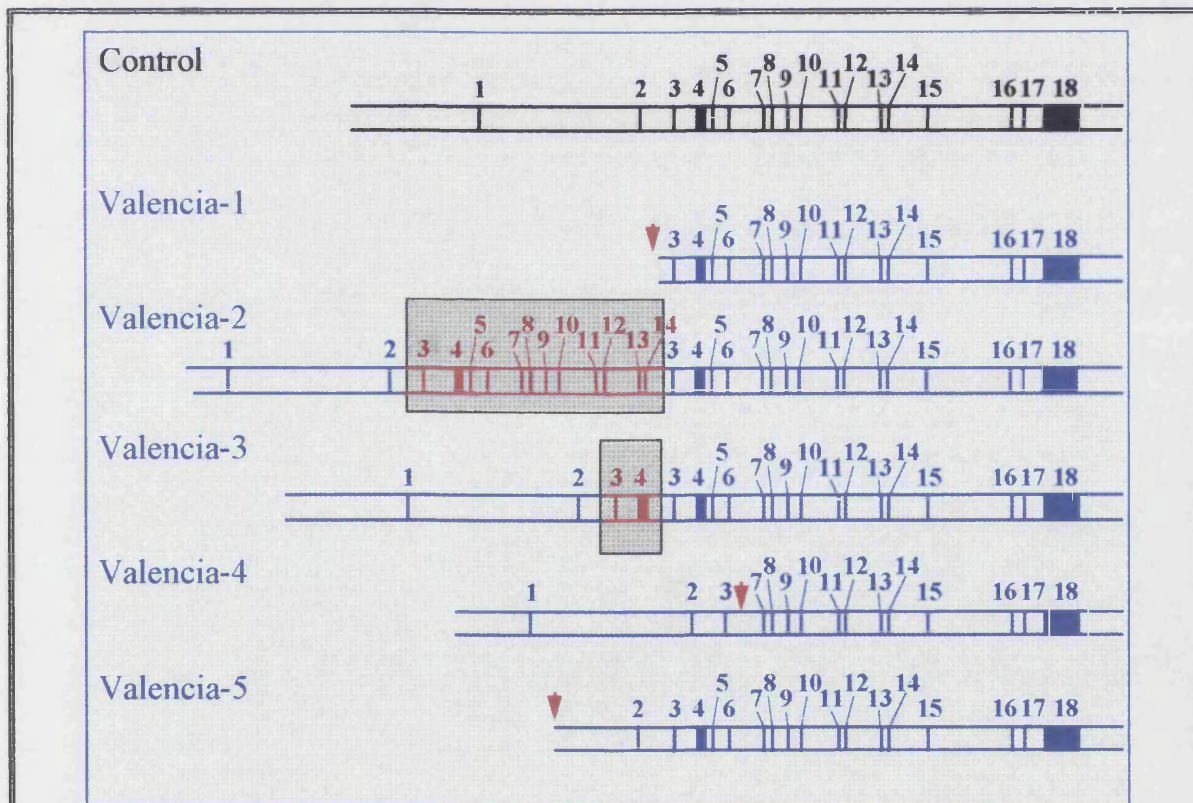
La frecuencia de los grandes reordenamientos encontrada en nuestra población es similar a la encontrada en otras poblaciones no endogámicas como la canadiense que no es de origen francés (2.5% Langlois, 1987), la inglesa (6% Horsthemke, 1987) y la italiana (7% Bertolini, 1995).

Como ya se ha indicado, de los cuatro reordenamientos identificados inicialmente me encargué de la caracterización de los denominados Valencia-1 y Valencia-4; la caracterización de Valencia-2 y Valencia-3 se puede ver en la Tesis IDoctoral de O. Puig y Valencia-5, detectada en la familia FH13, está siendo caracterizada actualmente, aunque ya sabemos que es una delección de la región 5' del gen que incluye el exón 1 (ver Fig. 94).

La mutación Valencia-1, presente en la familia FH16, implica una delección desde la región 5' del gen hasta el exón 2. Esta alteración supone que no se sintetice mRNA a partir de este alelo y, por lo tanto, esta mutación será de Tipo I (Goldstein *et al.*, 1995).

La mutación Valencia-4 consiste en una delección de los exones 4, 5 y 6. Aún suponiendo que en el procesado del mRNA se ensamblaran correctamente los exones 3 y 7, la mutación sería causante de HF ya que implica la pérdida de las repeticiones 3, 4, 5, 6 y 7 (ver Südorf *et al.*, 1985; Myant, 1990b) del dominio de unión del receptor a las LDL. La pérdida de estas repeticiones supone la pérdida de la capacidad de unión de LDL y de VLDL (Esser *et al.*, 1988), por lo que esta mutación, considerando siempre que el procesado del RNA es como se ha indicado, sería de Tipo III.

Las mutaciones Valencia-2 y Valencia-3 (detectadas en las familias FH26 y FH29) suponen una duplicación de los exones 3 al 14 y de los exones 3 y 4, respectivamente (Ver Fig. 94).



**Fig. 94:** Esquema de las grandes alteraciones del gen RLDL encontradas por nuestro grupo. En rojo se indican los exones duplicados y con una punta de flecha roja las regiones donde se localizan las delecciones.

Todas las grandes alteraciones parecen ser la causa de HF en los portadores ya que en dos casos (Valencia-1 y Valencia-5) no se llega a sintetizar la proteína; en otro caso (Valencia-4) faltan repeticiones esenciales para la unión de las LDL y VLDL y en las otras dos mutaciones, se altera en gran medida la región de unión de las lipoproteínas (Lehrman *et al.*, 1987; Bertolini *et al.*, 1994; O. Puig, Tesis Doctoral).

Se ha propuesto que muchas de las grandes alteraciones detectadas en el gen RLDL se han producido mediante procesos de recombinación promovidos por secuencias *Alu*; estas secuencias se encuentran repartidas a lo largo de todo el gen RLDL, suponen el 25% del DNA del mismo y se han identificado hasta 28 secuencias en este gen, lo que implica que existe una secuencia *Alu* cada 1.6 Kb del gen (según Hobbs *et al.*, 1990), es decir, el doble de lo encontrado en el resto del genoma. Normalmente, estas recombinaciones se producen en secuencias *Alu* que presentan la misma orientación, aunque se pueden producir recombinaciones entre secuencias invertidas e, incluso, una sola secuencia *Alu* puede originar una recombinación (Goldstein *et al.*, 1995). Se cree que la homología entre este tipo de secuencias origina el apareamiento erróneo, intracatenario e intercatenario, según las ocasiones, de los cromosomas durante el proceso de meiosis, lo que puede, mediante recombinación no recíproca, originar la delección o duplicación de las regiones limitadas por las secuencias implicadas. Lo que se desconoce es hasta qué porcentaje de grandes reordenamientos son causados por recombinación promovida por las secuencias *Alu*, aunque se admite que el número de sucesos de recombinación entre secuencias *Alu* se incrementa de forma geométrica al aumentar su número en una región (Stoppa-Lyonnet *et al.*, 1990).

#### V.4.2. Detección y Caracterización de Pequeñas Mutaciones en el Gen RLDL.

El análisis por técnica Southern no facilita la detección de pequeños reordenamientos ni, obviamente, la de mutaciones puntuales. Hasta hace poco tiempo, la detección de estas mutaciones implicaba la secuenciación del gen o del cDNA, haciendo el trabajo difícil y costoso. Afortunadamente, el análisis por SSCP, o mediante otros sistemas como el DGGE, permiten detectar la presencia de las mismas de forma más rápida, antes de proceder a la secuenciación de la región que las contiene.

La detección de mutaciones puntuales en este trabajo se ha realizado mediante la amplificación por PCR de la región a estudiar y su posterior análisis mediante SSCPs. Para aumentar la sensibilidad de esta técnica se han empleado diferentes condiciones electroforéticas (Leren *et al.*, 1993; Sheffield *et al.*, 1993).

El cribado de pequeñas mutaciones lo he realizado en la región promotora y en los exones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 13 y 14, mientras que en el resto de exones ha sido analizado por otros miembros de nuestro laboratorio (exones 8, 15 y 18 por O. Puig; exones 10 y 17 por J. Quesada; exones 7 y 16 por M. García-Sogo). En este estudio se han encontrado patrones anómalos de SSCP en varios exones, indicando la presencia de mutaciones, que están siendo caracterizadas actualmente (exones 4, 10, 16 y 17) y no se han detectado mutaciones responsables de HF en la región promotora y en los exones 12, 13, 15 y 18 (si bien existen mutaciones causantes de HF descritas en la bibliografía en todas estas regiones, a excepción del exón 18). El no haber encontrado mutaciones en estas regiones puede deberse a que realmente no existan mutaciones en ellas en nuestra muestra o que las mutaciones no se hayan detectado por los oligonucleótidos empleados ya que, en algunos casos (en especial en los exones 12 y 13) parte de los nucleótidos del exón o de la región implicada en el "splicing" no están incluidos en el fragmento que se amplifica con ellos. Recientemente hemos tenido acceso a oligonucleótidos que permiten el análisis de los diferentes exones junto con las secuencias intrónicas y que nos permitirán resolver este problema.

Por último, una vez identificado el fragmento donde se localiza una mutación se procede a su secuenciación mediante el protocolo descrito en el Apartado IV.5.2.2.3, Pag. 113. Tal secuenciación me ha permitido identificar la mayoría de las mutaciones mostradas en la Tabla 44, los cambios de aminoácido que originan algunas de ellas se pueden ver en la Fig. 95. Es interesante resaltar que he encontrado varios individuos con las mismas mutaciones; así, el 9.6% de los alelos patológicos presenta la mutación 111insA, el 6.5% presenta la mutación E256K, el 4.8% la mutación C358Y y un 3.2% la mutación W-18X. Cada una de las restantes mutaciones representa el 1.6% (solo han sido encontradas en un probando). El escaso porcentaje de alelos patológicos que presentan la misma mutación dificulta la realización de un diagnóstico directo rápido, ya que la probabilidad de encontrar la mutación responsable de la enfermedad con unos pocos ensayos es muy baja.

DISCUSIÓN

Tabla 44: Mutaciones del gen RLDL identificadas en nuestro laboratorio.

NOMBRE	DOM	EFEECTO	Localización	POSICIÓN	TIPO	Nº (%)	Denominación de los Probandos
M-21L	INI. TRAD.	Met → Leu sin inicio	E1	1 (G → A)	I	1 (1.6)	10
W-18 X	PEP. SEÑAL	Trp → stop	E1	11 (G → A)	I	3 (4.8)	23,46
111 INS A	UNIÓN	Rompe pauta → stop a 13 aa	E2	111	I	6 (9.6)	3, 17, 31, 32, 54, 61
C 68 W	UNIÓN	Cys → Trp	E3	276 (C → G)	II, III o V	1 (1.6)	20
E 80 K	UNIÓN	Glu → Lys	E3	301 (G → A)	II	1 (1.6)	52
313 +1 G → C	UNIÓN	altera el sitio de procesado de mRNA	I3	313 +1 (G → C)	I	1 (1.6)	62
P160R	UNIÓN	Pro → Arg	E4	542 (C → G)	III	1 (1.6)	50
790 DEL ATGA	UNIÓN	Rompe pauta → stop a 9 aa	E5	790	I	1 (1.6)	18
E 256 K	UNIÓN	Glu → Lys	E6	829 (G → A)	II	4 (6.4)	6, 23, 46, 58.1
D 280 G	UNIÓN	Asp → Gly	E6	902 (A → G)	II	1 (1.6)	35
920 INS TCAG	UNIÓN	Rompe pauta → stop a 1 aa	E6	920	I	1 (1.6)	14
C 358 Y	HOMOL. EGF	Cys → Tyr	E8	1146 (G → A)	II y III	3 (4.8)	9, 11, 33
R 395 W	HOMOL. EGF	Arg → Trp	E9	1246 (C → T)	V	1 (1.6)	4
T 413 R	HOMOL. EGF	Thr → Arg	E9	1301 (C → G)	V	1 (1.6)	42
G 528 V	HOMOL. EGF	Gly → Val	E11	1646 (G → T)	II	1 (1.6)	35
ITL 545 MPN	HOMOL. EGF	Ile-Thr-Leu → Met-Pro-Asn ¿procesado mRNA?	E11	1698 CACCCTA → GCCCAAT)	II	1 (1.6)	58
N619N	HOMOL. EGF	Asn → Asn	E13	1301 (C → G)	silenciosa	1	37
G 642 E	HOMOL. EGF	Gly → Glu ¿procesado mRNA?	E14	1998 (G → A)	II	1 (1.6)	47
N 804 K*	COLA CITOPL.	Asn → Lys	E17	2488 (C → A)	IV	1 (1.6)	34
DEL 5' - E1	PROM.	SIN TRANSCRIPCIÓN	P-I1		I	1 (1.6)	13
DEL 5' - E2	PROM.	SIN TRANSCRIPCIÓN	P- I2		I	1 (1.6)	16
DUP E3-E14**	UNIÓN-HOMOL.	EXONES 3 AL 14 DUPLICADOS	E3 - E14		I	1 (1.6)	26
DUP E3-E4**	UNIÓN	2 EXONES DUPLICADOS	E3 - E4		III	1 (1.6)	29
DEL E4-E6	UNION	3 EXONES DELECCIONADOS	E4 - E6		III	1 (1.6)	30

\* y \*\*: indican que ha sido caracterizada por J. Quesada y por O. Puig, respectivamente. Dom. dominio en el que se localiza la mutación. E, I y P indican que se localizan o afectan a un exón, intrón o al promotor, respectivamente. El tipo de la mutación se ha deducido mayoritariamente a partir de la localización de la misma y, en algunos casos, de la bibliografía. La columna Nº indica el número de alelos portadores y, entre paréntesis, se indica el porcentaje de alelos patológicos en los que se encuentra cada mutación. 58.01 no es un probando HF.



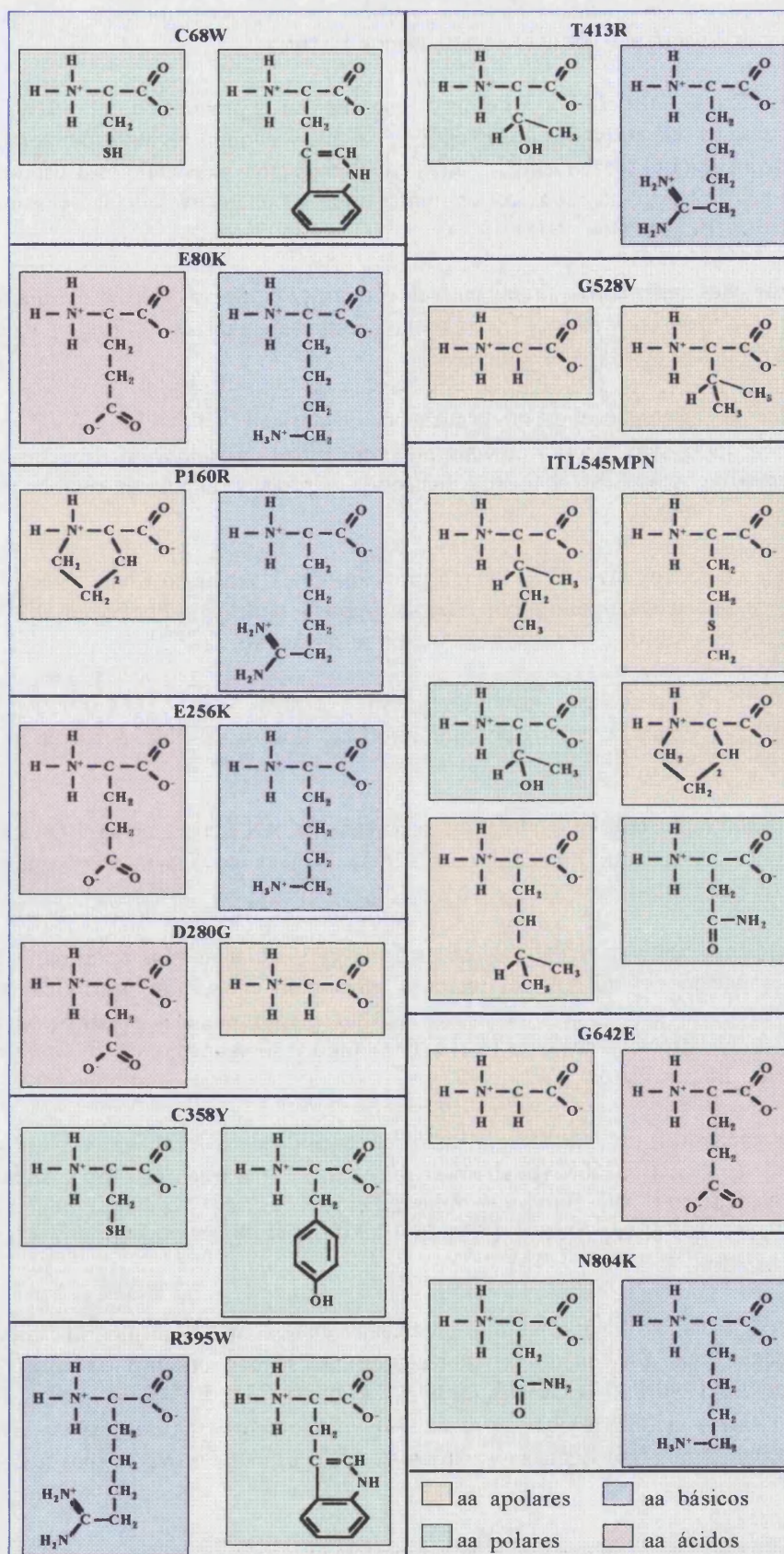


Fig. 95: Comparación entre los aminoácidos codificados por la secuencia normal y por la secuencia mutada en las diferentes mutaciones de cambio de sentido identificadas.

Las mutaciones identificadas se pueden clasificar en función de su efecto sobre el receptor y su síntesis; así, se puede decir que, por el momento, hemos encontrado:

- 2 mutaciones, Valencia-1 y Valencia-5, que impiden la producción del mRNA del RLDL en los alelos mutados, ya que en ambas mutaciones se ha deletado la región promotora. La mutación Valencia-1 no se ha descrito previamente mientras que la mutación Valencia-5 está siendo caracterizada actualmente, si bien, su extremo 3' parece ser similar al de las mutaciones French-Canadian (Hobbs *et al.*, 1987) y Denver (Hobbs *et al.*, 1988).

- 3 mutaciones que originan alteraciones en el receptor mediante delección o inserción de algunos exones, estas mutaciones son Valencia-2 y Valencia-3, caracterizadas por O. Puig, y Valencia-4. Estas tres mutaciones no se han descrito previamente.

- 1 mutación que cambia el codón de iniciación de la traducción (M-21L, A→C en el nucleótido 1). Esta mutación no ha sido descrita previamente, pero existe una mutación en el mismo codón que supone un cambio de A a T en el mismo nucleótido y produce el mismo cambio de aminoácido (Langenhoven *et al.*, 1996).

- 1 mutación de stop (W-18X), descrita previamente en población China (Sun *et al.*, 1994) y, posteriormente, en población española por nuestro grupo y el del Dr. Pocovi en el "Xth European Atherosclerosis Society Meeting" realizado en Aarhus en septiembre de 1995.

- 3 mutaciones que alteran la pauta de lectura: 111insA, 790delATGA y 920insTCAG. Estas mutaciones originan codones de parada pocos nucleótidos después de ellas. Ninguna ha sido descrita previamente.

- 1 mutación que altera un sitio de procesamiento del RNA en el intrón 3 (313+1 G→C) (ver Fig. 96.B), descrita previamente (Lombardi *et al.*, 1995), lo que supone que no se origine una proteína normal a partir de este punto.

- 2 mutaciones que, por encontrarse en las primeras y en las últimas bases de un exón, pueden alterar el procesamiento del mRNA del receptor. Ambas se encuentran dentro de las secuencias codificantes y suponen un cambio de aminoácido; la primera mutación, ITL545MPN, se localiza en las secuencias -3 y -2 del extremo 3' del exón 11 (ver Fig. 96.C) y la segunda, G642E, altera el sitio +1 del extremo 5' del exón 14 (ver Fig. 96.D).

- 11 mutaciones que cambian el significado del codón donde se localizan; 3 de estas mutaciones, E80K (Webb *et al.*, 1992), E256K (Ekström *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 1995), D280G (Traeger-Synodinos, comunicación "Xth European Atherosclerosis Society Meeting") han sido descritas previamente, y otras 9, C68W, P160R, C358Y, R395W, T413R, ITL545MPN, C528V, G642E y N804K, no lo han sido.

Se conocen, varias mutaciones que provocan cambios en los mismos nucleótidos o en los mismos aminoácidos que algunas de las mutaciones que se han descrito en esta Tesis: M-21L (Langenhoven *et al.*, 1996); 313+1 G→A (Sun *et al.*, 1995) C358R (Hobbs *et al.*, 1992), T413K (Hobbs *et al.*, 1992) y G528D (Hobbs *et al.*, 1990), lo que podría indicar que las zonas donde se localizan estos aminoácidos son regiones que sufren alteraciones más frecuentemente que otras regiones del mismo gen.

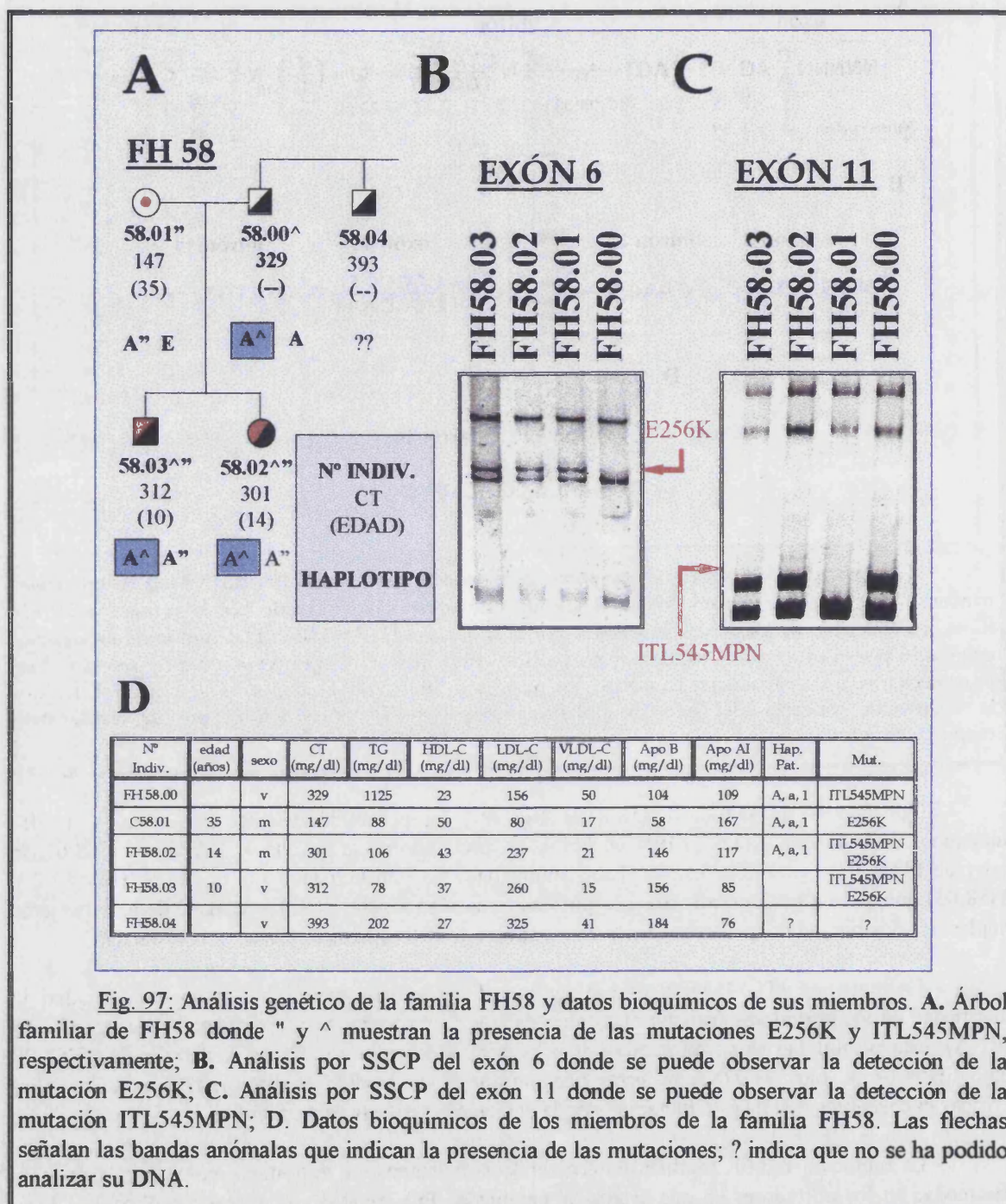
Los efectos de las mutaciones que hemos detectado, según se indica en la Tabla 44, se han deducido a partir de su localización en el gen RLDL o de los datos bibliográficos sobre mutaciones descritas previamente y localizadas en el mismo aminoácido o en sus proximidades. Sus efectos sobre el







causante de la enfermedad en los portadores al no encontrarse ninguna mutación más. Por último, la mutación E256K no ha sido encontrada en la población control analizada en nuestro laboratorio ni en las poblaciones control analizadas por los grupos mencionados anteriormente, lo que refuerza la idea de que no se trata de un polimorfismo sino de una mutación responsable de HF.



**Fig. 97:** Análisis genético de la familia FH58 y datos bioquímicos de sus miembros. **A.** Árbol familiar de FH58 donde " y ^ muestran la presencia de las mutaciones E256K y ITL545MPN, respectivamente; **B.** Análisis por SSCP del exón 6 donde se puede observar la detección de la mutación E256K; **C.** Análisis por SSCP del exón 11 donde se puede observar la detección de la mutación ITL545MPN; **D.** Datos bioquímicos de los miembros de la familia FH58. Las flechas señalan las bandas anómalas que indican la presencia de las mutaciones; ? indica que no se ha podido analizar su DNA.



## V.5. COMPLEMENTACIÓN DEL DIAGNÓSTICO CLÍNICO-BIOQUÍMICO CON EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO.

La HF es una patología grave ya que los pacientes tienen un riesgo de enfermedad coronaria 25 veces superior al de la población normal; los pacientes de HF entre 20 y 39 años presentan una mortalidad por infarto de miocardio 100 veces superior a la población normal (Miserez *et al.*, 1994b), los homocigotos mueren mayoritariamente por esta causa en edades tempranas y el 50% de los heterocigotos de HF presenta cardiopatía isquémica antes de los 50 años (Carmena, 1992). Por otro lado, una terapia hipolipemiente intensiva consigue la regresión de las lesiones cardiovasculares lo que, junto con el grave pronóstico de los casos de HF no tratados, hace que sea muy importante la identificación de los pacientes HF y de sus familiares tan pronto como sea posible para proceder a su tratamiento y evitar, así, las posibles complicaciones que esta enfermedad conlleva.

El diagnóstico clínico-bioquímico permite la identificación de la mayoría de los pacientes HF, siendo fácilmente identificables los individuos homocigotos y los heterocigotos índice para la enfermedad. Sin embargo, este diagnóstico presenta limitaciones ya que existe una zona de solapamiento de los niveles de CT y LDL-C entre la población sana y la enferma de HF en heterocigosis, por lo que siempre existe un porcentaje de individuos de difícil clasificación. Estas limitaciones se acentúan principalmente en niños y adultos jóvenes ya que la expresión fenotípica en estos individuos es incompleta (Streja *et al.*, 1978). Por ello, el diagnóstico genético tiene la gran ventaja de poder confirmar o excluir la presencia de la enfermedad en los niños y adultos jóvenes que no manifiestan los síntomas de la enfermedad y en adultos dudosos, permitiendo, además, el seguimiento del alelo alterado en generaciones sucesivas.

En nuestro laboratorio se han iniciado los trabajos para posibilitar el diagnóstico genético indirecto y directo de la población HF española, para lo cual se han analizado 22 familias (FH11, FH13, FH16, FH17, FH18, FH20, FH26, FH27, FH28, FH29, FH31, FH42, FH44, FH46, FH47, FH48, FH50, FH51, FH58, FH59, FH60 y FH62), de cuyo estudio hemos obtenido los siguientes resultados:

a) 4 presentaban grandes reordenamientos diferentes (FH13, FH16, FH26 y FH29); el quinto reordenamiento descrito en esta Tesis fue encontrado en el probando FH30.

b) de las restantes 18 familias, solamente en 2 (FH27 y FH60) no se ha podido confirmar el diagnóstico clínico de HF ya que no se observa cosegregación del fenotipo HF con un haplotipo (ver Apartados IV.4.1.6., Pag. 78, y IV.4.1.17., Pag. 92) y no se ha encontrado una mutación que pudiera causar de HF en ninguna de ellas.

c) de las 16 familias restantes, 1 ha sido analizada solamente mediante la segregación de la mutación localizada en sus miembros (la familia FH46 solamente ha sido analizada mediante el seguimiento de la mutación W-18X) y 15 han sido analizadas, mediante segregación de haplotipos y de las mutaciones localizadas en ellas, habiéndose obtenido los resultados siguientes:

- Mediante diagnóstico indirecto se ha podido seguir la segregación del alelo patológico en 13 de las 15 familias analizadas (FH11, FH17, FH18, FH28, FH31, FH42, FH44, FH47, FH48, FH50, FH51, FH59, y FH62), lo que representa el 86.7% de las mismas; solamente en 2 familias (FH20 y FH58) no se ha podido realizar el seguimiento del haplotipo patológico al ser los progenitores homocigotos para todos los polimorfismos analizados).

- Mediante diagnóstico directo, de las 16 familias analizadas, se ha podido seguir la segregación del alelo enfermo en 11 de ellas (FH11, FH17, FH18, FH20, FH31, FH42, FH44, FH46, FH47, FH50 y FH62) al haberse identificado la mutación responsable de la enfermedad, lo que supone un 68.75%; en una familia (FH58) se ha encontrado una situación compleja y se han caracterizado dos mutaciones potencialmente causantes de HF (ver Apartado IV.4.1.15., Pag. 90). En 3 se han identificado patrones de SSCPs anormales (FH44, FH51 y FH59) que parecen cosegregar con la enfermedad y, por lo tanto, podrían estar determinados por mutaciones responsables de la misma pero que aún no han sido caracterizadas a nivel de secuencia (familia FH44 en el exón 10, familia FH51 en el exón 8, familia FH59 en el exón 4) y en dos familias no se ha podido detectar ningún patrón de bandas anómalo (FH28 y FH48); si bien, el estudio para la detección de mutaciones y su caracterización no ha finalizado.

- En conjunto, de las 15 familias analizadas por ambos sistemas de diagnóstico, se ha podido seguir la segregación del alelo enfermo en 14 familias, lo que representa el 93.3%; la única familia donde el diagnóstico es problemático es la familia FH58 que presenta una situación compleja (ver Apartado IV.4.1.15., Pag. 90) dado que ambos progenitores son portadores de mutaciones que podrían ser responsables del fenotipo HF de sus descendientes, que han heredado las dos y que no presentan niveles de homocigotos. Quizá la mutación aportada por la madre asintomática no tenga importantes consecuencias o bien haya transmitido a sus hijos un factor genético protector hipolipemiante.

d) En las 20 familias donde se ha podido realizar el diagnóstico genético indirecto o directo, incluyendo las portadoras de grandes alteraciones (FH13, FH16, FH26 y FH29) y la FH46 (estudiada solo por segregación de la mutación W-18X) se han encontrado 4 individuos adultos dudosos (13.08, 26.06, 47.05 y 48.06) y 5 niños dudosos (18.04, 20.02, 47.07, 48.04 y 62.05), ver Tabla 45. Esto supone que existen individuos adultos dudosos en un 20% nuestras familias HF y niños dudosos en un 25% de familias, en conjunto, se han encontrado individuos dudosos en el 35% de las familias. El diagnóstico genético nos ha servido para deducir que de los individuos dudosos, solo 3 (20.02, 48.04 y 48.06) son realmente HF.

**Tabla 45:** Características bioquímicas y genéticas de los individuos considerados como dudosos.

	edad (años)	sexo	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo AI (mg/dl)	HF
?13.08	25	v	236	174	26	176	34	147	107	
?18.04	11	v	188	73	53	121	14	65	126	
?20.02	13	m	208	64	40	156	12	77	97	HF
?26.07	52	m	246	256	36	159	51	99	112	
?47.05	26	m	249	62	95	142	12	91	194	
?47.07	13	v	218	67	52	153	13	102	163	
?48.04	8	m	201	48	68	124	9	74	167	HF
?48.06	19	v	213	148	45	139	29	84	130	HF
?62.05	2	v	173	91	48	127	18	81	108	

e) En las 20 familias diagnosticadas genéticamente se han encontrado 10 individuos asintomáticos, de los cuales 6 son adultos (13.14, 13.16, 20.07, 46.02, 47.03 y 50.01) y 3 son niños o jóvenes menores de 18 años (13.17, 42.21 y 47.04). Estos resultados indican que en el 25% de las familias existen adultos asintomáticos y en un 15% de familias hay niños asintomáticos, en todos ellos se han encontrado mutaciones potencialmente causantes de HF (ver Tabla 46); esto supone que, en conjunto, existen individuos asintomáticos en el 30% de las familias. Además, se ha encontrado una familia (FH58) en la que un individuo (C58.01) normolipidémico presenta la mutación E256K; esta mutación ha sido heredada por sus dos hijos (58.02 y 58.03) que a su vez también han heredado la mutación I7L545MPN presente en el padre (58.00). Ambas mutaciones son potencialmente causantes de HF pero los dos niños presentan niveles de CT y LDL-C de pacientes heterocigóticos, ver Fig. 97. Si se considera a 58.01 como un individuo asintomático, el porcentaje de familias con individuos adultos asintomáticos es del 30%.

A nuestro juicio, resulta curioso el porcentaje de familias con individuos adultos (mayores de 18 años) asintomáticos. Aunque se sabe que existe una variabilidad en la expresión de la enfermedad que se manifiesta con la existencia de fenotipos intermedios entre sano y HF (Hoegg , 1993; Kotze *et al.*, 1993), no hay literatura abundante sobre adultos HF asintomáticos. Curiosamente, se ha descrito la presencia de heterocigotos obligados normolipidémicos en población china (Sun *et al.*, 1994) y tunecina (Slimane *et al.*, 1995). Ya que en la mayoría de las poblaciones, portadores de mutaciones en el gen RLDL con niveles de LDL-C normales no son identificados si no es a través de estudios familiares (como el aquí presentado), la prevalencia de tales portadores en población general no es conocida. El grupo de Goldstein ha descrito el caso de una familia portadora de una mutación puntual, S156L, con varios miembros que, llevando la mutación, presentan niveles normales de colesterol (Hobbs *et al.*, 1989). El estudio familiar fue consistente con la transmisión de un gen dominante que disminuye o suprime el efecto hipercolesterolémico de la mutación en el RLDL. A través de análisis de ligamiento, este grupo excluyó la posibilidad de que tal gen fuera un alelo del gen RLDL así como de ApoB-100 o ApoE. Más recientemente, Sass *et al.* (1995) han descrito el caso de una familia franco-canadiense, portadora de una delección de 5 Kb que afecta a los exones 2 y 3 del gen RLDL, en la que también encuentran individuos portadores normolipidémicos. Su estudio indica que es poco probable que alelos de los genes RLDL, ApoB, HMG-CoA reductasa, ApoAI-CIII-AIV y lipoproteína lipasa sean responsables del efecto hipolipemiante en esa familia y sugiere que el alelo e2 del gen ApoE puede estar implicado en tal efecto. En nuestro caso, estudios similares serán realizados próximamente en aquellas familias accesibles que podamos ampliar.

**Tabla 46:** Características bioquímicas y genéticas de los individuos considerados como asintomáticos.

	edad (años)	sexo	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo AI (mg/dl)	Hap. Pat.	Mutación identificada
C13.14	49	m	221	171	34	145	34	100	131	A, a, 1	Del 5'-exón 1
C13.16	54	m	193	62	53	128	12	70	88	A, a, 1	Del 5'-exón 1
C13.17	16	m	177	56	52	114	11	63	78	A, a, 1	Del 5'-exón 1
C20.07	21	m	211	60	44	155	12	117	132	C, c, 3	C68W
C42.21	8	m	180	60	36	132	12	82	80	C, c, 3	T413R
C46.02	21	v	209	76	56	138	15	99	140		W-18X
C47.03	19	v	160	44	47	104	9	60	113	F, e, 5	G642E
C47.04	14	m	168	31	67	95	6	56	159	F, e, 5	G642E
C50.01		m	183	136	33	123	27	73	96	A, a, 1	P160R

f) En la actualidad, 42.21 (niña asintomática que diagnosticamos genéticamente como portadora de HF) presenta niveles de CT de paciente HF heterocigoto, lo que muestra la necesidad de realizar un seguimiento continuado de los niños portadores de la enfermedad que no presentan síntomas durante una parte importante de su infancia y adolescencia.

g) Posiblemente, el número de individuos asintomáticos en nuestras familias sea mayor del encontrado hasta ahora. Esto se debe a que las personas sanas (incluso las pertenecientes a una familia afecta) son más reacias a acudir a la consulta o a hacerse análisis que las personas enfermas, por lo que puede existir un sesgo en contra de la identificación de individuos dudosos o asintomáticos. Además, como comentaba mas arriba, en la mayoría de las poblaciones, los individuos portadores de mutaciones en el gen RLDL que sean asintomáticos es probable que solo sean detectados a través de estudios familiares, por lo que es difícil conocer su prevalencia. Hasta donde nosotros sabemos, y según hemos podido contrastar en el último congreso de la Sociedad Española de Arteriosclerosis (Córdoba, octubre, 1996), el que aquí presento es el primer estudio donde se describe la presencia de individuos portadores de HF normolipidémicos en nuestra población.

La presencia de individuos adultos asintomáticos en nuestras familias HF, portadoras de diferentes mutaciones, plantea muchas cuestiones sobre las causas por las que unos individuos procedentes de la misma familia y, por tanto, con la misma mutación, presentan niveles tan diferentes de CT, por ejemplo FH13.10 presenta un CT de 337 mg/dl mientras que C13.16 tiene un nivel de 193 mg/dl, siendo portadoras de la misma mutación, son hermanas y tienen aproximadamente la misma edad y sexo; FH47.06 presenta unos niveles de 278 mg/dl y C47.03 de 160 mg/dl cuando son portadores de la misma mutación y son primos hermanos, del mismo sexo y edad. Todos estos datos refuerzan la idea de que existe un gen o genes dominantes que pueden disminuir o suprimir el efecto de las mutaciones en el gen RLDL

De los individuos asintomáticos encontrados, 4 presentan mutaciones que impiden la síntesis del RLDL (C13.14, C13.16 y C13.17 presentan la mutación Valencia-5 que impide la transcripción del gen RLDL, C46.02 es portador de la mutación W-18X que origina un codón de parada en el péptido señal) y 3 presentan mutaciones que originan un cambio de aminoácido (C20.07 presenta la mutación C68W, C47.03 la mutación G642E y C58.01 la mutación E256K), por lo que, al menos, en 4 personas el nivel de actividad de uno de los receptores es totalmente nulo y en las demás, probablemente, defectivo.

Está claro, por lo tanto, que existen individuos que están protegidos frente a la HF en nuestra población, independientemente de la mutación que presenten. Las causas por las que estas personas no presentan los síntomas de la enfermedad pueden ser de origen ambiental (dieta, ejercicio, tipo de vida, etc.) o bien genéticos (mutaciones en otros genes que limiten la producción de LDL, mayor actividad del receptor normal por presentar una mayor inducción de su transcripción, menor síntesis endógena de colesterol, mayor actividad de otros receptores capaces de reconocer ApoB, menor transformación de las VLDL en LDL al ser retiradas más efectivamente de la sangre por los receptores que reconocen ApoE, menor captación de los lípidos procedentes de la dieta, etc.) e incluso una interacción entre ambos. Todo esto hace que la búsqueda de las causas por las que existen individuos asintomáticos sea muy interesante, a la vez que compleja, pues puede ayudar a ampliar nuestro conocimiento sobre el metabolismo del colesterol y desarrollo de la arterosclerosis, así como a diseñar nuevas estrategias para combatir esta enfermedad.



# ***CONCLUSIONES***



1. He diseñado y optimizado procedimientos que facilitan el análisis molecular del gen RLDL y, en consecuencia, permiten hacer un diagnóstico de la HF de forma sencilla, rápida e inocua. Así:

1.1. He puesto a punto procedimientos, basados en el análisis de SSCPs y tinción con plata, que permiten la detección de polimorfismos y mutaciones en los genes RLDL y ApoB.

1.2. He evaluado la aplicabilidad de la técnica de PCR largo al estudio de RFLPs, demostrando su eficacia en el proceso de obtención de datos pero advirtiéndome también sobre posibles limitaciones en el análisis de algunos polimorfismos (caso de *ApaLI* en el gen RLDL).

1.3. He desarrollado un procedimiento de secuenciación de DNA, cíclico, en el que durante la amplificación por PCR, se incorpora un fluoróforo que permite la detección del resultado en un secuenciador automático. El método es sencillo, repetitivo, sensible y muy resolutivo.

2. He analizado cinco RFLPs (*AvaII*, *PvuII*, *NcoI*, *SfaNI* y *TaqI*) del gen RLDL que, junto a los estudiados por otros miembros de nuestro equipo, permiten establecer las combinaciones más útiles para el diagnóstico de la HF por análisis de segregación del gen. En esta Tesis se propone la combinación constituida por *AvaII*, *PvuII*, *NcoI*, *SphI* y *BglIII*, con un PIC acumulado de 0.848, como la más conveniente para obtener la máxima información con un mínimo de esfuerzo (2 amplificaciones por PCR largo y 1 transferencia Southern, inexcusable para la detección de grandes reordenamientos).

3. El estudio de las mutaciones detectadas en el gen RLDL de nuestros probandos HF y familiares indica que sólo un, aproximadamente, 10% de ellas son grandes reordenamientos, siendo el resto pequeñas alteraciones o mutaciones puntuales. De éstas hemos identificado 19: 1 silenciosa, 1 de parada, 3 de cambio de pauta de lectura, 1 de procesamiento del RNA y 13 de cambio de aminoácido (aunque 2 de ellas podrían también afectar al procesamiento). 13 de las mutaciones identificadas son nuevas, descritas por primera vez en esta Tesis.

El porcentaje que cada una de las mutaciones representa en nuestra muestra oscila entre el 1.6 y el 9.6%. Tres de ellas están presentes en el 20% de los probandos HF.

4. El diagnóstico genético permite confirmar el clínico y resolver los casos dudosos, presentes en el 35% de las familias analizadas. Además, permite detectar individuos portadores de la enfermedad que son normolipidémicos. Individuos adultos con tales características están presentes en el 25-30% de las familias HF, lo que parece indicar que la penetrancia de la enfermedad es menor que la prevista inicialmente. Los datos del estudio familiar son compatibles con la hipótesis de que existen genes dominantes capaces de suprimir el efecto causado por mutaciones en el gen RLDL.

5. El estudio molecular de la HF proporciona una información valiosa para llegar a comprender aspectos relativos a la expresividad y penetrancia de esta enfermedad en nuestra población y, en consecuencia, para avanzar en nuestro conocimiento sobre los factores genéticos que median en el desarrollo de la arteriosclerosis y la enfermedad coronaria.

*CONCLUSIONES*

---



# ***REFERENCIAS***



- Ahn, Y.I., Kamboh, I., Aston, C.E., *et al.* (1994). Role of common genetic polymorphisms in the LDL receptor gene in affecting plasma cholesterol levels in the general population. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, **14**: 663-670.
- Ascaso, J.F., Serrano, S., Martinez Valls, J., *et al.* (1987). Efecto del aceite de oliva de la dieta sobre las lipoproteínas plasmáticas de alta densidad. *Rev. Clin. Esp.*, **180**: 486-488.
- Bansai, A. y Gierasch, L.M. (1991). The NPXY internalization signal of the LDL receptor adopts a reverse-turn conformation. *Cell*, **67**: 1195-1201.
- Barnes, M.J. (1985). Collagen in atherosclerosis. *Collagen Rel. Res.*, **6**: 585-593.
- Beaudet, A.L. y Tsui, L. (1993). A suggested nomenclature for designating mutations. *Human Mutation*, **2**: 245-248.
- Beaumont, J.L., Carlson, L.A., Cooper, G.R., *et al.* (1970). Classification of hyperlipidemias and hyperlipoproteinemias. *Bull. Who.*, **43**: 891-908.
- Beidler, J.L., Hilliard, P.R. y Rill, R.L. (1982). Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal. Biochem.*, **126**: 374-380.
- Berkman, N., Weir, B.S. Pressman-Schwartz, S. *et al.* (1992). Haplotype analysis at the low density lipoprotein receptor locus: applications to the study of familial hypercholesterolemia in Israel. *Hum. Genet.*, **88**: 405-410.
- Bernat, J., Gaumert, R., y Still, J. (1978). Mode of action of lipid lowering agents clofibrate and BM 25.075 on cholesterol biosynthesis in rat liver. *Atherosclerosis*, **30**: 147-152.
- Bertolini, S., Patel, D.D., Coviello, D.A. *et al.* (1994). Partial duplication of the EGF precursor homology domain of the LDL-receptor protein causing familial hypercholesterolemia (FH-Salerno). *J. Lipid. Res.*, **35**: 1422-1430.
- Bertolini, S., Garuti, R., Lelli, W. *et al.* (1995). Four novel partial deletions of LDL-receptor gene in Italian patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, **15**: 81-88.
- Bierman, E.L. y Glomset, J.A. (1985). Disorders of lipid metabolism. En: Wilson JD, Fooster DW, eds. *Williams textbook of endocrinology*. 7 ed. Filadelfia: WB Saunders, pp: 1108-1136.
- Blackhart, B.D., Ludwig, E.H., Pierotti, V.R. *et al.* (1986). Structure of human apolipoprotein B gene. *J. Biol. Chem.*, **261**: 15364-15367.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. y Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, **32**: 314-331.
- Brown, M.S., Dana, S.E. y Goldstein, J.L. (1974). Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase activity in cultured human fibroblasts: a comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.*, **249**: 789-799.

- 
- Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1976). The low density lipoprotein pathway in human fibroblasts. *Trends Biochem. Sci.*, 1: 193-196.
  - Brown, M.S., Kovanen, P.T. y Goldstein, J.L. (1981). Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science*, 212: 628-635.
  - Camejo, G., Hurt-Camejo, E. y Bondjers, G. (1990a). Mecanismos arterogénicos de las lipoproteínas. En: *Hipercolesterolemias: Clínica y tratamiento*, 2ª edición. Ed: Carmena, R.. Ediciones Doyma, Barcelona, pp: 61-76.
  - Carmena, R., Ascaso, J.F., Serrano, S., *et al.* (1984). Treatment of Heterozyguos Familial Hypercholesterolemia with diet, cholesteramine and probucol. En: Carlson, L.A., Olsson, A.G., eds. *Treatment of Hyperlipoproteinemia*. New York: Raven Press, pp: 147-150.
  - Carmena, R. (1990). Hipercolesterolemias primarias. En: *Hipercolesterolemias: Clínica y tratamiento*, 2ª edición. Ed: Carmena, R.. Ediciones Doyma, Barcelona, pp: 61-76.
  - Chakravarty, A., Buetow, K.H., Antonarakis, S.E., *et al.* (1984). Nonuniform recombination within the human  $\beta$ -Globin gene cluster. *Am. J. Hum. Genet.*, 36: 1239-1258.
  - Chakravarty, A. y Buetow, K.H. (1985). A strategy for using multiple linked markers for genetic counseling. *Am. J. Hum. Genet.*, 37: 984-997.
  - Chamley-Chapbell, J.H., Campbell, G.R., y Ros, R. (1985). The smooth muscle cell in culture. *Physiol. Rev.*, 56: 139-145.
  - Chaves, F.J., Puig, O., García-Sogo, M., *et al.* (1996). Seven DNA polymorphisms in the LDL receptor gene: application to the study of familial hypercholesterolemia in Spain. *Clin. Genet.*, 50: 28-35.
  - Chen, S.H., Yang, C.Y., Chen, P.F. *et al.* (1986). The complete cDNA and amino acid sequence of human apolipoprotein B-100. *J. Biol. Chem.*, 261: 12918-12921.
  - Chen, S., Chang, S-Y., Gravitt, P. y Respass, R. (1994). Long PCR. *Nature*, 369: 684-685.
  - Cohen, J. (1994). Long PCR leaps into larger DNA sequences. *Science*, 263: 1564-1565.
  - Cooper, D.N. y Clayton, J.F. (1988). DNA polymorphisms and the study of disease associations. *Hum. Genet.*, 78: 299-312.
  - Cooper, D.N. y Krawczak, M. (1993). Indirect analysis of human genetic disease. En: *Human gene mutation*. Ed. Cooper, D.N. y Krawczak, M. BIOS Scientific Publisher Limited.
  - Cummings, R.D., Kornfeld, S., Schneider, W.J. *et al.* (1983). Biosynthesis of the N- and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.*, 258: 15261-15273.
  - Daga, A., Mattioni, T., Balesterri, R. *et al.* (1990). Use of three DNA polymorfisms of the LDL receptor gene in the diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Hum. Genet.*, 84: 412-416.
  - Dawson, P.A., Hofmann, S.L., van der Westhuyzen, D.R., *et al.* (1988). Sterol-dependent repression of low density lipoprotein receptor promoter by 16-base pair adjacent to binding site for transcription factor Sp1. *J. Biol. Chem.*, 263: 3372-3379.



- Davis, C.G., Goldstein, J.L., Südhof, T.C., *et al.* (1987). Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature*, **326**: 760.
- Defesche, J.C., Pricker, K.L., Hayden, M.R. *et al.* (1993). Familial defective apolipoprotein B-100 is clinically indistinguishable from familial hypercholesterolemia. *Arch. Intern. Med.*, **153**: 2349-2356.
- Dekelbaund, R.J., Einsenberg, S., Fainaru, M. *et al.* (1979). *In vitro* production of human plasma low density lipoprotein-like particles. A model for very low density lipoprotein catabolism. *J. Biol. Chem.*, **254**: 6079-6087.
- Demant, T., Carlson, L.A., Holmquist, L. *et al.* (1988). Lipoprotein metabolism in hepatic lipase deficiency: studies on the turnover of apolipoprotein B and on the effect of hepatic lipase on high density lipoprotein. *J. Lipid. Res.*, **29**: 1603-1611.
- Ekstrom, U., Abrahamson, M., Sveger, T. *et al.* (1995). An efficient screening procedure detecting six novel mutations in the LDL receptor gene in Swedish children with hypercholesterolemia. *Hum. Genet.*, **96**: 147-150.
- Enholm, C., Mathey, R.W., Chappell, D.A. *et al.* (1984). The role of apolipoprotein E in the lipolytic conversion of  $\beta$ -very low density lipoproteins to low density lipoproteins in type III hyperlipoproteinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**: 5566-5570.
- Ernst, N., Fisher, M., Bowen, P. *et al.* (1980). Changes in plasma lipids and lipoprotein after modified fat diet. *Lancet*, **2**: 111-113.
- Esser, V., Limbird, L.E., Brown, M.S. *et al.* (1988). Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.*, **263**: 13282-13290.
- Gavigan, J.P., Patel D.D., Soutar, A.K. y Knight, L. (1988). An antibody to the low-density lipoprotein (LDL) receptor that partially inhibits the binding of LDL to cultured human fibroblasts. *Eur. J. Biochem.*, **171**: 355-361.
- Geisel, J., Weisshaar, K., Oette, K. y Doerfler, W. (1988). A new ApaLI restriction fragment length polymorphism in the low density lipoprotein receptor gene. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **26**: 429-433.
- Gelehrter, T.D. y Collins, F.S. (1990). Population genetics and multifactorial inheritance. En: Principles of medical genetics. Ed. Gardner, J.N.. Williams & Wilkins, Baltimore, pp: 49-68.
- Goldberg, I.J., Le, N-A., Paterniti, J.R. *et al.* (1982). Lipoprotein metabolism during acute inhibition of hepatic triglyceride lipase in the cynomolgus monkey. *J. Clin. Invest.*, **70**: 1184-1192.
- Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1977). Atherosclerosis: the low density lipoprotein receptor hypothesis. *Metabolism*, **26**: 1257-1275.
- Goldstein, J.L., Hobbs, H.H. y Brown, M.S. (1995). Familial hypercholesterolemia. En: The metabolic and molecular bases of inherited disease, 7<sup>o</sup> Edición. Ed: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., y Valle, D. McGraw-Hill, Inc., New York, pp: 1981- 2030.

- 
- Gudnason, V., Mak, Y-T., Betteridge, J. *et al.* (1993). Use of single-strand conformational polymorphism method to detect recurrent and novel mutations in the low-density lipoprotein receptor gene in patients with familial hypercholesterolemia: detection of a novel mutation Asp<sup>200</sup>→Gly\*. *Clin. Investig.*, **71**: 331-337.
  - Gutierrez Fuentes, J.A., Gómez Gerique, J.A. *et al.* (1993). Estudio DRECE. Dieta y riesgo de enfermedades cardiovasculares en España. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid.
  - Hämäläinen, T., Palotie, A., Aalto-Setälä, K. *et al.* (1992). Absence of familial defective apolipoprotein B-100 in Finish patients with elevated serum cholesterol. *Atherosclerosis*, **82**: 177-183.
  - Havel, J.R., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1980). Lipoprotein and lipid transport. En: *Metabolic control and disease*. ed. Bondey, P.K. y Rosembreg, L.E. Filadelfia: WB Saunders, pp: 393-498.
  - Havel, J.M. y Kane, J.P. (1982). Therapy of hyperlipidemic states. *Ann. Rev. Med.*, **33**:417-433.
  - Heiss, G., Tamir, Y., Davis, C.E. *et al.* (1980). Lipoprotein-cholesterol distributions in selected North American populations: the lipids research clinics programs prevalence study. *Circulation*, **61**: 302-315.
  - Hobbs, H.H., Brown, M.S., Russell, D.W. *et al.* (1987). Deletion in the gene for the LDL receptor in majority of French Canadians with familial hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.*, **317**: 734.
  - Hobbs, H.H., Leitersdorf, E., Goldstein, J.L. *et al.* (1988). Multiple crm-mutations in familial hypercholesterolemia: evidence for 13 alleles, including four deletions. *J. Clin. Invest.*, **81**: 909.
  - Hobbs, H.H., Russell, D.W., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1990). The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: Mutational analysis of a membrane protein. *Annu. Rev. Genet.*, **24**: 133-170.
  - Hobbs, H.H., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1992). Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Human Mutation*, **1**: 445-466.
  - Hoeg, J.M. (1993). Homozigous familial hypercholesterolemia: a paradigm for phenotypic variation. *Am. J. Cardiol.*, **72**: 11D-14D.
  - Horsthemke, H., Dunning, A. y Humphries, S. (1987). Identification of deletions in the human low density lipoprotein receptor gene. *J. of Medical Genetics*, **24**: 144-147.
  - Hunninghake, D.B. y Azarnoff, D.L. (1968). Clofibrate effect on catecholamine-induced metabolic changes in man. *Metabolism*, **17**: 588-595.
  - Humphries, S.E., Kessler, A.M., Horsthemke, B. *et al.* (1985). A common DNA polymorphism of the low density lipoprotein (LDL) receptor gene and its use in diagnosis. *Nucleic Acids Res.*, **i**: 1003-1005.
  - Humphries, S., King-Underwood, L., Gudnason, V. *et al.* (1993). Six DNA polymorphisms in the low density lipoprotein receptor gene: their genetic relationship and an example of their use for

identifying affected relatives of patients with familial hypercholesterolemia. *J. Med. Genet.*, **30**: 273-279.

- Igloi, G.L. y Schiefermayr, E. (1993); Enzymatic addition of fluorescein- or biotin- riboUTP to oligonucleotides results in primers suitable for DNA sequencing and PCR. *Biotechniques*, **15**: 486-496.

- Illingworth, D.R. (1993). How effective is drug therapy in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Am. J. Cardiol.*, **72**: 54D-58D.

- Innerarity, T.L., Weisgraber, K.H., Arnold, K.H. *et al.* (1990). Familial defective apoB-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.*, **31**: 1337-1349.

- Ip, J.H., Fuster, V., Badimon, L. *et al.* (1990). Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **15**: 1667-1687.

- Jakson, R.L., Morriset, J.D. y Gooto, A.M. (1976). Lipoprotein structure and metabolism. *Physiol. Rev.*, **56**: 259-266.

- Kannel, W.B., Castelli, W.P. y Gordon, T. (1979). Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspectives based on the Framingham study. *Am. Intern. Med.*, **90**: 85-91.

- Kannel, W.B., Neaton, J.D., Wentworth, D. *et al.* (1986). Overall and coronary heart disease mortality rates in relation to major risk in 325348 men screened for MRFIT. *Am. Heart J.*, **112**: 825-836.

- Keys, A. (1980). Seven countries. A multivariable analysis of death and coronary heart disease. Cambridge Mass, Harvard University Press.

- Keys, A., Andreson, J.T. y Grande, F. (1957). Prediction of serum cholesterol responses of man to changes in fats in the diet. *Lancet*, **2**: 129-143.

- Kisimoto, A., Brown, M.S., Slaughter, C.A. y Goldstein, J.L. (1987). Phosphorylation of serine 833 in cytoplasmic domain of low density lipoprotein receptor by high molecular weight enzyme resembling casein kinase II. *J. Biol. Chem.*, **262**: 1344-1351.

- Koivisto, P.V., Koivisto, U.M., Mietinen, T.A. *et al.* (1992). Diagnosis of heterozygous familial hypercholesterolemia. Dna analysis complements clinical examination and analysis of serum lipid levels. *Arterioscler-Tromb.*, **12**: 584-592.

- Koivisto, U.M., Palvino, J.J., Janne, O.A. y Kontula. (1994). A single base substitution in the proximal Sp1 site of the human LDLR promoter as a cause of heterozygous familial hypercholesterolemia. *P.N.A.S.*, **91**: 10526-10530.

- Kotze, M.J., Langenhoven, E., Dietzsch, E. y Retief, A.E. (1989). Haplotypes identified by 10 DNA restriction fragment length polymorphisms at the human low density lipoprotein receptor gene locus. *J. Med. Genet.*, **26**: 255-259.

- Kotze, M.J., Langenhoven, E., Warnich, L. *et al.* (1991). The molecular basis and diagnosis of familial hypercholesterolemia in south african afrikaners. *Ann. Hum. Genet.*, **55**: 115-121.

- 
- Kotze, M.J., De Villiers, W.J., Steyn, K. *et al.* (1993). Phenotypic variation among familial hypercholesterolemia heterozygous for either one of two Afrikaner founder LDL receptor mutations. *Arterioscler. Tromb.*, **13**: 1460-1468.
  - Kwiterowich, P.O., (1986). Levy, R.I. y Fredrickson, D.S. (1973). Neonatal diagnosis of familial tipe II hypercholesterolemia. *Lancet*, **y**: 118-122.
  - Kwiterowich, P.O., Fredrickson, D.S. y Levy. R.I. (1974). Familial hypercholesterolemia (one form of familial type II hypercholesterolemia): a study of its biochemical, genetic and clinical presentation in childhood. *J. Clin. Invest.*, **53**: 1237-1249.
  - Kwiterowich, P.O. (1986). Biochemical, clinical, epidemiologic, genetic and pathologic data in the pediatric age group relevant to cholesterol hypothesis. *Pediatrics*, **78**: 349-362.
  - Kwiterowich, P.O. (1993). Identification and treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia in children and adolescents. *Am. J. Cardiol.*, **72**: 30D-37D.
  - Langenhoven, E., Warnich, L., Thiart, R. y Rubinsztein, D.C. (1996). Two novel mutaions causing receptor-negative familial hypercholesterolemia in a South African Indian homozygota. *Atherosclerosis*, **125**: 111-119.
  - Langer, T. y Levy, R.I. (1968). Acute muscular syndrome associated with administration of clofibrate. *N. Engl. J. Med.*, **279**: 856-858.
  - Langlois, S., Kastelein, J.J.P. y Hayden, M.R. (1988). Characterization of six partial deletions in the low-density-lipoprotein (LDL) receptor gene causing familial hypercholesterolemia (FH). *J. Hum. Genet.*, **43**: 60-68.
  - Lehrman, M.A., Goldstein, J.L., Russell, D.W. y Brown, M.S. (1987b). Duplication of seven exons in LDL receptor gene caused by Alu-Alu recombination in a subject with familial hypercholesterolemia. *Cell*, **48**: 827-35.
  - Leitersdorf, E. y Hobbs, H.H. (1987). Human LDL receptor gene: Two ApaLI RFLPs. *Nucleic Acids Res.*, **15**: 2782.
  - Leitersdorf, E., Chakravarti, A. y Hobbs, H.H. (1989). Polymorphic DNA haplotypes at the LDL receptor locus. *Am. J. Hum. Genet.*, **44**: 409-412.
  - Leitersdorf, E., Tobin, E.J., Davignon, J. y Hobbs, H.H. (1990). Common low-density lipoprotein receptor mutations in the french canadian population. *J. Clin. Invest.*, **85**: 1014-1023.
  - Leren, T.P., Solberg, K., Rodningen, O.K. *et al.* (1993). Evaluation of Running conditions for SSCP analysis: application of SSCP for detection of point mutations in the LDL receptor gene. *PCR Methods and Applications*, **3**: 159-162.
  - Levis, B., Katan, M. y Merks, J. (1981). Towards an improved lipid lowering diet; additive effects of changes in nutrient intake. *Lancet*, **2**: 1310-1313.
  - Lithell, H., Bobers, J., Hellsing, K. *et al.* (1978). Increased of lipoprotein lipase activity in human skeletal muscle during clofibrate administration. *Am. J. Clinic Invest.*, **8**: 67-76.



- 
- Lombardi, P., Sijbrands, E.J., van de Giessen, K. *et al.* (1995). Mutations in the low density lipoprotein receptor gene of familial hypercholesterolemic patients detected by denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing. *J. Lipid. Res.*, **36**: 860-867.
  - Mahley, R.W. (1981). Familial dysbetalipoproteinemia. Abnormal binding of mutant apoprotein E to low density lipoprotein receptors of human fibroblasts and membranes from liver and adrenal of rats, rabbits and cows. *J. Clin. Invest.*, **68**: 1075-1085
  - Matter, K., Hunziker, W. y Mellman, I. (1992). Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell*, **71**: 741-753.
  - Mattson, F.H. y Grundy, S.M. (1985). Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *J. Lipid Res.*, **26**: 194-202.39.
  - Metha, J., Lopez, M.L. y Wargovich, T. (1987) Eicosapentaenoic acid: its relevance in atherosclerosis and coronary heart disease. *Am. J. Cardiol.*, **59**: 155-159.
  - Miettinen, T.A. (1980). Effect of dietary fiber on serum lipids and cholesterol metabolism in man. En: *Atherosclerosis*. Gotto AM, Smith LC, Allen B eds. New York: Springer Verlag, pp: 311-315.
  - Minnich, A., Roy, M., Lavigne, J. y Davignon, J. (1995). New methods for rapid detection of low-density lipoprotein receptor and apolipoprotein B gene mutations causing familial hypercholesterolemia. *Clin. Biochem.*, **28**: 277-284.
  - Miserez, A.R., Schuster, H., Chiodetti, N. y Keller, U. (1993). Polymorphic hplotypes and recombination rates at the LDL receptor gene locus in subjects with and without familial hypercholesterolemia who are from different populations. *Am. J. Hum. Genet.*, **52**: 808-826.
  - Miserez, A.R., Schuster, H., Chiodetti, N. y Keller, U. (1994). CORRECTION: Polymorphic hplotypes and recombination rates at the LDL receptor gene locus in subjects with and without familial hypercholesterolemia who are from different populations. *Am. J. Hum. Genet.*, **55**: 849-850.
  - Miserez, A.R., Laager, R. Chiodetti, N. y Keller, U. (1994b). High prevalence of familial defective apolipoprotein B-100 in Switzerland. *J. Lipid. Res.*, **35**: 574-583.
  - Mitchinson, M.S. y Ball, R.V. (1982). Macrophages and atherogenesis. *Lancet*, **2**: 146-147.
  - Mount, R. (1982). A catalogue of splice junctions sequences. *Nucleic Acid. Res.*, **10**: 459-472.
  - Myant, N.B. (1990a). LDL: origin and metabolism. En: *Cholesterol metabolism, LDL and the LDL receptor*. Myant, N.B. Ed. Academic Press, Inc., pp: 184-232.
  - Myant, N.B. (1990b). LDL: The LDL receptor: structure, biosynthesis and molecular genetics. En: *Cholesterol metabolism, LDL and the LDL receptor*. Myant, N.B. Ed. Academic Press, Inc., pp: 316-396.

- 
- Myant, N.B., Gallagher, J., Knight, B.L. *et al.* (1991). Clinical sign of familial hypercholesterolemia in patients with familial defective apo B-100 and normal low-density lipoprotein receptor function. *Atherosclerosis*, **11**: 691-703.
  - Myant, N.B. (1993). Familial defective apolipoprotein B-100: a review, including some comparisons with familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*, **104**: 1-18.
  - Nei, M. y Roychoudhury, A.K. (1982). Genetic relationship and evolution of human races. En: *Evolutionary biology*. Hecht, M.K., Wallace, B. and Prance, G.T. Eds.. Plenum, New York., pp: 1-59.
  - Nissen, H., Hansen, P.S., Faergeman, O. y Horder, M. (1995). Mutation screening of the codon 3500 region of the apolipoprotein B gene by denaturing gradient-gel electrophoresis. *Clin. Chem.*, **41**: 419-423.
  - Orita, M., Sekiya, T. y Hayashi, K. (1990). DNA sequence polymorphisms in Alu repeats. *Genomics*, **8**: 271-278.
  - Packard, C.J., Boag, D.E., Clegg, R. *et al.* (1985). Effects of 1,2-cyclohexanedione modification on the metabolism of very low density lipoprotein apolipoprotein-B: potential role of receptors in intermediate density lipoprotein catabolism. *J. Lipid. Res.*, **26**: 1058-1067.
  - Pereira, E., Ferreira, R., Hermelin, B. *et al.* (1995). Recurrent and novel LDL receptor gene mutations causing heterozygous familial hypercholesterolemia in la Habana. *Hum. Genet.*, **96**: 319-322.
  - Pitman, R.C., Carew, T.E., Attie, A.D. *et al.* (1982). Receptor-dependent and receptor-independent degradation of low density lipoprotein in normal rabbits and in receptor-deficient mutant rabbits. *J. Biol. Chem.*, **257**: 7994-8000.
  - Puig, O., Chaves, F.J., García-Sogo, M. *et al.* (1996). A three-allelic polymorphic system in exon 12 of the LDL receptor gene is highly informative for segregation analysis of familial hypercholesterolemia in the Spanish population. *Clin. Genet.*, **50**: 50-53.
  - Pullinger, C. R., Hennessy, L., Chatterton, J. E. *et al.* (1995). Familial Ligand-Defective Apolipoprotein B: Identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity. *J. Clin. Invest.*, **95**: 1225-1234.
  - Rauh, G., Keller, C., Schuster, H. *et al.* (1992). Familial defective apolipoprotein B-100: a common cause of primary hyperlipemia. *Clin. Investig.*, **70**: 77-78.
  - Rodniger, O.K., Leren, T.P., Rosby, O. *et al.* (1993). Haplotype analysis at the low density lipoprotein receptor locus in normal and familial hypercholesterolemia Norwegian subjects. *Clin. Genet.*, **44**: 214-220.
  - Russell, D.W., Scheneider, W.J., Yamamoto, T. *et al.* (1984). Domain map of the LDL receptor sequence homology with the epidermal growth factor precursor. *Cell*, **37**: 577-585.
  - Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatics, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press,.

- 
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**: 5463-5467.
  - Sarkar, G., Yoon, H.S. y Sommer, S.S. (1992). Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphisms (rSSCP): comparison with DNA-SSCP. *Nucleic Acids Res.*, **20**: 871-878.
  - Sass, C., Giroux, L-M., Ma, Y. *et al.* (1995). Evidence for a cholesterol-lowering gene in a french canadian kindred with familial hypercholesterolemia. *Hum. Genet.*, **96**: 21-26.
  - Sheffield, V.C., Beck, J.S., Kwitek, A.E. *et al.* (1993). The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*, **16**: 325-332.
  - Schonfeld, G. (1983). Disorders of lipids transport update. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **26**: 89-108.
  - Schuster, H., Rauh, G., Korman, B. *et al.* (1990). Familial defective apolipoprotein B-100: comparison with familial hypercholesterolemia in 18 cases detected in Munich. *Arteriosclerosis*, **10**: 577-581.
  - Schuster, H., Rauh, G., Müller, S. *et al.* (1992). Allele-specific and asymmetric PCR amplification in combination: a one step protocol for rapid diagnosis of familial defective apo B-100. *Anal. Biochem.*, **204**: 22-25.
  - Slimane, M.N. *et al.* (1993). Phenotypic expression of familial hypercholesterolemia in central and southern Tunisia. *Atherosclerosis*, **104**: 153-158.
  - Smith, J.R., Osborne, T.F., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1990). Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. *J. Biol. Chem.*, **265**: 2306-2310.
  - Soler-Argilaga, C. (1990). Lipoproteínas plasmáticas. Consideraciones fisicoquímicas y metabólicas. En: Hipercolesterolemias: Clínica y tratamiento, 2ª edición. Ed: Carmena, R.. Ediciones Doyma, Barcelona.
  - Soria, L.F., Ludwig, E.H., Pierotti, V.R. *et al.* (1989). Association between a specific apoprotein B mutation and familial defective apo B-100. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86**: 587-591.
  - Soutar, A.K. y Knigh, B.L. (1990). Structure and regulation of the LDL-receptor and its gene. *British Medical Bulletin*, **46**: 891-916.
  - Soutar, A.K. (1991). A polymorphism in exon 2 of the human LDL-receptor gene (LDLR). *Nucleic Acids Res.*, **19**: 4314.
  - Starzl, T.E., Bilheimer, D.W., Bahnson, H.T. *et al.* (1984). Heart-liver transplantation in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Lancet*, **1**: 1382-1400.
  - Steinberg, D. (1987). Pathogenesis and prevention. En: Hypercholesterolemia and Atherosclerosis. Ed: Steimberg, D. y Olesfsky, J.M. Amsterdam: Elsevier, pp: 5-23.

- 
- Stoffel, W., Borbeg, B. y Greve, V. (1981). Application of specific extracorporeal removal of low density lipoprotein in familial hypercholesterolemia. *Lancet*, **2**: 1005-1007.
  - Stoppa-Lyonnet, F., Carter, P.E., Meo, T. y Tosi, M. (1990). Clusters of intragenic Alu repeats predispose the human C1 inhibitor locus to deleterious rearrangements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 1511.
  - Stone, N.J., Levy, R.I., Fredrickson, D.S. y Verter, J. (1974). Coronary artery disease in 116 kindreds with familial type II hyperlipoproteinemia. *Circulation*, **49**: 476-488.
  - Streja, D., Steiner, G. y Kwiterowich, P.O. (1978). Plasma high density lipoprotein and other lipids and lipoproteins and ischemic heart disease in a large Newfoundland pedigree with familial hypercholesterolemia. *Ann. Intern. Med.*, **87**: 871-880.
  - Sugre, D.D., Thompson, G.R., Oakley, C.M. *et al.* (1981). Contrasting patterns of coronary atherosclerosis in normocholesterolemic smokers and patients with familial hypercholesterolemia. *Br. Med. J.*, **283**: 1358-1360.
  - Südorf, T.C., Goldstein, J.L., Brown, M.S. y Russell, D.W. (1985). The LDL receptor gene: A mosaic of exons shared with different proteins. *Science*, **228**: 815-822.
  - Südorf, T.C., Van Der Westhuyzen, R., Goldstein, J.L. *et al.* (1987). Three direct repeats and a TATA-like sequence are required for regulated expression of the human low density lipoprotein receptor gene. *J. Biol. Chem.*, **262**: 10773-10779.
  - Sun, X.M., Webb, J.C., Gudnason, V. *et al.* (1992). Characterization of deletions in the LDL receptor gene in patients with familial hypercholesterolemia in the united kingdom. *Arterioscler. Thromb.*, **12**: 762-770.
  - Sun, X.M., Patel, D.D., Webb, J.C. *et al.* (1994). Familial hypercholesterolemia in China. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, **14**: 85-94.
  - Sun, X.M., Patel, D.D., Bhatnagar, D. *et al.* (1995). Characterization of a splice mutation in the gene for the LDL receptor associated with a unpredictably severe clinical phenotype in English patients with heterozygous FH. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **15**: 219-227.
  - Taylor, R., Jeenah, M., Seed, M. y Humphries, S. (1988). Four DNA polymorphisms in the LDL receptor gene: their genetic relationship and use in the study of variation at the LDL receptor locus. *J. Med. Genet.*, **25**: 653-659.
  - Taylor, R., Bryant, J., Gudnanson, V., *et al.* (1989). A study of familial hypercholesterolemia in Iceland using RFLPs. *J. Med. Genet.*, **26**: 494-498.
  - Tikkanen, M. y Heliö, T. (1992). Genetics variants of apolipoprotein B: relation to serum lipid levels and coronary artery disease among the Finns. *Ann. Med.*, **24**: 357-361.
  - Tilzer, L.L., Thomas, S.M. y Moreno, R.F. (1989). Use of silica gel polymer for DNA extraction with organic solvents. *Anal. Biochem.*, **183**: 13-15.
  - Tolleshaug, H., Goldstein, J.L., Shneider, W.J. y Brown, M.S. (1982). Posttranscriptional processing of the LDL receptor and its genetic disruption in familial hypercholesterolemia. *Cell*, **30**: 715.
-



- 
- Tolleshaug, H., Hobgood, H.K., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1983). The LDL receptor locus in familial hypercholesterolaemia: multiple mutations disrupt transport and processing of a membrane receptor. *Cell.*, 32: 941-951.
  - Tybjaerg-Hansen, A., Gallagher, J., Chang, J.C. *et al.* (1989). Screening of the Apo-B (Arg350(Gln) mutation. *Atherosclerosis*, 80: 235-242.
  - Van Driel, I.R., Davis, C.F., Goldstein, J.L. *et al.* (1987). Self-association of the low density lipoprotein receptor mediated by the cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.*, 262: 16127-16134.
  - Vega, G.L. y Grundig, S.M. (1992). Occurrence of several species of low density lipoprotein with defective clearance in patients with primary moderate hypercholesterolemia. *J. Intern. Med.*, 232: 405-413.
  - Voss, H., Schwager, C., Wirkner, U. *et al.* (1991). A new procedure for automated DNA sequencing with multiple internal labelling by fluorescent dUTP. *Methods Mol. Cell. Biol.*, 3: 30-34.
  - Walker, J.F. y Tobert, J.A. (1985). The clinical efficacy and safety of lovastatin and MK-733. An overview. *Eur. Heart J.*, 8: 93-96.
  - Webb, J.C., Sun, X-M., Patel, D.D. *et al.* (1992). Characterization of two new point mutations in the low density lipoprotein receptor genes of an English patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J. Lipid. Res.*, 33: 689.
  - Weisgraber, K.H., Innerarity, T.L. y Mahley, R.W. (1978). Role of the lysine residues of plasma lipoproteins in high affinity binding to cell surface receptors on human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 253: 9053-9062.
  - Weisgraber, K.H., Innerarity, T.L., Newhouse, H.M. *et al.* (1988). Familial defective apolipoprotein B-100: enhanced binding of monoclonal antibody MB47 to abnormal low density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85: 9758-9762.
  - Wiemann, S., Rupp, T., Zimmermann, H. *et al.* (1995). Primer design for automated DNA sequencing utilizing T7 DNA polymerase and internal labeling with fluorescein-15-dATP. *Biotechniques*, 18: 688-697.
  - Williams, R.P., Hunt, S.C., Schumacher, M.C. *et al.* (1988). Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *Am. J. Cardiol.*, 72: 171-176.
  - Williams, R.P., Schumacher, M.C., Garlow, G.K. *et al.* (1993). Documented need for more effective diagnosis and treatment of hypercholesterolemia according to data from 502 heterozygotes in Utah. *Am. J. Cardiol.*, 72: 18D-24-D.
  - Wilson, J.M. y Grossman, M. (1993). Therapeutic strategies for familial hypercholesterolemia based on somatic gene transfer. *Am. J. Cardiol.*, 72: 59D-63D.
  - Wilson, J.M. y Chowdhury, J.R. (1990). Prospects for gene therapy of familial hypercholesterolemia. *Mol. Biol. Med.*, 7: 223-230.

- Windler, E., Chao, Y-S. y Havel, R.J. (1980). Regulation of hepatic uptake of triglyceride rich lipoproteins in the rat. Opposite effects of homologous apolipoprotein E and individual C apoproteins. *J. Mol. Chem.*, **255**: 8303-8307.

- Yamakawa, K., Yanagi, H., Saku, K. *et al.* (1991). Family studies of the LDL receptor gene of relatively severe hereditary hypercholesterolemia associated with Achilles tendon xanthomas. *Hum. Genet.*, **86**: 445-449.

- Yamakawa-Kobayashi, K., Kobayashi, T., Obara, T. y Hamaguchi, H. (1993). Four new nucleotide sequence polymorphisms in the LDL receptor gene detected by SSCP analysis. *Hum. Genet.*, **92**: 76-78.

- Yamamoto, T., Davis, C.G., Brown, M.S. *et al.* (1984). The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell*, **39**: 27-38.

- Yokode, M., Pathak, R.K. Hammer, R.E. *et al.* (1992). Cytoplasmic sequence required for basolateral targeting of LDL receptor in livers of transgenic mice. *J. Cell. Biol.*, **117**: 39-46.

- Yokoyama, C., Wang, X., Briggs, M.R. *et al.* (1993). SERBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*, **75**: 187-197.

- Zimmerman, J., Voss, H., Erfle, H. *et al.* (1992). Cycle sequencing protocol with fluorescein-12-dUTP for M13, plasmid and cosmid DNA. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, **3**: 146-148.









Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha, acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de

D. F. Jancs Chaves Martínez  
la calificación de Apto cum laude

Valencia, a 10 de Noviembre de 1976

El Secretario,

El Presidente

*Clamene*

*[Signature]*



