



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**MECANISMOS PATOGENICOS DE LAS
MUTACIONES EN EL GEN *NF1*:
BASES MOLECULARES Y CELULARES**

TESIS DOCTORAL

Elisabete Hernández Imaz

Madrid, 2013

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**MECANISMOS PATOGÉNICOS DE LAS
MUTACIONES EN EL GEN *NF1*:
BASES MOLECULARES Y CELULARES**

Memoria que presenta
Elisabete Hernández Imaz,
Licenciada en Biología y Bioquímica,
para optar al título de doctor

Directoras de Tesis

Dra. Yolanda Martín Santodomingo
Dra. Concepción Hernández-Chico
Servicio de Genética
Hospital Universitario Ramón y Cajal

Servicio de Genética
Hospital Universitario Ramón y Cajal
Madrid, 2013

La Tesis titulada “Mecanismos patogénicos de las mutaciones en el gen *NFI*: bases moleculares y celulares”, ha sido realizada en el Servicio de Genética del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid, por Dña. Elisabete Hernández Imaz, bajo la dirección de las Dras. Yolanda Martín Santo Domingo y Concepción Hernández Chico.

Como Directoras, expresamos nuestra conformidad para la presentación de la misma, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometida a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.



Dra. Yolanda Martín Santo Domingo



Dra. Concepción Hernández Chico

Servicio de Genética
Hospital Universitario Ramón y Cajal
Madrid



Vº Bº tutor: Dra. Isabel Varela Nieto

Profesora de Investigación
Departamento de Fisiopatología Endocrina y del Sistema Nervioso
Universidad Autónoma de Madrid

AGRADECIMIENTOS

Finalmente, ha llegado el momento de dar las gracias a todas aquellas personas que de una u otra forma han contribuido al desarrollo de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, quería agradecer a Concha la oportunidad que me ofreció de comenzar mi carrera investigadora en su grupo. Gracias por la confianza depositada en mí y por estos años de intenso aprendizaje. A Yolanda, codirectora de esta Tesis, que me enseñó con paciencia y dedicación a desenvolverme en el laboratorio y que me ha ayudado a superar todos los obstáculos y seguir adelante. A ambas, quería agradeceros sinceramente el gran esfuerzo que habéis hecho estos últimos meses para que la defensa de esta Tesis pudiera celebrarse en diciembre. Gracias por vuestra determinación y compromiso.

Dar las gracias a Ana y a Nati. A ti Ana, por tu forma de ser, tu sinceridad y tu buena disposición a ayudarme en lo que necesitara. A ti Nati, por ser como una madre para mí dentro del laboratorio y por el infinito cariño que me has mostrado.

También quería darte las gracias Matías, por tu inestimable ayuda en todo lo referente a la construcción de minigenes y cultivos celulares.

Muchas gracias Lolo, por tu paciencia, por todas las explicaciones que me has dado sobre el DHPLC y por facilitarme el trabajo cuando más lo necesitaba.

Gracias a José Luis por enseñarme que aún hoy día se puede trabajar en MS-DOS. Dar las gracias también a Ignacio, porque las veces que he necesitado tu ayuda no has dudado en ofrecérmela. Y a Francisco, por tu optimismo y generosidad, y porque siempre tienes una palabra de ánimo para todos.

Gracias a todos los compañeros del ICGEB en Trieste. En especial al Prof. F. E. Baralle que aceptó acogerme en dos ocasiones en su grupo de investigación, a Marco, que día a día siguió la evolución de mi trabajo y me aconsejó en los pasos a seguir y a Laura, que de forma totalmente desinteresada se volcó en ayudarme para que pudiera sacar adelante el trabajo que allí realicé.

No querría olvidarme de Felipe, que durante más de 30 años dirigió la Unidad de Genética Molecular y que es responsable de haberla convertido en lo que hoy es. Muchísimas gracias también, a Miguel Ángel, que recientemente ha tomado las riendas y que, no dudo, conseguirá convertir este Servicio en un centro de referencia de la Genética. En lo personal, muchas gracias por tus consejos y tu apoyo y por todas las comidas que hemos compartido en la cafetería.

A todos los compañeros de trabajo, pasillo, cocina, hospital..., que habéis pasado o seguís por aquí: Germán, M^a José, María D., Gema, Tamara, Luciana, Laura, Elena, Lucía, Alba, David, Juanma, Leti, Anouska, Eric, Carmen, Amaia, Helena, Ángeles, Fernando, Montse, Manuela, Romina, Silvia, Luis, Milagros, Maria I., Cristina, Gloria, Antonio, Rosa, Merche, Bea, Marta C., M^a Ángeles, Susana... Ha sido fantástico teneros como compañeros.

A Marta y a Fran. Os he echado mucho de menos desde que os fuisteis del laboratorio, pero a pesar de la distancia, sé que siempre estaréis ahí. Ha sido una suerte encontraros.

A mis “flowers” de Donosti, porque a pesar de vivir lejos, siempre me mostráis que sigo estando de alguna manera con vosotras. Maite zaituztet!

A mis amigos de Madrid, por todos los buenos momentos vividos estos últimos siete años.

A mi familia política, por hacerme sentir como en casa en tierras toledanas.

A Pablo, que me conoces mejor que nadie, por compartir conmigo los momentos duros y las alegrías durante este tiempo. Llevamos 8 años juntos y creo que quiero estar contigo 80 años más.

A mi hermana María, porque te quiero como a nada en el mundo. Porque a pesar de llevarte dos años, tu forma de ser y de vivir tu vida me sirven de ejemplo para vivir la mía.

Y finalmente, a mis aitas, a quienes dedico con todo mi amor esta Tesis Doctoral. Me faltan palabras para expresar mi agradecimiento por todo lo que me habéis dado a lo largo de los años. Saber que os sentís orgullosos de mí, me hace la persona más feliz del mundo.

Resumen

RESUMEN

La Neurofibromatosis tipo 1 (NF1) es una enfermedad de herencia autosómica dominante con una incidencia de 1/3500 recién nacidos. Se trata de un síndrome neurocutáneo caracterizado por una expresividad muy variable y un riesgo aumentado de desarrollar tumores. La NF1 está causada por mutaciones en el gen *NF1* localizado en la región cromosómica 17q11.2, que codifica la neurofibromina, una proteína que regula negativamente la actividad del oncogén Ras.

En este trabajo, presentamos un protocolo para el diagnóstico genético-molecular de la enfermedad, basado en el análisis del ADNg y ADNc. Este protocolo presenta una especificidad del 100% y una sensibilidad del 95%. Además, para progresar en el conocimiento de las bases genéticas de la enfermedad, hemos desarrollado diferentes estudios relativos a tres tipos de mutaciones: microdeleciones tipo 1, deleciones/duplicaciones intragénicas y mutaciones de *splicing*.

Las microdeleciones tipo 1 ocurren por recombinación homóloga desigual entre las secuencias parálogas NF1-REPa y NF1-REPc. Hemos encontrado que los cromosomas “no deletados” de los pacientes con microdelección tipo 1 presentan un haplotipo mayoritario. Dicho haplotipo está constituido por cinco SNPs localizados en los tres genes distales de la región NF1-REPa - NF1-REPc. Postulamos un modelo para explicar la asociación entre dicho haplotipo y la característica “no recombinogénica” de los cromosomas investigados.

Por otro lado, hemos identificado 18 alelos con variación en el número de copias –CNVs- intragénicas y hemos caracterizado a nivel de secuencia nueve de dichas deleciones y una duplicación. El análisis *in silico* de los puntos de rotura nos ha permitido elaborar un modelo para la formación de varias CNVs. Encontramos que los mecanismos de reparación replicativos son los más frecuentes. Además, hemos identificado diferentes elementos de secuencia implicados en la recombinación.

Para el estudio de las mutaciones de *splicing* hemos realizado diferentes aproximaciones. Evaluamos la utilidad de varios programas *in silico* para predecir la naturaleza y el efecto sobre el *splicing* de diferentes cambios puntuales. Además, utilizando minigenes y ensayos *in vitro* hemos realizado estudios funcionales de las mutaciones para definir los motivos de secuencia (*splicing regulatory elements*, SRE) y las proteínas, que regulan el *splicing* de los exones 7 y 37.

Los resultados de estos estudios no se limitan a la Neurofibromatosis tipo 1, pues tienen validez y utilidad para entender otras enfermedades genéticas.

SUMMARY

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is an autosomal dominant disease with an incidence of 1/3500 live births. Being classified as a neurocutaneous syndrome, it is characterized by a variable expression and an increased risk of developing tumours. NF1 is caused by mutations in the *NF1* gene, located in the chromosomal region 17q11.2, which encodes the neurofibromin, a protein that functions as a negative regulator of the Ras oncogene.

In this work, we present a molecular protocol for the genetic diagnosis of the disease, based on the analysis of gDNA and cDNA. This protocol presents a specificity of 100% and a sensitivity of 95%. Furthermore, in order to progress in the knowledge of the genetic basis of the disease, we have focused on the study of three different mutation types: type 1 microdeletions, intragenic deletions/duplications and *splicing* mutations.

Type 1 microdeletions occur by non-allelic homologous recombination between NF1-REPa and NF1-REPC paralog sequences. We have found a major haplotype in the “non-deleted” chromosomes of the patients. This haplotype is constituted by five SNPs localized in the three more distal genes of the NF1-REPa - NF1-REPC region. We postulate a model to explain the association between this haplotype and the “non-recombinogenic” feature of the investigated chromosomes.

On the other hand, we have identified 18 alleles carrying intragenic copy number variations –CNVs- and we have characterized nine of these deletions and a duplication at sequence level. We have performed a thorough *in silico* analysis to establish the putative mechanism underlying their formation. We have found that replicative-based repair mechanisms are the most frequent. Besides, we have identified several sequence elements involved in the recombination.

For the analysis of splicing mutations we have conducted different approaches. We have evaluated the usefulness of *in silico* tools to predict the nature and effect of different point mutations on splicing. Besides, using a minigene system and *in vitro* experiments we have carried out functional studies of the mutations to define sequence motifs (splicing regulatory elements, SRE) and proteins that regulate the splicing of exons 7 and 37.

The results of these studies are not limited to Neurofibromatosis type 1, but are also valuable to understand other genetic diseases.

Índice

ABREVIATURAS	V
INTRODUCCIÓN	1
1. Neurofibromatosis tipo 1: aspectos generales	3
<i>1.1 Manifestaciones clínicas de la Neurofibromatosis tipo 1</i>	3
<i>1.2 El gen NF1</i>	5
<i>1.3 La neurofibromina</i>	5
<i>1.4 Desarrollo tumoral en la Neurofibromatosis tipo 1</i>	7
2. Mutaciones en el gen NF1 causantes de la enfermedad	8
<i>2.1 Espectro mutacional</i>	8
<i>2.2 Análisis mutacional</i>	9
<i>2.3 Arquitectura de la región cromosómica 17q11.2 y microdeleciones del locus NF1</i>	10
<i>2.4 Deleciones y duplicaciones intragénicas en NF1</i>	13
<i>2.5 Mutaciones de splicing</i>	14
3. Correlación genotipo-fenotipo	18
OBJETIVOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	25
1. Análisis mutacional	27
<i>1.1 Sujetos</i>	27
<i>1.2 Análisis de la variación en el número de copias del gen NF1</i>	27
<i>1.3 Análisis mutacional del ADNc</i>	28
2. Análisis de las microdeleciones en el locus NF1	30
<i>2.1 Caracterización de las microdeleciones</i>	30
<i>2.1.1 Análisis de segregación</i>	30
<i>2.1.2 Array-CGH</i>	31
<i>2.1.3 Estudio de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en la región NF1</i>	31
2.1.3.1 Sujetos.....	31
2.1.3.2 Selección de SNPs en la región de microdeleción.....	31
2.1.3.3 Análisis por sondas TaqMan.....	33
2.1.3.4 Reconstrucción de haplotipos.....	33
3. Deleciones y duplicaciones intragénicas	34

3.1 Caracterización de los puntos de rotura.....	34
3.2 Búsqueda de motivos recombinogénicos.....	36
4. Estudio de las mutaciones de <i>splicing</i>	37
4.1 Análisis <i>in silico</i>	37
4.2 Construcción de minigenes.....	38
4.3 Mutagénesis dirigida.....	39
4.4 Transfección en células HeLa, extracción de ARN y análisis de transcritos	42
4.5 Preparación de sondas de ARN y pull-down de proteínas nucleares.....	43
4.6 Western-Blot.....	46
4.7 Ensayo de retardo en la movilidad electroforética (EMSA).....	46
4.8 Análisis cuantitativo de la doble mutación <i>c.[6792C>A;c.6799C>T]</i>	47
RESULTADOS	49
1. Análisis mutacional.....	51
2. Estudio de microdeleciones.....	53
2.1 Caracterización de las microdeleciones <i>NF1</i>	53
2.2 Origen parental del cromosoma en el que se produce la deleción	56
2.3 Análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNP) en la región cromosómica 17q11.2 delimitada por las secuencias <i>NF1-REPa</i> y <i>NF1-REPc</i>	56
3. Variaciones en el número de copias intragénicas.....	60
3.1 Caracterización de deleciones y duplicaciones intragénicas.....	60
3.2 Caracterización de los puntos de rotura de las deleciones/duplicaciones intragénicas.....	62
3.3 Mosaicismo en las CNV intragénicas.....	65
3.4 Análisis bioinformático de los puntos de rotura.....	67
3.4.1 Elementos repetitivos.....	67
3.4.2 Microhomologías.....	68
3.4.3 Estructuras no-B del ADN.....	69
3.4.4 Motivos de secuencia recombinogénicos.....	70
4. Mutaciones de <i>splicing</i>	73
4.1 Caracterización de las mutaciones de <i>splicing</i>	73
4.2 Análisis <i>in silico</i> de las mutaciones de <i>splicing</i>	77
4.3 Análisis funcional de mutaciones tipo <i>V</i>	83
4.3.1 Estudio funcional de las mutaciones en el exón 7.....	84

4.3.1.1 Construcción del minigen E7-pSPL3 para el análisis de las mutaciones tipo V.....	85
4.3.1.2 Definición de los elementos reguladores presentes en el exón 7.....	86
4.3.1.3 Estudios de sobreexpresión de proteínas SR.....	88
4.3.1.4 Análisis de la unión diferencial de las proteínas SR a secuencias silvestres y mutantes del exón 7.....	90
4.3.1.5 Caracterización del elemento ESS en el exón 7 creado por la mutación c.1007G>A.....	91
4.3.2 <i>Estudio funcional de las mutaciones en el exón 37</i>	91
4.3.2.1 Efecto de la doble mutación c.[6792C>A;c.6799C>T] sobre el procesamiento del pre-ARNm.....	92
4.3.2.2 Caracterización de un nuevo elemento ESE en el exón 37 e identificación de proteínas del espliceosoma implicadas.....	94
DISCUSIÓN	97
1. Protocolo genético para el diagnóstico molecular de la NF1	99
2. Estudio de las microdeleciones	101
2.1 <i>Caracterización de las microdeleciones</i>	101
2.2 <i>Identificación de un haplotipo “no recombinogénico” en la región de la microdelección NF1</i>	101
3. Caracterización de CNV intragénicas	102
3.1 <i>Potenciales mecanismos moleculares que median las CNV intragénicas</i>	103
3.2 <i>La arquitectura genómica favorece la formación de CNVs</i>	107
4. Estudio funcional de las mutaciones de <i>splicing</i> que afectan a SREs	108
CONCLUSIONES	115
BIBLIOGRAFÍA	119
ARTÍCULOS	141

Abreviaturas

ADAP2	<i>ArfGAP with dual PH domains 2 gene</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
AME	Atrofia muscular espinal
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATAD5	<i>ATPase family, AAA domain containing member 5 gene</i>
C17orf42	<i>TEFM (transcription elongation factor, mitochondrial) gene</i>
C17orf79	<i>COPRS (Coordinator of PRMT5, differentiation stimulator) gene</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A gene</i>
cen	Centrómero
CERES	<i>Composite exonic regulatory element of splicing</i>
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene</i>
CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i>
CNV	<i>Copy number variation</i>
CRLF3	<i>Cytokine receptor-like factor 3 gene</i>
DHPLC	<i>Denaturing high performance liquid chromatography</i>
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
ESE	<i>Exonic splicing enhancer</i>
ESS	<i>Exonic splicing silencer</i>
EVI2A	<i>Ecotropic viral integration site 2A gene</i>
EVI2B	<i>Ecotropic viral integration site 2B gene</i>
FAM	Carboxifluoresceína
FL	<i>Full-length</i>
FoSTeS	<i>Fork stalling and template switching</i>
GRD	<i>GAP-related domain</i>
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
HGMD	<i>Human Genome Mutation Database</i>
hnRNP	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>

Abreviaturas

ISE	<i>Intronic splicing enhancer</i>
ISS	<i>Intronic splicing silencer</i>
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LCR	<i>Low copy repeat</i>
LINE	<i>Long interspread repeated DNA</i>
<i>LRRC37B</i>	<i>Leucine rich repeat containing 37B gene</i>
<i>MAPT</i>	<i>Microtubule-associated protein tau gene</i>
Mb	Megabase
MEPS	<i>Minimal efficient processing segments</i>
MIM	<i>Mendelian Inheritance in Man</i>
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MMBIR	<i>Microhomology-mediated brake induced replication</i>
MMEJ	<i>Microhomology-mediated end joining</i>
MPNST	<i>Malignant Peripheral Nerve Seath Tumor</i>
NAHR	<i>Non-allelic homologous recombination</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NTP	Nucleótido trifosfato
<i>OMG</i>	<i>Oligodendrocyte myelin glycoprotein gene</i>
pb	par de bases
PRS	<i>Paralog recombination site</i>
<i>RAB11FIP4</i>	<i>RAB11 family interacting protein 4 (class II) gene</i>
<i>Ras</i>	<i>Rat sarcoma viral oncogene homolog gene</i>
<i>RB-1</i>	<i>Retinoblastoma 1 gene</i>
<i>RNF135</i>	<i>Ring finger protein 135 gene</i>
RPA	Relative peak area
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SINE	<i>Short interspread repeated DNA</i>
SK	<i>Skipping</i>

SMN	<i>Survival motor neuron</i>
snRNA	<i>Small nuclear ribonucleic acid</i>
SR	<i>Serin-arginin rich</i>
SRE	<i>Splicing regulatory element</i>
SRS	<i>Serial replication slippage</i>
SUZ12	<i>SUZ12 polycomb repressive complex 2 subunit gene</i>
SUZ12P	<i>SUZ12P1 supressor of zeste 12 homolog pseudogene 1</i>
TDP-43	<i>TAR DNA binding protein</i>
tel	Telómero
TP53	<i>Tumor protein p53 gene</i>
UTP6	<i>Small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast) gene</i>
UTR	Región no traducida (<i>Untranslated region</i>)
WT	Alelo/minigen silvestre

Aclaración terminológica: en este trabajo nos hemos permitido una pequeña licencia terminológica al utilizar términos en inglés tales como *splicing*, *skipping* y *full-length*. Todos los términos en inglés aparecerán en el texto en cursiva.

Introducción

1. Neurofibromatosis tipo 1: aspectos generales

La Neurofibromatosis tipo 1 (NF1; MIM 162200) es una enfermedad de herencia autosómica dominante con una incidencia de 1/3500 recién nacidos (Huson *et al.*, 1989). Siendo una enfermedad hereditaria, aproximadamente el 50% de los casos son esporádicos. Este trastorno se incluye dentro del grupo de síndromes neurocutáneos por la asociación de las alteraciones neurológicas y cutáneas, si bien puede considerarse una enfermedad multisistémica, ya que también afecta a otros órganos o tejidos.

1.1 Manifestaciones clínicas de la Neurofibromatosis tipo 1

Principalmente se caracteriza por manchas café con leche, pecas inguinales y/o axilares, neurofibromas cutáneos, subcutáneos y/o plexiformes, nódulos de Lisch, gliomas ópticos y lesiones óseas específicas (Riccardi, 1992; Huson, 1994). Además, alrededor de un 50% de los pacientes presentan dificultad de aprendizaje o retraso mental. Se estima que los pacientes con NF1 presentan una esperanza de vida reducida en 15 años (Zoller *et al.*, 1995; Rasmussen *et al.*, 2001).

Frecuentemente, las **manchas café con leche** son el primer signo clínico que se presenta ya que pueden encontrarse en el recién nacido y aumentar en número en los primeros años de vida. Prácticamente todos los pacientes con NF1 muestran múltiples manchas, y las pecas axilares y/o inguinales aparecen en el 90% de los casos (Jett and Friedman, 2010).

Los **neurofibromas** son tumores complejos característicos de la NF1 y pueden ser cutáneos, subcutáneos o plexiformes. Los neurofibromas cutáneos y subcutáneos crecen alrededor de un único nervio periférico. Aparecen principalmente durante la pubertad y aumentan en número con la edad y también durante el embarazo (Roth *et al.*, 2008). Son tumores benignos que no malignizan. Los neurofibromas plexiformes son tumores difusos que crecen envolviendo plexos neurales localizados en regiones internas (Ferner *et al.*, 2007). En general, presentan un desarrollo lento aunque durante la infancia temprana pueden mostrar un rápido crecimiento (Mautner *et al.*, 2007; Tucker *et al.*, 2009). Estos neurofibromas aumentan la morbilidad ya que pueden comprometer otros órganos o sistemas. También pueden ser el origen de tumores malignos de la vaina de los nervios periféricos (*Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor*, MPNST) que son la principal causa de mortalidad y ocurren en el 8-13% de los

pacientes (Evans *et al.*, 2002). Además, los pacientes con NF1 tienen un mayor riesgo de padecer otro tipo de cánceres. La leucemia mielomonocítica juvenil es una condición rara, pero mucho más frecuente en pacientes con NF1 (Jett and Friedman, 2010). También se ha demostrado que las mujeres con NF1 tienen un riesgo cinco veces mayor de desarrollar cáncer de mama antes de los 50 años (Sharif *et al.*, 2007). Los feocromocitomas son también más frecuentes en la NF1 y aparecen en el 2% de los pacientes (Bausch *et al.*, 2006).

Respecto al resto de signos clínicos de la NF1, los **nódulos de Lisch** son hamartomas del iris. A pesar de ser asintomáticos, son importantes para el diagnóstico de la enfermedad, porque aparecen en más del 90% de los pacientes mayores de 16 años (Huson, 1987). Los **gliomas del nervio óptico** son astrocitomas pilocíticos que junto con los neurofibromas son los neoplasmas más frecuentes en la NF1 (Listernick *et al.*, 1999; Kreusel, 2005). Los gliomas ópticos aparecen en los primeros años de vida en el 15% de los niños afectados y, generalmente, son asintomáticos (Listernick *et al.*, 1997). Las **alteraciones óseas** características de la NF1 son las displasias de los huesos largos, como la pseudoartrosis de la tibia y la displasia del esfenoides, que aparecen en el 1-4% de los casos (Alwan *et al.*, 2005). También es frecuente la escoliosis que ocurre en el 10-26% de los pacientes. Por último, alrededor del 50% de los pacientes con NF1 presentan **dificultad de aprendizaje** (North *et al.*, 1997; Hyman *et al.*, 2006; Watt *et al.*, 2008) que persiste en la edad adulta. El retraso mental es menos frecuente y rara vez es profundo.

La variable expresión de la enfermedad, en ocasiones, complica su diagnóstico clínico, principalmente en los primeros años de vida. Los criterios diagnósticos para la NF1 se establecieron en 1988, en una conferencia del NIH (*National Institute of Health Consensus Development Conference*) (Tabla 1). Siguiendo estas indicaciones, un paciente con diagnóstico de NF1 debe presentar al menos dos de dichos criterios.

Tabla 1: Criterios diagnósticos de la Neurofibromatosis tipo 1

1. Seis o más manchas café con leche mayores de 5 mm de diámetro antes de la pubertad o más de 15 mm en la edad adulta.
2. Dos o más neurofibromas de cualquier tipo o un neurofibroma plexiforme.
3. Pecas axilares y/o inguinales.
4. Dos o más nódulos de Lisch.
5. Glioma del nervio óptico.
6. Una lesión ósea distintiva (displasia del esfenoides o estrechamiento de la corteza de los huesos largos con o sin pseudoartrosis).
7. Un familiar de primer grado afectado de NF1.

1.2 El gen *NF1*

La NF1 está causada por mutaciones en el gen *NF1* que fue identificado por clonación posicional en 1990 (Cawthon *et al.*, 1990; Viskochil *et al.*, 1990; Wallace *et al.*, 1990). Inicialmente, se acotó el *locus* responsable de la enfermedad gracias a estudios de ligamiento en familias con NF1 (Fain *et al.*, 1987; Seizinger *et al.*, 1987) y posteriormente, el análisis de dos pacientes que portaban translocaciones balanceadas, t(1;17) y t(17;22), permitió estrechar el intervalo a la citobanda q11.2 del cromosoma 17, para, finalmente, identificar el gen causante de la enfermedad.

El gen tiene un tamaño de aproximadamente 335 Kb de ADN_g y comprende 57 exones constitutivos y tres exones con *splicing* alternativo dependiente de tejido: el exón 9br que se expresa de forma exclusiva en el sistema nervioso central (Danglot *et al.*, 1995), el exón 23a que se incluye en todos los tejidos salvo en tejido neural (Andersen *et al.*, 1993) y el exón 48a que se expresa mayoritariamente en tejido muscular (Gutman *et al.*, 1993). El gen *NF1* se transcribe en dirección centrómero-telómero produciendo un transcrito mayoritario de unas 12,4 Kb. El intrón 27b del gen, que se expande más de 60 Kb, contiene 3 genes que se transcriben en sentido contrario a *NF1*: *OMG*, *EVI2B* y *EVI2A* (Cawthon *et al.*, 1991; Viskochil *et al.*, 1991). El gen *OMG* codifica una proteína (*oligodendrocyte-myelin glycoprotein*) que se expresa en neuronas y oligodendrocitos del sistema nervioso central. Esta proteína está implicada en la inhibición del sobrecrecimiento de neuritas (Wang *et al.*, 2002) y en la plasticidad sináptica (Raiker *et al.*, 2010). La función de los genes *EVI2A* y *EVI2B* (*ecotropic viral integration site 2A* y *2B*) es menos conocida, aunque sus homólogos en ratón, *Evi-2A* y *Evi-2B*, están implicados en tumores mieloides inducidos por retrovirus y, por tanto, se ha sugerido que podrían funcionar como oncogenes (Cawthon *et al.*, 1991; Kaufmann *et al.*, 1999). Por otro lado, existen diversos pseudogenes de *NF1* en los cromosomas 2, 14, 15, 18, 21 y 22, que muestran una alta homología de secuencia (Marchuk *et al.*, 1992; Purandare *et al.*, 1995; Cummings *et al.*, 1996; Kehrer-Sawatzki *et al.*, 1997; Luijten *et al.*, 2001).

1.3 La neurofibromina

El gen *NF1* codifica la neurofibromina, un polipéptido de 2818 aminoácidos con un peso molecular de 320 kDa. En adultos se expresa de forma ubicua, aunque su

expresión es mayor en algunos tipos celulares del sistema nervioso como neuronas, oligodendrocitos y células de Schwann no mielinizantes (Daston *et al.*, 1992). En la neurofibromina se distinguen varios dominios funcionales (Figura 1). El dominio GRD (*GAP-related domain*) de 360 aminoácidos, es el mejor caracterizado de la neurofibromina. Está localizado en la región central de la proteína y presenta similitudes estructurales y funcionales con la familia de proteínas activadoras de GTPasa (GAP) (Ballester *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 1990). A través del dominio GRD, la neurofibromina regula negativamente la actividad GTPasa de Ras, favoreciendo la forma inactiva –Ras unido a GDP- en detrimento de la forma activa –Ras unido a GTP- (Figura 2). Por lo tanto, la existencia de una mutación en *NF1* comporta una disminución de neurofibromina que a su vez produce un aumento de la forma activa de Ras, alterando diversas cascadas de señalización que regulan diferentes procesos celulares como son la supervivencia, la proliferación y la diferenciación. Por todo lo anterior, se dice que la neurofibromina es un supresor de tumores.

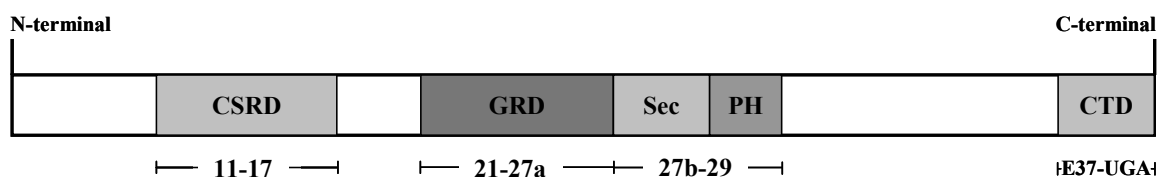


Figura 1: Dominios de la neurofibromina. Debajo se indican los exones que conforman cada uno de los dominios. *CSRD*: Cystein-serin rich domain; *GRD*: Gap-related domain; *Sec*: Sec-14; *PH*: Plekstrin homology domain; *CTD*: dominio C-terminal.

El resto de dominios de dicha proteína no están tan bien caracterizados. Se cree que el módulo NF1-Sec-PH está implicado en el transporte de lípidos entre diferentes compartimentos celulares (D'Angelo *et al.*, 2006; Welti *et al.*, 2007). Por otro lado, el dominio CSRD (*cystein-serine rich domain*), localizado en la región N-terminal de la proteína, parece regular alostéricamente la actividad de GRD (Mangoura *et al.*, 2006). El dominio CTD (*C-terminal domain*) contiene una secuencia de localización nuclear que promueve el transporte de la neurofibromina entre el citoplasma y el núcleo, aunque la función biológica de este transporte es aún desconocida (Vandenbroucke *et al.*, 2004a).

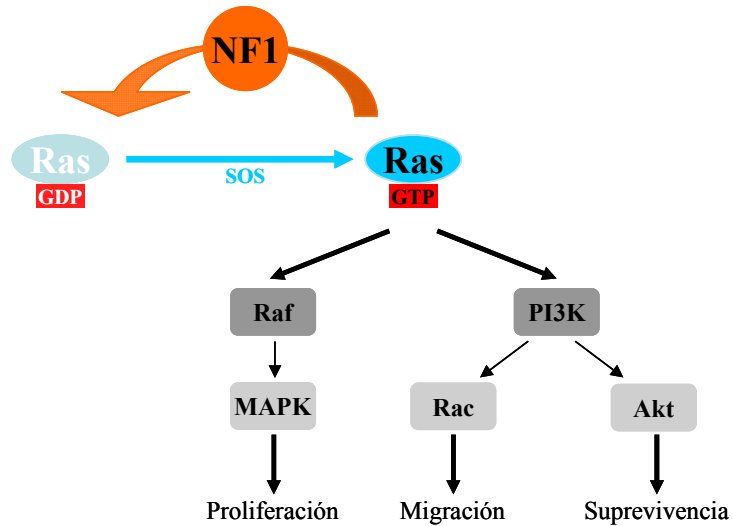


Figura 2: Función de la neurofibromina regulando de la actividad de Ras.

Además, sabemos que la neurofibromina interacciona con otras proteínas tales como la tubulina (Bollag *et al.*, 1993), las proteínas de la familia sindecan (Hsueh *et al.*, 2001) y la caveolina (Boyanapalli *et al.*, 2006), entre otras; no obstante, el significado biológico de dichas interacciones es aún poco conocido.

1.4 Desarrollo tumoral en la Neurofibromatosis tipo 1

El desarrollo tumoral en la NF1 se ajusta al modelo del doble golpe postulado por Knudson para explicar las bases de la tumoración asociada a los genes supresores de tumores (Knudson, 1971; Colman *et al.*, 1995). Según este modelo, la aparición del tumor se produce por la ausencia total del producto génico en las células tumorales debida a la conjunción de la mutación germinal y la aparición de una mutación somática en dichas células. La pérdida de ambos alelos de *NF1* ha sido probada en diferentes tumores asociados a la enfermedad (Colman *et al.*, 1995; Serra *et al.*, 1997) y también en otros tumores no NF1 (McGillicuddy *et al.*, 2009; Burnichon *et al.*, 2012; Boudry-Labis *et al.*, 2013).

Los neurofibromas son tumores complejos, compuestos por varios tipos celulares, principalmente células de Schwann, fibroblastos, células vasculares y mastocitos. El estudio de diferentes modelos de ratón *Nf1*, permitió identificar el tipo celular que sufre la inactivación del segundo alelo, originando la transformación tumoral. Los ratones *Nf1*^{-/-} no son viables, principalmente por la aparición de malformaciones cardíacas y apoptosis neuronal durante el desarrollo embrionario (Henkemeyer *et al.*,

1995). Los ratones heterocigotos ($Nf1^{+/-}$), por su parte, muestran predisposición al desarrollo de feocromocitomas y leucemia mieloide, sin embargo no desarrollan tumores plexiformes ni otros tumores característicos de la enfermedad (Brannan *et al.*, 1994; Jacks *et al.*, 1994). Cichowski y colaboradores (1999) crearon un ratón quimera parcialmente compuesto por células $Nf1^{-/-}$ y observaron que prácticamente todos los ratones desarrollaban numerosos neurofibromas que histológicamente parecían neurofibromas plexiformes. Sin embargo, este modelo no permitía identificar el tipo celular implicado en el inicio del desarrollo tumoral. Por ello, Zhu y colaboradores (2002) crearon un ratón $Nf1$ condicional mediante el sistema Cre-LoxP. Cuando la inactivación de los alelos $Nf1$ se inducía en las células de Schwann, en ratones con un fondo genético $Nf1^{+/-}$, se producía el desarrollo de tumores en los nervios periféricos de la médula espinal, similares a los neurofibromas plexiformes humanos. De manera similar, la inactivación de los alelos $Nf1$ en las células precursoras astrogliales comportaba el desarrollo de astrocitomas de bajo grado en los nervios ópticos y/o en el quiasma. Estos estudios revelaron también que la inactivación de los alelos $Nf1$ en células de Schwann ($Nf1^{-/-}$) es necesaria, pero no suficiente, para la transformación al estado neoplásico, que requiere de un entorno haploinsuficiente ($Nf1^{+/-}$). Por ejemplo, se ha visto que la infiltración de mastocitos heterocigotos ($Nf1^{+/-}$) en los nervios periféricos preneoplásicos junto con la inactivación de $NF1$ en las células de Schwann ($Nf1^{-/-}$) son críticos para el desarrollo tumoral (Yang *et al.*, 2003 y 2008; Staser *et al.*, 2010). Por último comentar que la malignización de los neurofibromas plexiformes a MPNST parece estar originada por la aparición de alteraciones genéticas adicionales, como la sobreexpresión de EGFR (DeClue *et al.*, 2000) o la inactivación de los alelos del gen $TP53$ (Cichowski *et al.*, 1999; Birindelli *et al.*, 2001), la pérdida en homocigosis del locus $CDKN2A$ (Kourea *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 1999; Perrone *et al.*, 2003) y del gen RBI (Mawrin *et al.*, 2002; Spurlock *et al.*, 2010).

2. Mutaciones en el gen $NF1$ causantes de la enfermedad

2.1 Espectro mutacional

En el gen $NF1$ se han identificado todo tipo de mutaciones que incluyen microdeleciones del locus $NF1$, variaciones en el número de copias intragénicas (deleciones o duplicaciones de uno o varios exones, CNVs), mutaciones *frameshift*,

nonsense, *missense*, pequeñas deleciones/inserciones en fase y mutaciones de *splicing*. Las mutaciones puntuales, que suponen cerca del 95% de los cambios identificados, se encuentran repartidas a lo largo de todo el gen. No se han detectado puntos calientes de mutación en *NF1*.

En el estudio más amplio realizado hasta la fecha (Messiaen and Wimmer, 2008) se analizaron 1770 pacientes en los que se identificaron 1017 mutaciones diferentes. El 46% de los pacientes (813/1770) portaban mutaciones únicas mientras que se identificaron 204 cambios diferentes en más de un caso (957 pacientes en total).

El espectro mutacional comprendía un 5% de microdeleciones que eliminan el gen *NF1* y regiones adyacentes (89/1770), un 2,2% de duplicaciones/deleciones de uno o varios exones (39/1770), un 25,6% de mutaciones *frameshift* (453/1770), un 20,7% de mutaciones *nonsense* (367/1770), un 15,9% de cambios *missense* (282/1770), un 2,5% de pequeñas deleciones/inserciones en fase (44/1770) y un 27% de mutaciones de *splicing* (478/1770). Además se identificaron 13 casos (<1%) con mutaciones complejas (indels, varios cambios no adyacentes, etc.), cuatro casos en los que el ATG de inicio de transcripción estaba mutado y una translocación $-t(14;17)(q32;q11.2)-$.

2.2 Análisis mutacional

El análisis mutacional de *NF1* es complejo debido a diversos factores: el gran tamaño del gen que comprende 60 exones, la existencia de pseudogenes, la ausencia de puntos calientes de mutación y el amplio espectro mutacional. Por estas razones, la detección de mutaciones en el gen *NF1* requiere de protocolos basados en técnicas complementarias. Se han utilizado diversas metodologías para la identificación de cambios puntuales (Valero *et al.*, 1994; Messiaen *et al.*, 2000; Ars *et al.*, 2000; Fahsold *et al.*, 2000; De Luca *et al.*, 2003; Upadhyaya *et al.*, 2004; Griffiths *et al.*, 2007; Pros *et al.*, 2008), deleciones completas del gen y variaciones en el número de copias intragénicas (Wu *et al.*, 1995; Riva *et al.*, 2000; Wimmer *et al.*, 2006; De Luca *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2007; Pasmant *et al.*, 2009). Cada uno de los protocolos ha mostrado una sensibilidad y especificidad diferentes.

A pesar de la dificultad que supone la búsqueda de mutaciones patogénicas, hasta la fecha se han descrito más de 1200 mutaciones diferentes (*Human Genome Mutation Database*, HGMD). El estudio de cierto tipo de mutaciones en el gen *NF1*,

como las microdeleciones y las mutaciones de *splicing*, ha servido para progresar en el conocimiento de los mecanismos patogénicos de las enfermedades genéticas humanas. En este trabajo también abordaremos el estudio de las variaciones en el número de copias intragénicas, de las cuales se tiene poco conocimiento hasta la fecha.

2. 3 *Arquitectura de la región cromosómica 17q11.2 y microdeleciones del locus NF1*

Las grandes deleciones, o microdeleciones, del *locus NF1* ocurren en el 5-10% de los pacientes con Neurofibromatosis tipo 1 (Kluwe *et al.*, 2004). Se clasifican en base a su tamaño y a la localización del punto de rotura. Hasta el momento se conocen tres tipos de microdeleciones: tipo 1, 2, y 3; además de las denominadas deleciones atípicas. Las deleciones tipo 1 y tipo 3 están mediadas por repeticiones de bajo número de copias (LCRs) situadas en la región cromosómica 17q11.2, denominadas NF1-REPa, NF1-REPb y NF1-REPC (Figura 3). Las LCRs son bloques de ADN de una longitud de 10-400 Kb que presentan una alta homología (Stankiewicz and Lupski, 2002). Se cree que se han originado como consecuencia de duplicaciones de segmentos genómicos, produciendo regiones parálogas. Las LCRs, en general, se localizan preferentemente cerca de los centrómeros o telómeros de los cromosomas humanos (Eichler *et al.*, 1999) y están asociadas con inestabilidad de las regiones genómicas donde se encuentran porque aumentan la tasa de recombinación homóloga no alélica (*non-allelic homologous recombination*, NAHR).

Las regiones parálogas NF1-REPa, NF1-REPb y NF1-REPC, tienen diferente tamaño (130, 43 y 75 Kb, respectivamente) y composición. Las tres contienen el gen *LLRC37B* o fragmentos derivados del mismo, cuya copia funcional se encuentra en NF1-REPC. También se encuentran fragmentos de este gen en otras localizaciones cromosómicas de 17q, como 17q21.31 y 17q24.1.

Las **deleciones tipo 1** son las más frecuentes, se expanden 1,4 Mb y eliminan 14 genes, incluyendo el gen *NF1*, y dos micro ARNs (Dorschner *et al.*, 2000, López-Correa *et al.*, 2001, Jenne *et al.*, 2003, Pasmant *et al.*, 2011) (Figura 3). Los genes eliminados son: *CRLF3*, *ATAD5*, *C17orf42*, *ADAP2*, *RNF135*, *NF1*, *OMG*, *EVI2A*, *EVI2B*, *RAB11FIP4*, *C17orf79*, *UTP6*, *SUZ12* y *LLRC37B*. Estas deleciones se producen por un mecanismo de NAHR entre las secuencias parálogas NF1-REPa y NF1-REPC que comparten un bloque de secuencia de 51 Kb con una identidad del

97,5% (Forbes *et al.*, 2004). Dentro de esta región se sitúan los dos principales puntos calientes de recombinación, los sitios parálogos de recombinación 1 y 2 (PRS1 y PRS2) que comprenden 2,8 y 3,5 Kb, respectivamente (López-Correa *et al.*, 2001; Forbes *et al.*, 2004; Raedt *et al.*, 2006). La mayoría de los puntos de rotura (70%) se localizan en PRS2 y alrededor del 20% en PRS1 (Raedt *et al.*, 2006). Las deleciones tipo 1 se originan preferentemente durante la meiosis materna (López-Correa *et al.*, 2001) aunque también se han identificado tres casos en los que la recombinación es mitótica (Messiaen *et al.*, 2011).

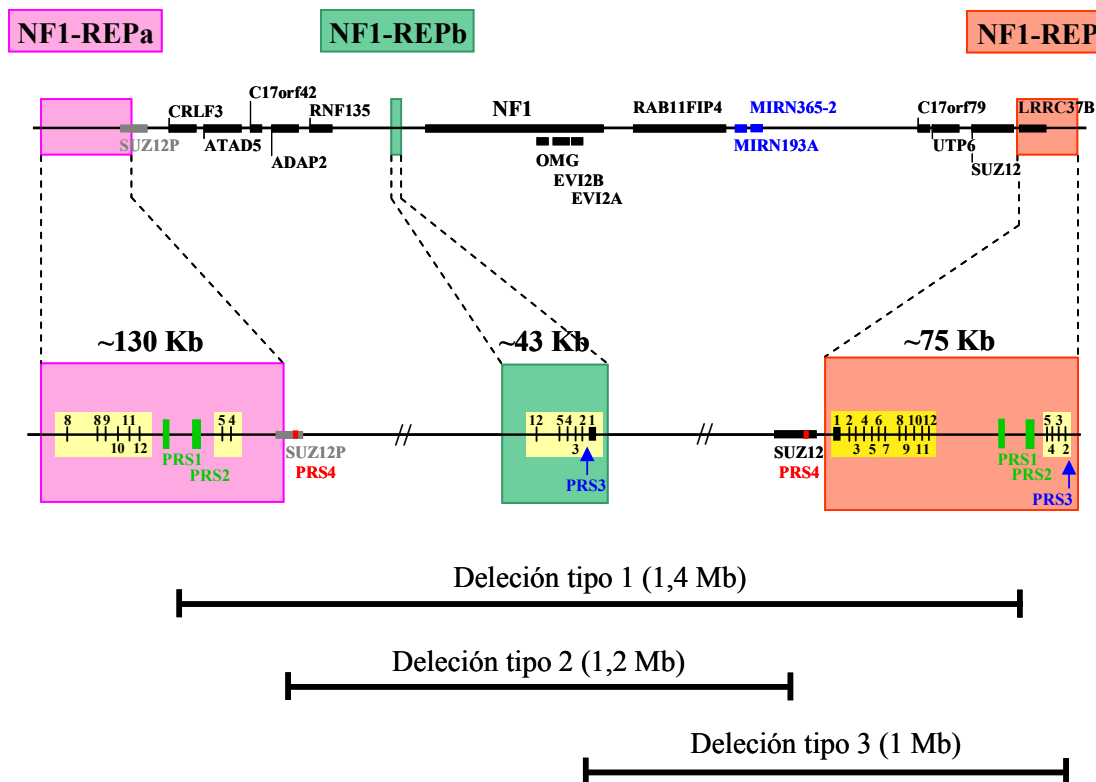


Figura 3: Mapa físico del *locus NF1*. En el diagrama superior se muestran los 14 genes contenidos en la región (recuadros negros), el pseudogén *SUZ12P* (recuadro gris) y los dos micro-ARNs (recuadros azules). Las regiones parálogas NF1-REPa, REPb y REPC se muestran en detalle en el diagrama inferior. El rectángulo amarillo oscuro, en NF1-REPC, representa la copia funcional del gen *LRR37B* y los rectángulos en amarillo más claro muestran los pseudogenes de *LRR37B* localizados en las tres secuencias NF1-REP. Los recuadros verdes en NF1-REPa y REPC, indican los puntos calientes de recombinación PRS1 y PRS2, los recuadros rojos en *SUZ12* y *SUZ12P* muestran los puntos calientes de recombinación PRS4 y las flechas azules muestran PRS3. Las líneas negras en la parte inferior indican la extensión de las deleciones tipo 1, 2 y 3.

Las **deleciones tipo 2** se expanden 1,2 Mb y se producen entre el gen *SUZ12* y su pseudogén, *SUZ12P* (Petek *et al.*, 2003; Kehrer-Sawatzki *et al.*, 2004). Las

secuencias de ambos genes son altamente homólogas, con una identidad del 96,2% en una región de 54 Kb (Steinmann *et al.*, 2007). La localización de dichos genes se muestra en la Figura 3. Este tipo de deleción elimina 13 genes incluyendo *NF1*, ya que el gen *LRRC37B*, localizado en NF1-REPC, no está incluido en el intervalo de la deleción. Los puntos de rotura se localizan en diferentes intrones del gen *SUZ12* (Steinmann *et al.*, 2007) aunque recientemente se ha descrito un nuevo sitio parálogo de recombinación, denominado PRS4, localizado en el intrón 8, donde se concentran el 20% de los puntos de rotura identificados en pacientes con deleción tipo 2 (Vogt *et al.*, 2012). El mecanismo principal por el que se produce este tipo de deleciones es el NAHR, pero a diferencia de las deleciones tipo 1, en las que la recombinación ocurre preferentemente durante la meiosis, en este caso la recombinación es mayoritariamente mitótica, por ello la mayoría de los pacientes con deleciones tipo 2 son mosaicos (Petek *et al.*, 2003; Kehrer-Sawatzki *et al.*, 2004; Steinmann *et al.*, 2007; Roehl *et al.*, 2010 y 2012).

Las **deleciones tipo 3**, se producen entre NF1-REPb y NF1-REPC. Estas deleciones abarcan 8 genes situados en una región de 1 Mb y se producen por NAHR entre secuencias truncadas del gen *LRRC37B* (Figura 3) (Bengesser *et al.*, 2010). Dichas secuencias presentan una homología del 97,8% a lo largo de 9,2 Kb. Recientemente se ha descrito un nuevo punto caliente de recombinación, el sitio de recombinación parálogo 3 (PRS3) de ~1 Kb, en el cual se localizan alrededor del 90% de los puntos de rotura (Zickler *et al.*, 2012).

Por último, las **deleciones atípicas** que también eliminan el gen *NF1*, tienen un tamaño muy variable y son muy poco recurrentes (Mantripragada *et al.*, 2006; Kehrer-Sawatzki *et al.*, 2008; Pasmant *et al.*, 2009 y 2010). El mecanismo de deleción parece ser la unión no homóloga de extremos (*non-homologous end joining*, NHEJ) aunque sólo se han identificado los puntos de rotura en un número muy reducido de casos (Venturin *et al.*, 2004a; Kehrer-Sawatzki *et al.*, 2008).

A pesar del vasto conocimiento que se tiene en la actualidad sobre los mecanismos que median este tipo de microdeleciones, nunca antes se ha investigado si el alelo que se mantiene en los pacientes con deleción presenta características especiales que lo “protegen” de la recombinación. El estudio de polimorfismos de nucleótido único, en la región de microdeleción delimitada por las secuencias NF1-REPa y NF1-REPC, ayudará a esclarecer este punto.

2.4 Deleciones y duplicaciones intragénicas en NF1

Tal y como acabamos de explicar, las microdeleciones del *locus NF1* son recurrentes y se producen en puntos calientes de recombinación en un intervalo definido. No obstante, otras muchos reordenamientos patogénicos, representan CNVs no recurrentes, que son muy variables en tamaño y cuyos puntos de rotura no se localizan en puntos calientes de recombinación.

En el contexto de la NF1, las CNVs de uno o varios exones suponen alrededor del 5% de las mutaciones identificadas en el gen *NF1* de acuerdo a la base de datos HGMD[®] (Human Genome Mutation Database, Institute of Medical Genetics, Cardiff). Hasta la fecha se han identificado alrededor de 60 deleciones de uno o varios exones y tan sólo 4 casos de duplicación. Las deleciones se expanden desde alrededor de 500 pb hasta >150 Kb. Se han descrito pacientes con este tipo de mutaciones en diferentes trabajos (Mantripragada *et al.*, 2006; Upadhyaya *et al.*, 2006; De Luca *et al.*, 2007; Bausch *et al.*, 2007; Bottillo *et al.*, 2009 –por seleccionar algunos de los más recientes–), pero solamente se han caracterizado y secuenciado los puntos de rotura en siete casos: las deleciones de los exones 2, 32 y 38 (Wimmer *et al.*, 2006; Weiming *et al.*, 1992; Osborn and Upadhyaya, 1999, respectivamente), tres deleciones multiexónica de los exones 13 al 28 (Vandenbroucke *et al.*, 2004b), del 28 al 48 (Orzan *et al.*, 2008) y del 32 al 39 (Lazaro *et al.*, 1994a) y una duplicación del exón 23.2 (Wimmer *et al.*, 2006).

Recientemente, se han descrito varios mecanismos que median este tipo de CNVs no recurrentes. Estos mecanismos se clasifican en no replicativos y replicativos. Entre los mecanismos no replicativos cabe destacar el **NHEJ** (*non-homologous end-joining*) (Lieber, 2008) que produce la ligación entre dos extremos no complementarios de ADN aunque parece estar favorecido por pequeñas regiones de microhomología (1-4 pb). Otro de estos mecanismos es el **MMEJ** (*microhomology-mediated end joining*) (McVey and Lee, 2008), también conocido como alt-NHEJ, que produce la unión de dos extremos de ADN utilizando como molde microhomologías de 5-25 pb presentes en ambos extremos. Dentro de este grupo también se encuentra el **NAHR entre elementos repetitivos** (como por ejemplo Alu o L1) (Sen *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2008). Por otra parte, en los mecanismos replicativos, ocurre que la molécula de ADN que se está sintetizando se disocia de su molde tras encontrar una rotura en el mismo. La nueva molécula de ADN se une entonces en otra región, a través de pequeñas

microhomologías. Dentro de este grupo cabe destacar el **SRS** (*serial replication slippage*) (Chen *et al.*, 2005), el **FoSTeS** (*fork stalling and template switching*) (Lee *et al.*, 2007) y el **MMBIR** (*microhomology-mediated break induced replication*) (Hastings *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que las roturas en el ADN no son eventos que ocurren al azar. Existe una fuerte influencia del contexto genómico que favorece la formación de CNVs patogénicas (Abeysinghe *et al.*, 2003; Shaw *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2010). De hecho, se sabe que elementos repetitivos, motivos de secuencia recombinogénicos, conformaciones no-B del ADN y la presencia de microhomologías están implicadas en la formación de CNV.

La caracterización de los puntos de rotura de nuevas CNVs no recurrentes en el gen *NFI* proporcionará una información muy valiosa para el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen a los eventos de recombinación genómica.

2.5 Mutaciones de splicing

El *splicing* es el proceso por el cual los intrones son escindidos del pre-ARNm para dar lugar a la molécula de ARNm madura. Los exones están definidos por motivos de secuencia, relativamente conservados, que son reconocidos por la maquinaria del *splicing*. Dichos motivos, localizados en las secuencias intrónicas, son: el sitio 5' donador, el sitio 3' aceptor y el tracto de polipirimidinas (Figura 4).

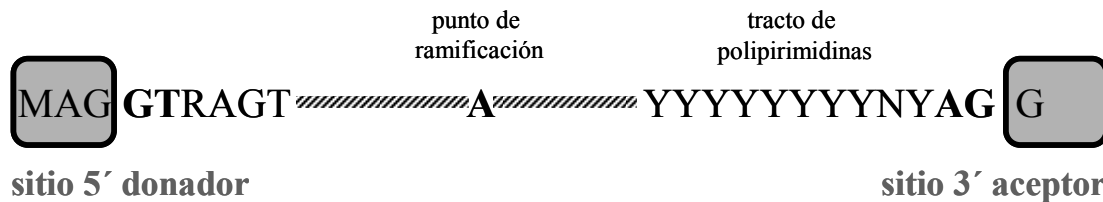


Figura 4: Detalle de los sitios consenso de *splicing*. Se indican los sitios 5' donador y 3' aceptor de *splicing*, así como el tracto de polipirimidinas compuesto por repeticiones variables de C y/o T (Y) y la adenina (A) del punto de ramificación. La M equivale a los nucleótidos A/C, la R a los nucleótidos A/G y N indica cualquier nucleótido. Los recuadros grises indican las secuencias exónicas.

La maquinaria celular donde se ejecuta el *splicing*, denominada espliceosoma, es extremadamente compleja. Se trata de una estructura macromolecular dinámica compuesta por cinco ARNs pequeños nucleares (snRNA), denominados U1, U2, U4, U5 y U6, y unas 150 proteínas adicionales (Valadkhan and Jaladat, 2010).

El proceso de *splicing* ocurre en dos etapas secuenciales de transesterificación (Figura 5). En la primera se produce un ataque nucleofílico del grupo OH 2' de la adenina (A) localizada en el punto de ramificación, sobre el enlace fosfodiéster de la última guanina del extremo 3' del exón anterior. Se forma así una estructura en lazo (*lariat*). Esta reacción genera un grupo OH libre que a su vez ataca al extremo 3' aceptor, produciendo la unión de los dos exones.

En la moléculas de pre-ARNm encontramos otras secuencias que participan en la regulación del *splicing* denominadas elementos reguladores del *splicing* (*Splicing Regulatory Elements*, SRE) (Schaal and Maniatis, 1999; Fairbrother *et al.*, 2002; Cartegni *et al.* 2003; Wang and Burge, 2008). Dichos elementos se encuentran en las secuencias intrónicas y también en los exones y su efecto sobre el procesamiento es de diferente naturaleza. Los *Exonic e Intronic Splicing Enhancers* (ESE e ISE) favorecen el reconocimiento de los exones, mientras que los elementos *Exonic e Intronic Splicing Silencers* (ESS e ISS) inhiben el reconocimiento de los mismos.

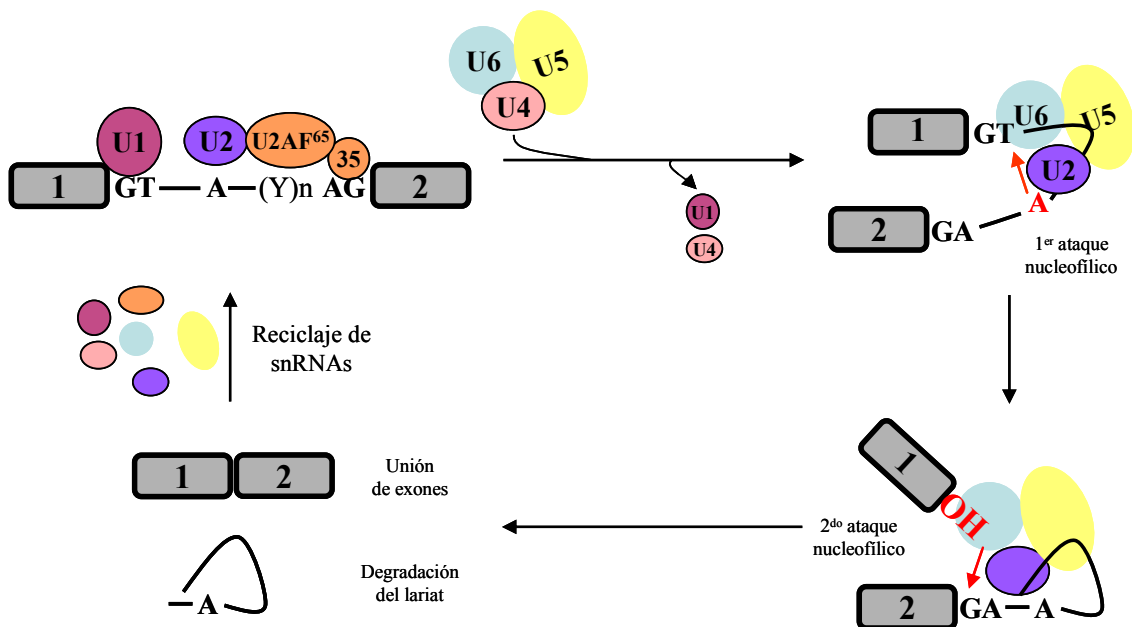


Figura 5: Diagrama esquemático del proceso de *splicing*. Los círculos de diferentes colores muestran diferentes proteínas del espliceosoma unidas al pre-ARNm que va a ser procesado. Los rectángulos grises muestran los exones y la línea central indica el intrón que será escindido tras las dos etapas de transesterificación.

Las proteínas de la familia SR (*Serin-Arginin rich proteins*) (Blencowe, 2000) se unen a los motivos ESE en las fases tempranas del procesamiento, a través de uno o dos motivos de reconocimiento de ARN (*RNA Recognition Motif*, RRM) localizados en su extremo N-terminal. Por otra parte, estas proteínas favorecen el anclaje de otras proteínas o factores de *splicing* mediante el dominio RS (rico en arginina y serina) localizado en su extremo C-terminal.

Los elementos ESS interaccionan con reguladores negativos que frecuentemente pertenecen a la superfamilia de las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP) (Martínez-Contreras *et al.*, 2007). Estas proteínas contienen uno o varios motivos RMM y en ocasiones dominios inhibidores, entre los que se encuentran los motivos ricos en glicina (Pozzoli and Sironi, 2005). Cada uno de los miembros de esta familia de proteínas funciona con un mecanismo diferente. La proteína hnRNPA1, en ocasiones, se une en ambos extremos del exón y produce una estructura en *loop* que favorece la eliminación del mismo (Nasim *et al.*, 2002). Otro ejemplo es la proteína PTB que bloquea la interacción esencial que se produce entre los snRNPs U1 y U2 (Izquierdo *et al.*, 2005).

Las mutaciones de *splicing* están asociadas a un gran número de enfermedades genéticas (Cooper *et al.*, 2009; Singh and Cooper, 2012) y actualmente se calcula que una de cada tres mutaciones identificadas en ADN_g afectan al correcto *splicing* del pre-ARN_m (Lim *et al.*, 2011). Además de las mutaciones que afectan a los sitios 5' donadores y 3' aceptores, se han caracterizado otras muchas mutaciones de *splicing* localizadas en secuencias exónicas, asociadas a enfermedades genéticas. En alguno de estos casos, es difícil establecer el mecanismo patogénico de la mutación. Los genes *SMN* implicados en la atrofia muscular espinal (AME) son un buen ejemplo de ello. La proteína *SMN* (*Survival Motor Neuron*) está codificada por *SMN1* y *SMN2*, que son dos genes muy homólogos. Sin embargo, *SMN2* produce mayoritariamente transcritos que carecen del exón 7 porque un cambio silencioso, C>T, en dicho exón provoca el *skipping* (eliminación) del mismo. Por esto, el gen *SMN2* mayoritariamente produce una proteína *SMN* truncada (Wirth, 2002). Dos modelos explican el efecto de dicho cambio silencioso: uno de ellos postula que la mutación elimina un elemento ESE de unión a la proteína SF2/ASF (Cartegni *et al.*, 2002 y 2006). El otro argumenta que dicho cambio crea un elemento ESS, al que se une la proteína hnRNPA1, lo que produce el *skipping* (Kashima and Manley, 2003; Kashima *et al.*, 2007). De hecho,

ambos modelos pueden ser ciertos (Cartegni *et al.*, 2006) e ilustran el caso de una mutación puntual que convierte un ESE en un ESS. Otro buen ejemplo, sería la compleja regulación del *splicing* del exón 12 del gen *CFTR* (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Este exón presenta elementos ESE y ESS solapantes formando elementos compuestos de regulación del *splicing* (CERES), a los que se unen varias proteínas SR y hnRNP que compiten entre ellas para incluir o eliminar el exón del ARNm maduro (Haque *et al.*, 2010). Por otro lado, el gen *MAPT* (*Microtubule-associated protein tau*) que codifica la proteína tau, presenta un *splicing* alternativo del exón 10 fuertemente regulado (Liu and Gong, 2008). Para la correcta función de la proteína se requiere una relación 1:1 entre las isoformas que incluyen o excluyen este exón. Mutaciones que afectan al exón 10 y producen una alteración de dicha relación, son la causa de la hiperfosforilación de la proteína y de la formación de agregados proteicos en el citoplasma de las células. Estos agregados han sido identificados en varias enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

En el caso del gen *NF1*, el análisis mutacional llevado a cabo por parte de diversos grupos de investigación ha revelado que un 25% de las mutaciones afectan al *splicing* del mensajero (Wimmer *et al.*, 2007; Messiaen and Wimmer, 2008; Pros *et al.*, 2008). Varios trabajos han abordado el estudio de mutaciones exónicas que afectan a SREs y producen el *skipping* de algún exón (Zatkova *et al.*, 2004; Bottillo *et al.*, 2007; Skoko *et al.*, 2008). Únicamente se ha demostrado la existencia de un elemento ESE presente en el exón 37 que es inactivado por la mutación c.6792C>G (Baralle *et al.*, 2006; Skoko *et al.*, 2008). Dicho cambio impide la unión de la proteína YB-1 y, a su vez, crea un elemento ESS al que se unen hnRNPA1, hnRNPA2 y DAZAP1 (*Deleted in Azoospermia-Associated Protein 1*) (Tsui *et al.*, 2000).

El estudio de los mecanismos de *splicing* mejorará el conocimiento de las bases moleculares de la Neurofibromatosis tipo 1, permitiendo la identificación de moléculas que revertan dichas alteraciones y el desarrollo de terapias farmacológicas, como ya ha ocurrido en la NF1 para las mutaciones que ocurren en secuencias intrónicas profundas (Pros *et al.*, 2009) y también en otras enfermedades genéticas (Slaugenhaupt *et al.*, 2004; Seo *et al.*, 2013).

3. Correlación genotipo-fenotipo

La Neurofibromatosis tipo 1 es una enfermedad progresiva con una penetrancia completa en la edad adulta. No obstante, muestra una expresividad muy variable (Huson *et al.*, 1988), de forma que individuos con una misma mutación pueden presentar fenotipos muy distintos. Este hecho también se observa entre individuos de una misma familia. No existe correlación entre el tipo de mutación y el fenotipo que presentan los pacientes, indicando la participación de otros genes modificadores del fenotipo (Sabbagh *et al.*, 2009). Sin embargo, sí se ha establecido una correlación genotipo-fenotipo en dos casos. Por un lado, la delección de tres pb que se produce en el exón 17 (c.2970_2972delAAT) se ha asociado a un fenotipo más leve. Los pacientes que portan dicha delección presentan los signos cutáneos característicos de la enfermedad pero no desarrollan neurofibromas de ninguna clase (Upadhyaya *et al.*, 2007). Por otra parte, los pacientes que portan microdeleciones presentan con mayor frecuencia un fenotipo más grave, denominado síndrome de microdelección. Dicho fenotipo se caracteriza por los siguientes signos clínicos: dismorfismo facial, dificultad de aprendizaje, retraso mental, defectos cardiacos, mayor tumoración y un riesgo aumentado de malignización (Valero *et al.*, 1997; De Raedt *et al.*, 2003; Venturin *et al.*, 2004b; Pasmant *et al.*, 2010; Pasmant *et al.*, 2011). Hay que resaltar que no todos los pacientes con microdeleciones presentan dicho fenotipo; en muchos casos, la revisión clínica de estos casos no hace sospechar de la existencia de esta mutación. Aún así, se ha postulado que el fenotipo del síndrome de la microdelección podría estar relacionado con la haploinsuficiencia de uno o varios genes localizados en la región de delección. Así, la haploinsuficiencia de *OMG* se ha asociado a los problemas de aprendizaje (Venturin *et al.*, 2004b) y al sobrecrecimiento (Douglas *et al.*, 2007) y las malformaciones cardiacas se han asociado a la haploinsuficiencia de *SUZ12* y *ADAP2* (Venturin *et al.* 2004b). Los genes *RNF135* y *ADAP2* se han postulado como genes asociados al riesgo aumentado de malignización que presentan los pacientes con microdelección (Pasmant *et al.*, 2011). De nuevo, es necesario indicar que no existe una asociación total entre la delección de uno o varios de dichos genes y la aparición de un determinado rasgo fenotípico. Este hecho indica que otros factores genéticos están implicados en el fenotipo denominado síndrome de microdelección.

Por último, Sabbagh y colaboradores (2013) han observado una prevalencia mayor de nódulos de Lisch y un mayor número de manchas café con leche en los

pacientes que portan mutaciones truncantes, cuando se comparan con el grupo de pacientes con cambios *missense*. No obstante, dicha correlación no es significativa si se aplica la corrección de Bonferroni, por lo que es necesario verificar estos resultados en una cohorte independiente de pacientes.

Objetivos

1. Desarrollo de un protocolo para el diagnóstico genético de la enfermedad, capaz de identificar todo tipo de mutaciones. Validación del método para determinar su sensibilidad y especificidad.

2. Caracterización de las microdeleciones del *locus NF1*. Análisis del haplotipo que portan los pacientes con una deleción tipo 1 para buscar un genotipo asociado al carácter “no recombinogénico”.

3. Estudio de las deleciones y duplicaciones intragénicas.
 - 3.1 Caracterización molecular de las deleciones y duplicaciones intragénicas identificadas en nuestra cohorte.

 - 3.2 Definir los mecanismos moleculares que median dichas deleciones y duplicaciones.

4. Estudio de las mutaciones de *splicing*.
 - 4.1 Identificación y caracterización de las mutaciones de *splicing* en nuestra cohorte de pacientes.

 - 4.2 Valoración de la utilidad de las herramientas informáticas para predecir el efecto de las mutaciones sobre el *splicing*.

 - 4.3 Análisis funcional de mutaciones exónicas implicadas en el *skipping* de los exones 7 y 37 del gen *NF1*.

Materiales y métodos

1. Análisis mutacional

1.1 Sujetos

Los pacientes recogidos en este estudio fueron remitidos desde los servicios de Pediatría y Neurología de diversos hospitales españoles tras ser evaluados clínicamente. Todos los casos cumplían los criterios diagnósticos establecidos por el NIH (*National Institute of Health*) para NF1. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Ramón y Cajal y se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes.

1.2 Análisis de la variación en el número de copias del gen NF1

Se purificó el ADN genómico a partir de sangre periférica mediante el robot Chemagic MSM I (Magnetic Separation Module 1, CHEMAGEN). Se utilizaron 5 marcadores microsatélite para el análisis de segregación: IVS26.2.3, ALU, IVS27AC28.4, ACI27.2 e IVS38GTI (Xu *et al.*, 1991; Lazaro *et al.*, 1993 y 1994b; Valero *et al.*, 1996; Fang *et al.*, 2001). Para identificar deleciones y duplicaciones completas o parciales de *NF1* se realizó un análisis de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron tres kits comerciales, las mezclas SALSA MLPA P081 y P082 NF1 KIT para deleciones y duplicaciones de uno o varios exones y la SALSA MLPA P122-C1 NF1 AREA KIT para identificar grandes deleciones de la región cromosómica de *NF1* (MRC-Holland).

Brevemente, se añadieron 150 ng de ADN desnaturalizado a la mezcla de sondas de MLPA y se hibridó durante 16 h a 60°C antes de la reacción de ligación. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando cebadores marcados en 6-carboxifluoresceína (6-FAM) y 5 µl de la reacción de ligación como molde. Los productos de PCR se separaron en el ABI3100 (Applied Biosystems) y se midieron las áreas bajo los picos (RPA, *relative peak area*) utilizando el GeneScan Analysis software (Applied Biosystems). Los datos fueron analizados con el programa Coffalyser v6 MLPA Analysis Software (MRC-Holland). Cualquier disminución o aumento en los valores de RPA <0,7 o >1,3 se consideraron indicativos de deleción o duplicación, respectivamente.

1.3 Análisis mutacional del ADNc

Se extrajo el ARN total a partir de sangre periférica mediante el QIAamp® RNA Blood kit siguiendo las instrucciones del fabricante (QIAGEN). La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo a partir de 500 ng de ARN total utilizando el First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV; Roche). Se amplificó por PCR la región codificante de *NFI* en 23 fragmentos solapantes en un volumen final de 25 µl que contenía: 1,5 µl de ADNc como molde, 5 pmoles de cada cebador, dNTPs 200 µM, 1X de tampón de reacción, MgSO₄ 1,5 mM y 1,25 U de Optimase® Polymerase (Transgenomic). Los cebadores fueron diseñados utilizando el software Oligo 6.1. Las temperaturas de amplificación, tamaño de los fragmentos y secuencia de los cebadores están resumidas en la Tabla 2. Para favorecer la formación de heterodúplex se desnaturalizaron los productos de PCR a 95°C durante 10 minutos, seguido de un descenso de la temperatura de 1,5°C/min hasta los 40°C. Para el análisis por DHPLC se utilizó el WAVE DNA Fragment Analysis System (Transgenomic). Los productos de PCR fueron analizados mediante un gradiente lineal de acetonitrilo al 2% a una velocidad de flujo de 0,9 ml/min. Se optimizaron las condiciones de la carrera utilizando el WAVE Marker Software version 4.1 (Tabla 2). Los amplicones que mostraron una movilidad alterada fueron caracterizados mediante secuenciación de un nuevo producto de PCR utilizando el ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las mutaciones identificadas fueron confirmadas a nivel de ADNg mediante secuenciación utilizando cebadores previamente publicados en la literatura (Fahsold *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2001).

Para comprobar la patogenicidad de las mutaciones *missense* identificadas, se llevó a cabo un análisis de segregación de la mutación y de los marcadores microsatélite descritos en el apartado anterior, en el grupo familiar. Cuando este análisis no fue informativo, se utilizaron dos programas bioinformáticos: SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) y Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

Las mutaciones han sido nombradas de acuerdo a las guías del Human Variation Society. La numeración de las mutaciones se basa en la secuencia de ARNm de Genebank NM_000267.2, considerando la A del codón de inicio de la traducción como nucleótido número 1. Los exones no se han nombrado consecutivamente sino de acuerdo a la nomenclatura aceptada por los investigadores en este campo.

Tabla 2: Secuencia de los cebadores y condiciones para la amplificación por PCR y análisis de DHPLC.

Fragmento		Secuencia	pb	T ^o PCR	T ^o DHPLC
F1	D	5'-GAGGACATGGCCGCGCACA-3'	437	57	55,7
	R	5'-GAAAATAAAACCCCAGAGGCAGAA-3'			
F2	D	5'-TCTGCCATTTTCTTCACACCT-3'	446	55	56,5
	R	5'-TGCTGCTTTACGTTTGGTGCT-3'			
F3	D	5'-GAAAAGCTATTTGACTTGGTGG-3'	433	55	57,2
	R	5'-TGTTGTGAGGGCTTATACGA-3'			
F4	D	5'-TGGATCTAATGATTGACTGCCT-3'	494	55	57,4
	R	5'-GTGTGACTGAGGGACCAGTTG-3'			
F5	D	5'-AAACCCAAGGCAGTACAGCAG-3'	460	56	56,8
	R	5'-GCACTATCCATAGAGGAGTTCCC-3'			
F6	D	5'-CTACGTACTCCTGGAGCCTCT-3'	443	57	60,2
	R	5'-TTGGCTTTTGGATAGTTAAGGAT-3'			
F7	D	5'-CTGAGGCTTGGGAAGATACAC-3'	440	57	59
	R	5'-CAGATCCTTAACATTGGTCCG-3'			
F8	D	5'-CTGTTGTCCTTAATGGTGTGT-3'	489	58	56,1
	R	5'-ATCATCATCTGCTGCTTGGT-3'			
F9	D	5'-GACCTCTCATTTTGCCAAGAGAT-3'	352	56	57,2
	R	5'-TACAGTGCCTCAGTGATGCC-3'			
F10	D	5'-GCAACAGGTGGCAGGAAAC-3'	451	54-55	58,8
	R	5'-GAAGAGAGTCTGCATGGAGTCT-3'			
F11	D	5'-TCTCGGCATTTACTCTACCAAC-3'	365	56	57,8
	R	5'-TGGTATAAACAGTGGCACACAC-3'			
F12	D	5'-TTAGAACCATCAGAGAGCCTT-3'	422/485	55	57,5
	R	5'-GGACAATCAGATGCTATATCAA-3'			
F13	D	5'-TTGTGAAAAGCAACTTTGATG-3'	458	54	58,3
	R	5'-ATTGATTTGACCAGTTTTGAA-3'			
F14	D	5'-TATTTTCTACCAAGCTGGGAC-3'	460	55	56,7
	R	5'-GAGAGCATTGTGGAATACCTT-3'			
F15	D	5'-ACATAGAGCATGAACAACAGAAA-3'	486	56	57,8
	R	5'-AGGCACACAGAAGATTATAGGCA-3'			
F16	D	5'-CTGGGACACTGCTCAATATCG-3'	448	56	56,4
	R	5'-AGGCTTCCCATATTTTTGCTT-3'			
F17	D	5'-TGACAAGCTGATAACAATGACC-3'	488	55	57,6
	R	5'-GTGAACAAGTACACAGAGAGTGAA-3'			
F18	D	5'-TCTCCCTTAGAGCTTCCACAC-3'	501	56	57,5
	R	5'-CAGGTCCCTTTAAGCAACTCT C-3'			
F19	D	5'-ATGGGCAGATAAAGCAGATAAT-3'	528	55	56,7
	R	5'-CCACGCTCTGTGTATTCACCTT-3'			
F20	D	5'-ATCCTTACCTGCTATTGTTG-3'	466	56	56,6
	R	5'-TTAGGAGCCTTTGTGTCTGAT A-3'			
F21	D	5'-CTGGACATGGGGCAACCTTCT-3'	391	57	58
	R	5'-AGACTTTGGGAAACACAACACTGG-3'			
F22	D	5'-TACTTACTGATCCGAAGATCCA-3'	393	54	57,3
	R	5'-CAATCAAGGCATCAAGAACTTA-3'			
F23	D	5'-GCAGGACCGTTTTCAAAGCAA-3'	482	58	58,8/60,2
	R	5'-GGAAGTGCAGCATTACAACATGG-3'			
E1	D	5'-CAGACCTCTCCTTGCCCTT -3'	240	62	67,1
	R	5'-GGATGGAGGGTCGGAGGCTG-3'			

F: fragmento; E: exón; D: cebador directo; R: cebador reverso; pb: pares de bases; T^o: temperatura.

En la Figura 6 se muestra un esquema completo del análisis mutacional.

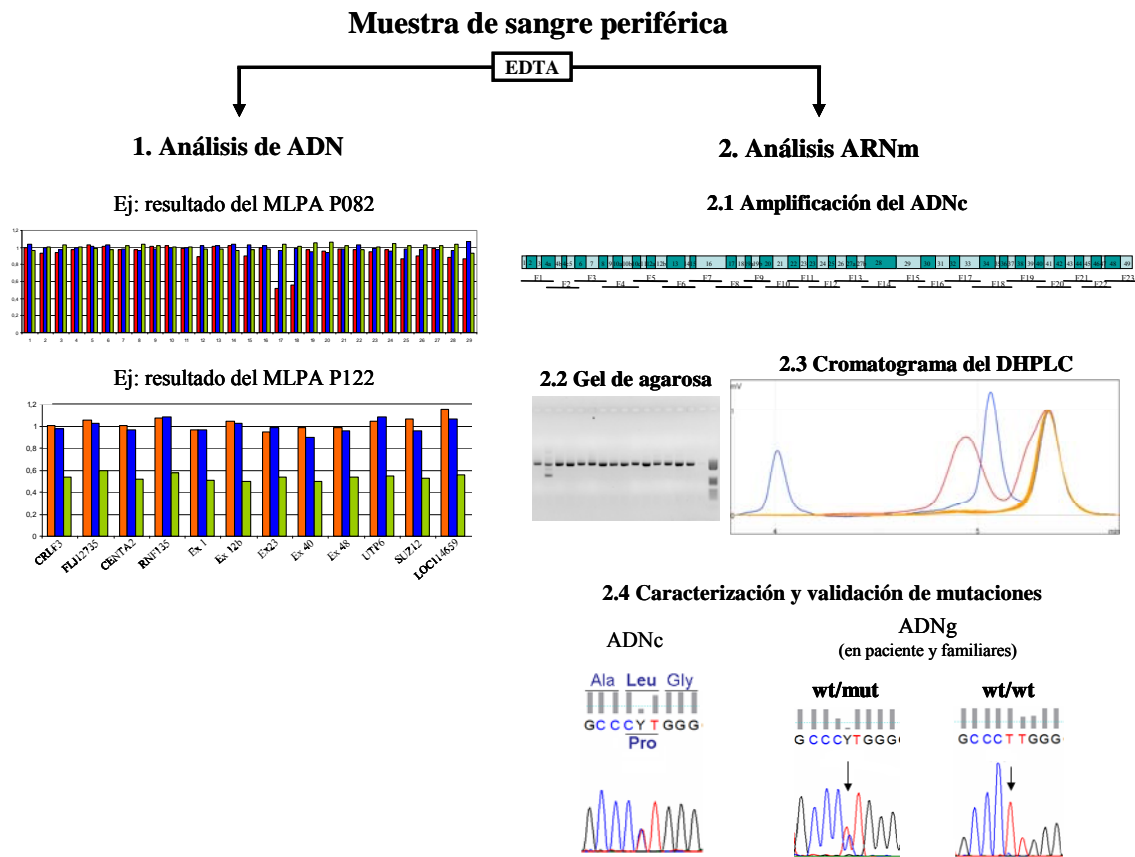


Figura 6: Protocolo para el análisis mutacional del gen *NF1*. Inicialmente se realiza un análisis del ADNg mediante MLPA (izquierda) y los casos que son negativos se analizan a nivel de ARNm (derecha).

2. Análisis de las microdeleciones en el locus *NF1*

2.1 Caracterización de las microdeleciones

2.1.1 Análisis de segregación

Con el fin de identificar el origen parental de las deleciones identificadas se realizó un análisis de segregación mediante el análisis de 17 marcadores microsatélite localizados dentro y flanqueando la región de microdelección: D17S1873, D17S2093, D17S1841, D17S945, D17S1532, D17S1307, D17S2237, D17S1800, D17S1782, D17S1880, D17S2139, D17S1850, D17S1293, D17S907, D17S1833, D17S1660 y D17S1788. También se analizaron los cinco marcadores microsatélite intragénicos descritos anteriormente.

2.1.2 Array-CGH

En colaboración con la empresa NIM Genetics se realizó una hibridación genómica comparada (CGH) utilizando un *array-CGH*, tipo Human Array CGH 4x44K (Agilent Technologies). La construcción de este *array* se realizó con una cobertura de alta resolución correspondiente a la región del gen *NF1* (chr17:24500000- 28500000) con 34.540 sondas totales (1 sonda cada 116 pb de media) diseñadas según el genoma de referencia NCBI36/hg18. Además, se utilizaron 2545 sondas como control. Para el análisis bioinformático de las muestras, se utilizó el estadístico ADM-2 (ventana 0.5Mb, A=6) como parámetro de análisis del número de copias de ADN presentes para las diferentes sondas. Se aceptó como una alteración en el número de copias del ADN aquellas que tuvieran un mínimo de cinco sondas consecutivas alteradas. Por tanto, la resolución del análisis fue de 580 pb aproximadamente.

2.1.3 Estudio de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en la región *NF1*

2.1.3.1 Sujetos

Se seleccionaron todos los casos con delección tipo 1 identificados en nuestro laboratorio y se solicitó a otros centros el envío de muestras con este tipo de mutación. De este modo, recibimos 6 casos del Institut Català d'Oncologia (ICO) gracias a la Dra. Conxi Lázaro y 17 casos del Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL) de mano de la Dra. Berta Campos. También hemos estudiado 100 sujetos sanos (200 cromosomas) de origen español.

2.1.3.2 Selección de SNPs en la región de microdelección

Utilizamos las bases de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y del HapMap Project (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) para seleccionar varios SNPs en cada uno de los genes comprendidos en la región de microdelección. Cuando fue posible, se seleccionaron polimorfismos con alta heterocigosidad en población caucásica distribuidos a lo largo de cada gen. Se evitaron las secuencias del gen donde la identidad con otras regiones (pseudogenes) fuera muy alta como es el caso del gen *SUZ12*. Finalmente, seleccionamos 35 SNPs repartidos en los genes *CRLF3*, *ATAD5*, *C17orf42*,

ADAP2, *RNF135*, *NF1*, *OMG*, *EVI2A*, *EVI2B*, *RAB11FIP4*, *C14orf79*, *UTP6* y *SUZ12* (Tabla 3).

Tabla 3: Polimorfismos de nucleótido único seleccionados para el estudio de genotipado.

Gen	SNP	Ref SNP	Sonda TaqMan	Tipo de SNP
CRLF3	SNP1	rs34756112	C__25971519_10	Intrónico
	SNP2	rs6505211	C__26924425_10	Intrónico
	SNP3	rs11871607	customizada	Intrónico
	SNP4	rs8078182	customizada	Intrónico
ATAD5	SNP1	rs9910051	C__27849348_10	Intrónico
	SNP2	rs9890032	C__30418042_10	Intrónico
	SNP3	rs3764421	C__1955740_30	<i>Missense</i>
	SNP4	rs9898911	C__26030674_20	Intrónico
C17orf42	SNP1	rs9897628	C__25955297_10	Intrónico
	SNP2	rs9914271	customizada	Intrónico
ADAP2	SNP1	rs7225461	C__30221991_10	Intrónico
	SNP2	rs6505220	C__26223827_10	Intrónico
RNF135	SNP1	rs952190	customizada	Intrónico
	SNP2	rs12453269	C__1214818_10	Intrónico
NF1	SNP1	rs11868459	C__503976_10	Intrónico
	SNP2	rs1801052	C__11941421_10	Silencioso
	SNP3	rs7350943	C__2533322_10	Intrónico
OMG	SNP1	rs11080149	C__2533270_10	<i>Missense</i>
EVI2B	SNP1	rs3087591	C__11888376_10	3' UTR
	SNP2	rs2214538	C__2533279_10	Intrónico
	SNP3	rs7218930	C__30738180_20	Intrónico
EVI2A	SNP1	rs7505	C__7562823_1_	3' UTR
	SNP2	rs1129506	C__2533294_1_	Silencioso
	SNP3	rs2854306	C__15825991_10	Intrónico
RAB11FIP4	SNP1	rs7503263	C__2181757_10	Intrónico
	SNP2	rs178850	C__2181773_10	Intrónico
	SNP3	rs1076185	C__1138517_10	3' UTR
C17orf79	SNP1	rs2344310	C__16212794_10	Intrónico
	SNP2	rs12941700	C__32081132_10	Intrónico
UTP6	SNP1	rs11658318	C__2558252_10	Intrónico
	SNP2	rs3760454	C__25750756_10	<i>Missense</i>
	SNP3	rs2074101	C__16163652_10	5' UTR
SUZ12	SNP1	rs578635	C__957145_20	Intrónico
	SNP2	rs501957	customizada	Intrónico
	SNP3	rs527256	customizada	Intrónico

Ref SNP: código del SNP en la base de datos dbSNP del NCBI; *Sonda TaqMan*: código de las sondas TaqMan utilizadas.

2.1.3.3 Análisis por sondas TaqMan

Se automatizó el genotipado de los SNPs utilizando la tecnología TaqMan SNP Genotyping Assay en un aparato 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Para los 35 SNPs analizados se utilizaron 29 sondas comerciales de Applied Biosystems (Tabla 3) y 6 sondas customizadas (Tabla 4).

Brevemente, en placas de 96 pocillos (MicroAmp™ Optical 96-well Reaction Plate, Applied Biosystems) que contenían las sondas para cada uno de los 35 SNPs de interés, se añadió una mezcla que contenía 10 ng de ADN_g, 1X TaqMan GTXpress Master Mix (2X) y agua estéril, en un volumen final de 10 µl. La reacción de PCR se llevó a cabo con una desnaturalización inicial de 10 seg a 95°C, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 seg e hibridación a 60°C durante 1 min. Los resultados fueron analizados utilizando el TaqMan Genotyper Software (Applied Biosystems).

Tabla 4: Secuencia de las sondas customizadas utilizadas en los ensayos TaqMan SNP Genotyping Assay.

Gen	SNP	Ref SNP	Secuencia
CRLF3	SNP1	rs8078182	TGTTGGATATAAAATGAAAAATA[T/C]AGGTTTGAAAATTGAATACTGAACC
	SNP2	rs11871607	ANTCATATAAAAAATACACGCTTA[A/G]TTCTTGATTATCTATACTAATAGAG
C17orf42	SNP1	rs9914271	GTGGAACATAAAATAAAATTTT[A/G]TACGTTTATAAGAAATGTTTCAGCT
RNF135	SNP1	rs952190	GCCAGGGCGCCGCGCAGCAGCCGCA[C/G]CTGCGGAAGAACACGCTACTGCAGG
SUZ12	SNP2	rs501957	GCTCAGTGTGTAAAATCAAAGAAG[G/A]GAAGCACTGGCAGTCATTGTTCAGTG
	SNP3	rs527256	TATAATTAATGTTTGTGTAGTGTCT[C/G]TAATTGACTCACAAAATCCTCAACC

2.1.3.4 Reconstrucción de haplotipos

El programa PHASE v2.1 es un algoritmo desarrollado por Matthew Stephens y colaboradores (Stephens *et al.*, 2001, Stephens and Donnelly 2003) para la reconstrucción de haplotipos partiendo de los datos del genotipo de una población. En este trabajo, PHASE se utilizó para reconstruir el haplotipo formado por 2 y 5 SNPs a partir de los genotipos obtenidos mediante el análisis por sondas TaqMan en el grupo control.

3. Deleciones y duplicaciones intragénicas

3.1 Caracterización de los puntos de rotura

Las secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de las diferentes deleciones y duplicaciones caracterizadas a nivel de ADN están resumidas en la Tabla 5. Las condiciones de PCR y las enzimas utilizadas en la amplificación de cada caso están resumidas en la Tabla 6. Dependiendo de la enzima utilizada para la amplificación, se prepararon diferentes mezclas de reacción en un volumen final de 25 µl: A) 1X Expand High Fidelity Buffer 3, MgCl₂ 1,5 mM, 10 pmoles de cada cebador, dNTPs 200 µM y 1,5 U Expand High Fidelity Enzyme mix (Roche); B) 1X Expand Long Template Buffer 1, dNTPs 200 µM y 1,5 U Expand Long Template Enzyme mix (Roche); C) 1X tampón de reacción, MgCl₂ 1,5 mM, 10 pmoles de cada cebador, dNTPs 200 µM y 1U Fast Start DNA Polymerase (Roche); D) 1X LA PCR Buffer II, MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 200 µM, 2,5 U TaKaRa LA Taq (Takara).

Tabla 5: Listado de los cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de las diferentes deleciones y duplicaciones caracterizadas a nivel de ADNg.

NF400 (del E1)		
PCR	NF400U	5'-TTCCCCTGTGGACCTTACTGCTAACTG-3'
	NF400 L	5'-ATGCCCCATAGCAATCTGAG-3'
Secuencia	NF400Usec	5'-TAGAGATGGAGTTTCACCACATTGG-3'
	NF400Lsec	5'-GTCTCAAACCTCTGAGGCCCAA-3'
NF765 (del E1)		
PCR	NF400U	5'-TTCCCCTGTGGACCTTACTGCTAACTG-3'
	NF400 L	5'-ATGCCCCATAGCAATCTGAG-3'
Secuencia	NF765sec	5'-CATAGGTCTGAAGTTTAGCA-3'
NF013 (del E2)		
PCR y secuencia	NF_I1U	5'-TCTCCCTTATTGCCACCATTCTCA-3'
	NF_I2L	5'-ACACACTGCAACAGAGGAGCTACA-3'
NF234 (del E23.1)		
PCR	NF_E22U	5'-AGAATTGGCAGACTCCATGC-3'
	NF_E23.2L	5'-TGGTTTTCTCAAGGCTCTC-3'
Secuencia	NF_I23.1Lsec	5'-CTGCTTTATGCCATCAGTGTTA-3'
NF544 (del E25)		
PCR	NF_I23.2U	5'-GATTGATTCAGAGTTTTTATGC-3'
	NF_I26L	5'-GCAAAGTAAAAAGCACTATTC-3'
Secuencia	NF_I24Usec	5'-GGTACCTGATGGACCTTATTTTCA-3'
	NF_I25Lsec	5'-TTGAAAACCAAGAGGGATTTTT-3'

Continuación Tabla 5.

NF620 (del E28)		
PCR	NF_I27bU	5'-ACATCCTGTCATCACCTCAAGT-3'
	NF_E29L	5'-GGACTTTTGTTCGCTCTGCT-3'
Secuencia	NF_E29L	5'-GGACTTTTGTTCGCTCTGCT-3'
NF350 (del E41)		
PCR	NF_I39U	5'-TATTCTACACATTTTTGGTACTT-3'
	NF_I42L	5'-ACATGGAAAATTTTGATAATCCTG-3'
Secuencia	NF_I40Usec	5'-AAGGATCACCCAAAAGTACAAA-3'
	NF_I41Lsec	5'-CCTTCCAAGTGGCTGTCCTA-3'
NF350 (del E42)		
PCR	NF_I40U	TGCTTATTAATCTCTCTGTATATTTC-3'
	NF_I43L	GATTCTAAGAAATGGCTGGAA-3'
Secuencia	NF_I42L	CACAAACATTTTTCCAATACCTA-3'
NF689 (del E32_42)		
PCR	NF_I30U	5'-GTTGATGTGATTTTCATTGACC-3'
	NF_I43L	5'-GATTCTAAGAAATGGCTGGAA-3'
Secuencia	NF_E43Lsec	5'-CCTTTTAGGAGCCTTTGTGTCT-3'
NF109 (dup E39)		
PCR	NF_E39U	5'-AACTTTGCATTGGTTGGACAC-3'
	NF_E39L	5'-GATTCCGGATTGCCATAAATACT-3'
PCR corta y secuencia	NF_DupU	5'-AACTTTGCATTGGTTGGACAC-3'
	NF_DupL	5'-CCATGTATTGTTTATGCTCATTCT-3'

Tabla 6: Condiciones de PCR utilizadas para la caracterización de los puntos de rotura. En la última columna se indica la enzima utilizada en cada caso.

Paciente	Condiciones de PCR	Enzima
NF400 (del E1)	94°C, 3 min + (94°C, 15 seg; 58°C, 30 seg; 68°C, 3 min) X35 + 68°C, 10 min	Expand High Fidelity (Roche)
NF765 (del E1)	94°C, 3 min + (94°C, 15 seg; 58°C, 30 seg; 68°C, 3 min) X35 + 68°C, 10 min	Expand High Fidelity (Roche)
NF013 (del E2)	94°C, 8 min + (94°C, 45 seg; 60°C, 45 seg; 72°C, 1 min) X35 + 72°C, 7min	Fast Start (Roche)
NF234 (del E23.1)	94°C, 8 min + (98°C, 10 seg; 68°C, 10 min) X30 + 72°C, 10 min	TaKaRa LA Taq (Takara)
NF544 (del E25)	94°C, 3 min + (94°C, 15 seg; 56°C, 30 seg; 72°C, 2 min) X35 + 72°C, 10 min	Expand High Fidelity (Roche)
NF620 (del E28)	94°C, 3 min + (94°C, 15 seg; 56°C, 30 seg; 68°C, 3 min) X35 + 68°C, 10 min	Expand High Fidelity (Roche)
NF350 (del E41)	94°C, 3 min + (94°C, 15 seg; 56°C, 30 seg; 68°C, 2 min) X35 + 68°C, 10 min	Expand High Fidelity (Roche)
NF350 (del E42)	94°C, 3 min + (94°C, 15 seg; 56°C, 30 seg; 68°C, 3 min) X35 + 68°C, 10 min	Expand High Fidelity (Roche)
NF689 (del E32_42)	94°C, 3 min + (94°C, 15 seg; 56°C, 30 seg; 68°C, 3 min) X35 + 68°C, 10 min	Expand High Fidelity (Roche)
NF109 (dup E39)	94°C, 8 min + (94°C, 45 seg; 54°C, 45 seg; 72°C, 1 min) X35 + 72°C, 7min	Expand Long Template (Roche)

3.2 Búsqueda de motivos recombinogénicos

Para buscar secuencias repetitivas, elementos LINE, SINE, transposones, etc. utilizamos el programa Repeat Masker (<http://www.repeatmasker.org/>). En los casos en los que ambos puntos de rotura se producían en elementos repetitivos, utilizamos el programa Blast 2 del NCBI para calcular el porcentaje de identidad entre ambos. Para la búsqueda de secuencias palindrómicas utilizamos el programa Palindrome (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::palindrome>) y para analizar la presencia de secuencias capaces de formar estructuras no-B del ADN (repeticiones directas, invertidas, secuencias simétricas, tractos (G)_n...) utilizamos el programa non-B DNA Motif Search Tool (nBMST) v2.0 (<http://nonb.abcc.ncifcrf.gov/apps/site/default>), la herramienta RepeatAround (<http://portugene.com/repeataround.html>) y el programa QGRS Mapper (<http://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/index.php>). Para buscar motivos recombinogénicos previamente descritos (Abeyasinghe *et al.*, 2003) utilizamos el programa Fuzznuc de EMBOS (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/fuzznuc>). En total analizamos 40 motivos de secuencia que están resumidos en la Tabla 7.

Tabla 7: Listado de los motivos de secuencia recombinogénicos.

Nombre del motivo	Secuencia
Elemento χ de <i>E. coli</i>	GCTGGTGG
Ade6-M26	ATGACGT
ARS consensus <i>S. cerevisiae</i>	WTTTATRITTTW
ARS consensus <i>S. pombe</i>	WRTTATTATTAW
Consensus SAR1	AATAAAYAAA
Consensus SAR2	TTWTWTTWTT
Consensus SAR3	WADAWAYAWW
Consensus SAR4	TTWTDTTWWW
Punto caliente consenso de delección	TGRRKM
Sitio de arresto de la ADN polimerasa	WGGAG
DNA polymerase a frameshift hotspot 1	TCCCCC
DNA polymerase a frameshift hotspot 2	CTGGCG
DNA polymerase b frameshift hotspot 1	ACCCWR
DNA polymerase a/b frameshift hotspot 1	ACCCCA
DNA polymerase a/b frameshift hotspot 2	TGGNGT
<i>Drosophila</i> Topoisomerase 2 consensus	GTNWAYATTNATNNR
Heptamer recombination signal	CACAGTG
Human hypervariable minisatellite sequence 1	GGAGGTGGGCAGGARG
Human hypervariable minisatellite sequence 2	AGAGGTGGGCAGGTGG
Human minisatellite core sequence	GGGCAGGARG
Human replication origin consensus	WAWTTDDWWWHDHWGWHMAWTTDHWGWHMAWTT
Human minisatellite conserved sequence/X-like element	GCWGGWGG
Ig heavy chain class switch repeat 1	GAGCT
Ig heavy chain class switch repeat 2	GGGCT
Ig heavy chain class switch repeat 3	GGGGT
Ig heavy chain class switch repeat 4	TGGGG
Ig heavy chain class switch repeat 5	TGAGC

Continuación Tabla 7

Nombre del motivo	Secuencia
Motivo LTR-IS	TGGAAATCCCC
Mariner transposon-like element	GAAAATGAAGCTATTACCCAGGA
Murine MHC deletion hotspot	CAGRCAGR
Murine parvovirus recombination hotspot	CTWTTY
Nonamer recombination signal	ACAAAAACC
Pur-binding site	GGNNGAGGGAGARRRR
Punto caliente de recombinación	CCNCCNTNNCCNC
Retrotransposón	TCATACACCACGCAGGGGTAGAGGACT
Translin-binding site 1	ATGCAG
Translin-binding site 2	GCCCWSSW
Vaccinia topoisomerase I consensus	YCCTT
Vertebrate topoisomerase II consensus	RNYNNCNGYNGKTNYN
XY32 homopurine-pyrimidine H-palindrome motif	AAGGGAGAARGGGTATAGGGRAAGGGAA

4. Estudio de las mutaciones de *splicing*

4.1 Análisis in silico

Para predecir la funcionalidad de las secuencias utilizadas como 5' donadores o 3' aceptores, se utilizaron dos herramientas informáticas: el programa MaxEntScan (http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html) desarrollado por Burge y colaboradores (Yeo and Burge, 2004) y el programa Splice Site Prediction by Neural Network (SSPNN) desarrollado dentro del proyecto Berkeley Drosophila Genome Project (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) (Reese *et al.*, 1997). MaxEntScan valora la funcionalidad de pequeñas secuencias (6 pb para el sitio 5' donador y 23 pb para el 3' aceptor) que contienen un único sitio de *splicing*. Se basa en el Principio de Máxima Entropía y engloba varios modelos probabilísticos de motivos de secuencia como MAXENT (Maximum entropy), MDD (multiple dependence decomposition), MM (first order Markov model) y WMM (weight matrix model). El programa SSPNN identifica todos los posibles sitios de *splicing* presentes en una secuencia.

Para predecir la existencia de elementos ESE en la secuencia codificante de los exones se utilizaron dos programas: el ESEfinder 3.0 (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE>) que predice la presencia de elementos ESE basándose en los motivos de unión de varias proteínas SR (SF2/ASF, SC35, SRp40 y SRp55) que reconocen este tipo de elementos (Cartegni *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2006). El programa RESCUE-ESE (<http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese>) identifica secuencias de hexámeros que se

encuentran con mayor frecuencia en exones que en intrones y en exones con sitios de *splicing* débiles frente a exones con sitios de *splicing* funcionalmente óptimos (Fairbrother *et al.*, 2002).

4.2 Construcción de minigenes

Para la construcción del minigen que contiene el exón 7, se utilizó el vector de expresión pSPL3 que incluye un marcador ampicilina resistente, un segmento SV40 para la replicación y transcripción en células eucariotas, señales de *splicing* HIV-1 tat y un sitio de multiclonaje. El segmento tat contiene un intrón, un sitio 5' donador, otro 3' acceptor y exones flanqueantes (pSPL3 E1 y pSPL3 E2) (Figura 7A).

La construcción del minigen se llevó a cabo siguiendo un protocolo previamente descrito (Botillo *et al.*, 2007). Brevemente, se amplificaron por PCR el exón 7 del gen *NF1* y las secuencias intrónicas flanqueantes (producto final de 680 pb) con los cebadores E7D (5'-cacacactcgagAACAGCTTGTGGGAAGGA-3') y E7R (5'-cacacagatccGGCCCTAATTGCCACATTATT-3') que contienen un extremo 5'-XhoI y 5'-BamHI, respectivamente (en la secuencia de los cebadores E7D y E7R se indican en minúscula los sitios de restricción). La PCR se realizó partiendo de 10 ng del BAC RP11-142O6 (GeneBank: AC079915) en un volumen final de 50 µl que contenía 1X Optimase reaction buffer, MgSO₄ 1,5 mM, 20 pmoles de cada cebador, dNTPs 200 µM y 1,25 U Optimase® Polymerase (Transgenomic). La PCR se llevó a cabo en 35 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 57°C y 1 min a 72°C precedidos de una desnaturalización de 5 min a 95°C y una extensión final de 10 min a 72°C. Se digirieron el producto de PCR y 1 µg del plásmido pSPL3 con 1,5 U de las enzimas de restricción BamHI y XhoI (New England Biolabs). Antes de la ligación, los productos se purificaron utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Para la reacción de ligación, se utilizó una proporción 1:5 de vector e inserto en un volumen final de 10 µl que contenía además 1X Ligation Buffer y 1 U de T4 DNA Ligase (Roche). La reacción se llevó a cabo durante 16 h a 14°C en un baño de agua. Se transformaron 2 µl de la ligación en 50 µl de células XL-1 Blue Competent Cells (Stratagene) siguiendo las instrucciones del fabricante y se plaquearon 200 µl de la transformación en placas de LB y ampicilina durante toda la noche. Se aislaron las colonias y se reestriaron en una nueva placa. Tras una incubación de 12 h en LB líquido con ampicilina, los plásmidos fueron extraídos utilizando el

QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) y secuenciados para verificar la orientación y correcta secuencia del inserto. El constructo final E7-pSPL3 se muestra en la Figura 7B.

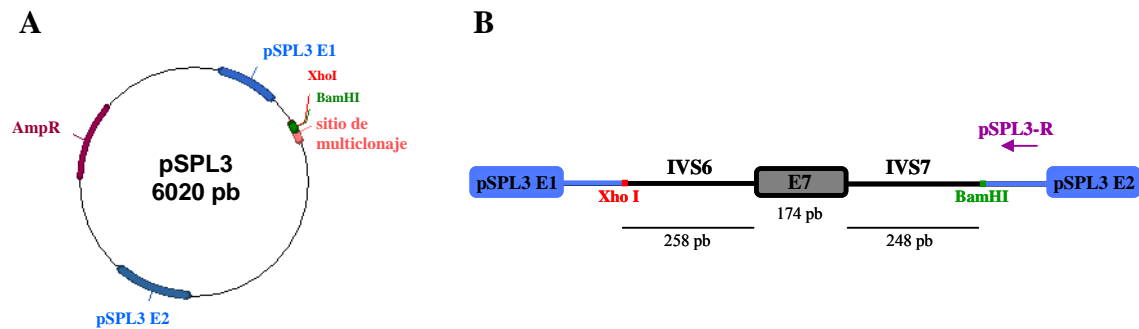


Figura 7: Construcción del minigen E7-pSPL3. **A:** Esquema del vector de expresión pSPL3. *AmpR*: marcador ampicilina resistente. **B:** Detalle de la zona de inserción del exón 7 y los intrones flancos (IVS6 e IVS7). Debajo se indica el tamaño del exón y de los intrones incluidos en el constructo. *pSPL3-R*: cebador utilizado para verificar que la secuencia introducida en el vector es correcta (ver más adelante).

Para el estudio del *splicing* del exón 37 se utilizó el minigen E31-38wt, cortesía del Prof. F. E. Baralle. Este minigen contiene la secuencia de ADN comprendida entre los exones 31 y 38 en el vector de expresión pcDNA3.1 (Baralle *et al.*, 2006).

4.3 Mutagénesis dirigida

Utilizando el minigen E7-pSPL3 como molde se generaron por mutagénesis dirigida los diferentes cambios de interés. Se utilizó el programa QuickChange Primer Design (Agilent Technologies) para el diseño de cebadores. Se utilizaron 25 ng del minigen silvestre en una reacción a un volumen final de 50 μ l que contenía 1X tampón de reacción, dNTPs 200 μ M, 10 pmol de cada cebador y 2,5 U Pfu Turbo DNA Polymerase (Stratagene). Todas las reacciones de mutagénesis se llevaron a cabo en 18 ciclos de 30 seg a 95°C, 1 min a 55°C y 5 min a 68°C precedidos por una desnaturalización de 30 seg a 95°C y una extensión final de 10 min a 68°C. Se digirieron los productos con 20 U de DpnI (Fermentas) durante 2 h a 37°C y posteriormente se inactivó la enzima a 80°C durante 20 min. Se transformaron 2 μ l del producto de la mutagénesis en 50 μ l de células XL-1 Blue Competent Cells (Stratagene). Se verificó por secuenciación directa la introducción de los diferentes cambios en el minigen silvestre utilizando el cebador pSPL3-R (5'-GCCCAAACATTATGTACCTCTGT-3')

(Figura 7B). Las secuencias de todos los cebadores utilizados para la mutagénesis están descritas en la Tabla 8.

Tabla 8: Secuencia de los cebadores utilizados en los experimentos de mutagénesis dirigida en el minigen E7-pSPL3.

Mutación		Secuencia
M908T>C	D	5'-AGTTATTTCTGGACAGTCCACGAAAAGCTCTTGCTGG-3'
	R	5'-CCAGCAAGAGCTTTTCGTGGACTGTCCAGAAATAACT-3'
M909A>C	D	5'-CTGTAGAAGTTATTTCTGGACAGTCTCCGAAAAGCTTTGC-3'
	R	5'-GCAAGAGCTTTTCGAGACTGTCCAGAAATAACTTCTACAG-3'
M909A>T	D	5'-CTGTAGAAGTTATTTCTGGACAGTCTTCGAAAAGCTTTGC-3'
	R	5'-GCAAGAGCTTTTCGAAAGACTGTCCAGAAATAACTTCTACAG-3'
M909A>G	D	5'-CTGTAGAAGTTATTTCTGGACAGTCTCGGAAAAGCTTTGC-3'
	R	5'-GCAAGAGCTTTTCGAGACTGTCCAGAAATAACTTCTACAG-3'
M910C>T	D	5'-TTATTTCTGGACAGTCTATGAAAAGCTCTTGCTGGCC-3'
	R	5'-GGCCAGCAAGAGCTTTTCATAGACTGTCCAGAAATAA-3'
M910C>A	D	5'-TTATTTCTGGACAGTCTAAGAAAAGCTCTTGCTGGCC-3'
	R	5'-GGCCAGCAAGAGCTTTTCCTAGACTGTCCAGAAATAA-3'
M910C>G	D	5'-TATTTCTGGACAGTCTAGGAAAAGCTCTTGCTGGC-3'
	R	5'-GCCAGCAAGAGCTTTTCCTAGACTGTCCAGAAATA-3'
M911G>C	D	5'-ATTTCTGGACAGTCTACAAAAGCTCTTGCTGGCC-3'
	R	5'-GGCCAGCAAGAGCTTTTGTAGACTGTCCAGAAAT-3'
M911G>T	D	5'-ATTTCTGGACAGTCTACTAAAAGCTCTTGCTGGCC-3'
	R	5'-GGCCAGCAAGAGCTTTTAGTAGACTGTCCAGAAAT-3'
M911G>A	D	5'-ATTTCTGGACAGTCTACAAAAGCTCTTGCTGGCC-3'
	R	5'-GGCCAGCAAGAGCTTTTGTAGACTGTCCAGAAAT-3'
M912A>C	D	5'-TTCTGGACAGTCTACGCAAAGCTCTTGCTGGCC-3'
	R	5'-GGCCAGCAAGAGCTTTGCGTAGACTGTCCAGAA-3'
M939T>A	D	5'-GGCCATGGAGGAAGAGGCAGCTGACAGA-3'
	R	5'-TCTGTCAGCTGCCTTCTTCTCCATGGCC-3'
M940A>T	D	5'-TGCTGGCCATGGAGGAAGTTGGCAGCTGAC-3'
	R	5'-GTCAGCTGCCAATTCTCCATGGCCAGCA-3'
M941G>T	D	5'-CTGGCCATGGAGGAAGTATGCAGCTGACAG-3'
	R	5'-CTGTCAGCTGCATACTTCTCCATGGCCAG-3'
M942G>C	D	5'-GCCATGGAGGAAGTAGCCAGCTGACAGAAAGTG-3'
	R	5'-CACTTTCTGTCAGCTGCTACTTCTCCATGGC-3'
M943C>T	D	5'-CCATGGAGGAAGTAGGTAGCTGACAGAAAGTGC-3'
	R	5'-GCACTTTCTGTCAGCTACCTACTTCTCCATGG-3'
M943C>A	D	5'-CCATGGAGGAAGTAGGAGCTGACAGAAAGTGC-3'
	R	5'-GCACTTTCTGTCAGCTTCTACTTCTCCATGG-3'
M943C>G	D	5'-CCATGGAGGAAGTAGGGAGCTGACAGAAAGTGC-3'
	R	5'-GCACTTTCTGTCAGCTCCCTACTTCTCCATGG-3'
M944A>C	D	5'-CATGGAGGAAGTAGGCCGCTGACAGAAAGTGTCT-3'
	R	5'-AGCACTTTCTGTCAGCGCCTACTTCTCCATG-3'
M944A>G	D	5'-CATGGAGGAAGTAGGCCGCTGACAGAAAGTGTCT-3'
	R	5'-AGCACTTTCTGTCAGCGCCTACTTCTCCATG-3'
M944A>T	D	5'-CATGGAGGAAGTAGGCTGCTGACAGAAAGTGTCT-3'
	R	5'-AGCACTTTCTGTCAGAGCCTACTTCTCCATG-3'
M945G>A	D	5'-CATGGAGGAAGTAGGCCAAGTACAGAAAGTGTCTG-3'
	R	5'-GCAGCACTTTCTGTCAGTTCCTACTTCTCCATG-3'
M945G>C	D	5'-ATGGAGGAAGTAGGCACTGACAGAAAGTGTCTG-3'
	R	5'-CAGCACTTTCTGTCAGGTGCCTACTTCTCCAT-3'
M945G>T	D	5'-CATGGAGGAAGTAGGCATCTGACAGAAAGTGTCTG-3'
	R	5'-GCAGCACTTTCTGTCAGATGCCTACTTCTCCATG-3'
M946C>A	D	5'-TGGAGGAAGTAGGCAGATGACAGAAAGTGTCTG-3'
	R	5'-GCAGCACTTTCTGTCACTGCCTACTTCTCCA-3'

Continuación Tabla 8.

Mutación	Secuencia
M946C>G	D 5'-GGAGGAAGTAGGCAG G TGACAGAAAGTGCTG-3' R 5'-CAGCACTTTCTGTCA C CTGCCTACTTCCTCC-3'
M946C>T	D 5'-TGGAGGAAGTAGGCAG T TGACAGAAAGTGCTGC-3' R 5'-GCAGCACTTTCTGTCA A CTGCCTACTTCCTCCA-3'
M947T>C	D 5'-GAGGAAGTAGGCAG C GACAGAAAGTGCTGC-3' R 5'-GCAGCACTTTCTGT C GCTGCCTACTTCCTC-3'
M948G>T	D 5'-GGAGGAAGTAGGCAG T ACAGAAAGTGCTGCA-3' R 5'-TGCAGCACTTTCTGT A AGCTGCCTACTTCCTCC-3'
M949A>C	D 5'-GAGGAAGTAGGCAG C CCAGAAAGTGCTGCAATT-3' R 5'-AATTGCAGCACTTTCTG G CAGCTGCCTACTTCCTC-3'
M950C>T	D 5'-GGAGGAAGTAGGCAG T GATAGAAAGTGCTGCAAT-3' R 5'-ATTGCAGCACTTTCT A TCAGCTGCCTACTTCCTCC-3'
M1005T>C	D 5'-AAACTGTGTAAAGCAAGTACTTACATCA A CTGGGAAGATAACTCTG-3' R 5'-CAGAGTTATCTTCC A GTTGATGTAAGTACTTGCTTTACACAGTTT-3'
M1005T>A	D 5'-AAACTGTGTAAAGCAAGTACTTACATCA A TGGGAAGATAACTCTG-3' R 5'-CAGAGTTATCTTCC A TTTGATGTAAGTACTTGCTTTACACAGTTT-3'
M1005T>G	D 5'-AAACTGTGTAAAGCAAGTACTTACATCA A GTTGGGAAGATAACTCTG-3' R 5'-CAGAGTTATCTTCC A CTTGATGTAAGTACTTGCTTTACACAGTTT-3'
M1006T>C	D 5'-ACTGTGTAAAGCAAGTACTTACATCA A TGGGAAGATAACTCTG-3' R 5'-CAGAGTTATCTTCC G ATTGATGTAAGTACTTGCTTTACACAGT-3'
M1006T>A	D 5'-ACTGTGTAAAGCAAGTACTTACATCA A TGGGAAGATAACTCTG-3' R 5'-CAGAGTTATCTTCC T ATTGATGTAAGTACTTGCTTTACACAGT-3'
M1006T>G	D 5'-ACTGTGTAAAGCAAGTACTTACATCA A TGGGAAGATAACTCTG-3' R 5'-CAGAGTTATCTTCC C ATTGATGTAAGTACTTGCTTTACACAGT-3'
M1007G>A	D 5'-AAACTGTGTAAAGCAAGTACTTACATCA A TAGGAAGATAACTCTGTC-3' R 5'-GACAGAGTTATCTTCC T AATTGATGTAAGTACTTGCTTTACACAGTTT-3'
M1007G>T	D 5'-AAACTGTGTAAAGCAAGTACTTACATCA A TGGGAAGATAACTCTGTC-3' R 5'-GACAGAGTTATCTTCC A AATTGATGTAAGTACTTGCTTTACACAGTTT-3'
M1007G>C	D 5'-ACTGTGTAAAGCAAGTACTTACATCA A TGGGAAGATAACTCTGT-3' R 5'-ACAGAGTTATCTTCC G AATTGATGTAAGTACTTGCTTTACACAGT-3'
M1039C>T	D 5'-ATAACTCTGTCATTTTCCTACTTGT T AGTCCATGGTGGTTG-3' R 5'-CAACCACCATGGACT A AACAAGTAGGAAAATGACAGAGTTAT-3'
M1039C>A	D 5'-ATAACTCTGTCATTTTCCTACTTGT A AGTCCATGGTGGTTG-3' R 5'-CAACCACCATGGACT T AACAAGTAGGAAAATGACAGAGTTAT-3'
M1039C>G	D 5'-ATAACTCTGTCATTTTCCTACTTGT G AGTCCATGGTGGTTG-3' R 5'-ACCACCATGGACT C AACAAGTAGGAAAATGACAGAG-3'
M3'ss aa>tt	D 5'-CTTCATATATTATCTTATCGCTATATTTG TT TTCTGTAGAAGTTATTCTGGACAGTCTA-3' R 5'-TAGACTGTCCAGAAATAACTTCTACAGAA AA CAAATATAGCGATAAGATAATATATGAAG-3'
M1020dupT	D 5'-CATCAATTGGGAAGATAACT T TGTCATTTTCCTACTTGTTCAGT-3' R 5'-ACTGAACAAGTAGGAAAATGAC A AGAGTTATCTTCCCAATTGATG-3'

Si siguiendo este mismo protocolo se generaron varias mutaciones en el minigen E31-38wt (Tabla 9).

Tabla 9: Secuencia de los cebadores utilizados en los experimentos de mutagénesis dirigida en el minigen E31-38wt.

Mutación		Secuencia
M6792C>G	D	5'-CTTAAAAGGACCTGACACTTAGAACAGTCAAGTTCTGATAGA-3'
	R	5'-TCTATCAGAACTTGACTGTTCTAAGTGTCAAGTCCCTTTTAAG-3'
M6792C>A	D	5'-GCTTAAAAGGACCTGACACTTAAACAGTCAAGTTCTGATAGAA-3'
	R	5'-TTCTATCAGAACTTGACTGTTTAAAGTGTCAAGTCCCTTTTAAGC-3'
M6798T>G	D	5'-GACCTGACACTTACAACAGGCAAGTTCTGATAGAAGCTA-3'
	R	5'-TAGCTTCTATCAGAACTTGCTGTTGTAAGTGTCAAGTCC-3'
M6799C>T	D	5'-GACCTGACACTTACAACAGTTAAGTTCTGATAGAAGCTACA-3'
	R	5'-TGTAGCTTCTATCAGAACTTAACTGTTGTAAGTGTCAAGTCC-3'
M6792/6799*	D	5'-GGACCTGACACTTAAACAGTTAAGTTCTGATAGAAGCTACAG-3'
	R	5'-CTGTAGCTTCTATCAGAACTTAACTGTTTAAAGTGTCAAGTCC-3'
M6800A>C	D	5'-CCTGACACTTACAACAGTCCAGTTCTGATAGAAGCTACA-3'
	R	5'-TGTAGCTTCTATCAGAACTGGACTGTTGTAAGTGTCAAGG-3'
M6801A>G	D	5'-CTGACACTTACAACAGTCAAGTTCTGATAGAAGCTACAG-3'
	R	5'-CTGTAGCTTCTATCAGAACTGACTGTTGTAAGTGTCAAG-3'
M6802G>T	D	5'-GGACCTGACACTTACAACAGTCAATTCTGATAGAAGCTAC-3'
	R	5'-GTAGCTTCTATCAGAAATTGACTGTTGTAAGTGTCAAGTCC-3'

* Para esta mutagénesis se utilizó el minigen E31-38 M6792C>A

4.4 Transfección en células HeLa, extracción de ARN y análisis de transcritos

Se transfectaron distintas cantidades de los minigenes (25-500 ng) en $2,5 \times 10^6$ de células HeLa utilizando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras incubar las placas durante 24h a 37°C, se lavaron las células dos veces con PBS 1X y se extrajo el ARN con TRIzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se trató 1 µg de ARN total con DNase I (Invitrogen) para eliminar los restos de ADN que hubieran quedado como contaminantes durante la extracción y se sintetizó la cadena complementaria de ADN (ver el apartado 1.3).

Para los ensayos de sobreexpresión se utilizaron plásmidos de expresión que contenían la secuencia de diferentes proteínas SR (SRp20, SRp30, SRp40, SRp55, SRp75, SC35 y SF2). Estos plásmidos fueron cortesía del Prof. F. E. Baralle. En estos experimentos se cotransfectaron 250 ng de los minigenes E7-pSPL3 silvestres y mutantes con cantidades variables de los plásmidos (0,25-1 µg) que contenían las proteínas SR, igualando con vector vacío la concentración final de ADN transfectada.

Para analizar la proporción de transcritos derivados del minigen que incluían o eliminaban el exón 7 se amplificó por PCR el minigen procesado utilizando los cebadores SD (5'-TCTGAGTCACCTGGACAACC-3') y SA (5'-

ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC-3') (Figura 8). El cebador SD estaba marcado en 6-carboxifluoresceína (6-FAM). Para la reacción de PCR se utilizó 1 µl del ADNc en un volumen final de 15 µl que contenía 1X tampón de reacción, MgCl₂ 1,5 mM, 10 pmoles de cada cebador, dNTPs 200 µM y 1U Fast Start DNA Polymerase (Roche). Para mantener las condiciones semicuantitativas, la PCR se llevó a cabo en 28 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 58°C y 45 seg a 72°C precedidos por una desnaturalización de 8 min a 95°C y una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de PCR se separaron por electroforesis capilar en el ABI3100 (Applied Biosystems) y se cuantificó la proporción de transcritos que incluían (FL) o eliminaban (SK) el exón 7 midiendo las RPAs. Para calcular el porcentaje de transcritos que incluían el exón 7 (FL) se aplicó la siguiente fórmula: $(FL/(FL+SK)) \times 100$. Todos los experimentos se realizaron (al menos) por triplicado.



Figura 8: Estrategia de cuantificación de los transcritos derivados el minigen E7-pSPL3. El cebador directo (SD) está marcado en 6-carboxifluoresceína (6-FAM). SA: cebador reverso; FL: transcritos que incluyen el exón 7; SK: transcritos que eliminan el exón.

Siguiendo esta misma estrategia, se cuantificó la proporción de transcritos *full-length*, con *skipping* del exón 37 y con *skipping* de los exones 36 y 37, derivados del minigen E31-38wt, utilizando los cebadores SD_E37 (5'-GGAGGCATGCATGAGAGATA-3'), que está localizado en la unión entre los exones 34 y 35 y SA_E37 (5'-CTGATCAGCGAGCTCTAGCA-3'), en el plásmido. También se llevaron a cabo ensayos de sobreexpresión de las proteínas SR descritas anteriormente.

4.5 Preparación de sondas de ARN y pull-down de proteínas nucleares

Se diseñaron cebadores complementarios entre sí para sintetizar sondas de ARN de 20-28 pb que contuvieran las diferentes mutaciones de interés en los exones 7 y 37 (Tabla 10). El cebador directo contiene en su extremo 5' una secuencia diana para la T7 ARN polimerasa (5'-TACGTAATACGACTCACTATAGG-3') para la

transcripción *in vitro*. Se realizó una amplificación por PCR en 5 tubos a un volumen final de 100 μ l que contenía 1X tampón de reacción, $MgCl_2$ 1,5 mM, 10 pmoles de cada cebador, dNTPs 200 μ M y 1U Fast Start DNA Polymerase (Roche). La reacción de PCR se llevó a cabo en 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 48°C y 1 min a 72°C, precedido por una desnaturalización de 2 min a 94°C y una extensión final de 7 min a 72°C. Se purificó el producto de PCR mediante precipitación con etanol y posteriormente se utilizaron ~2 μ g para la reacción de transcripción *in vitro* que contenía 1X tampón de reacción, DTT 10 mM, NTPs 15 mM y 2,5 U T7 RNA Polymerase (Stratagene) en un volumen final de 20 μ l (cada reacción se realizó por triplicado). Se incubó la mezcla durante 2 h a 37°C y posteriormente se añadieron 2 U de DNase I (Invitrogen) (en un volumen final de 60 μ l) durante 30 min a 37°C. Se purificó el ARN mediante una precipitación con fenol/cloroformo y se resuspendió en un volumen final de 30-50 μ l de agua. Con este procedimiento se obtuvo alrededor de 1 μ g/ μ l de ARN.

El ARN se incubó con sodio m-peryodato 5 mM (Sigma) diluido en acetato sódico 0.1 M pH 5, en un volumen final de 400 μ l, durante 1 h en un rotor vertical en oscuridad. Por otro lado, se prepararon 100 μ l de microesferas de agarosa (Adipic acid dihydrazide-agarose beads, Sigma) que se lavaron 3 veces con 10 ml de acetato sódico 0.1 M pH 5. Se resuspendieron las microesferas en 400 μ l de acetato sódico 0,1 M pH 5 y se mezclaron con los 400 μ l de ARN previamente tratado con peryodato. También se puso un control negativo sin sonda de ARN. Se incubó durante 12 h en un rotor vertical en oscuridad a 4°C. Las microesferas unidas a ARN se separaron por centrifugación y se lavaron 2 veces con 1 ml de NaCl 2M y 3 veces con 1 ml de solución D que contenía: HEPES 20 mM pH 7.5, KCl 100 mM, EDTA 0,2 mM, DTT 0,5 mM y glicerol 6%. Tras los lavados, las microesferas se incubaron durante 30 min en un rotor en oscuridad con 0.6 mg de extracto nuclear de células HeLa en una mezcla que además contenía, 40 μ l KCl 1M, 40 μ l de la solución D10X (HEPES 200 mM pH 7.5, EDTA 2 mM, DTT 5 mM y glicerol 60%) y 1,5 mg/ml de heparina. Posteriormente se lavó la mezcla 6 veces con 1 ml de solución D para eliminar todos los restos de proteínas que no se hubieran unido al ARN. Tras la última centrifugación, se incubaron las muestras durante 5 min a 90°C con un tampón de carga para eluir las proteínas que posteriormente se separaron en un gel de SDS-PAGE al 10%.

Tabla 10: Secuencia de los cebadores utilizados para la síntesis de sondas de ARN.

Sonda	Cebador	Secuencia	Tamaño
S910C	T7_910C_WT R_910C_WT	TACGTAATACGACTCAGCTATAGGTAATTTCTGGACAGTCTACGA ACACACACACACACACAGAGCTTTTCGTAGACTGTCCAGAAA	28 pb
S910T	T7_910T R_910T	TACGTAATACGACTCAGCTATAGGTAATTTCTGGACAGTCTATGA ACACACACACACACACAGAGCTTTTCATAGACTGTCCAGAAA	
S910G	T7_910G R_910G	TACGTAATACGACTCAGCTATAGGTAATTTCTGGACAGTCTAGGA ACACACACACACACACAGAGCTTTTCCTAGACTGTCCAGAAA	
S910A	T7_910A R_910A	TACGTAATACGACTCAGCTATAGGTAATTTCTGGACAGTCTAAGA ACACACACACACACAGAGCTTTTCTTAGACTGTCCAGAAA	
S943_946	T7_943_946_WT R_943_946_WT	TACGTAATACGACTCAGCTATAGGTAATTTCTGGACAGTCTACAGAA ACACACACACACACATTCGTCAAGCTGCCTACTTC	
S943T	T7_943T R_943T	TACGTAATACGACTCAGCTATAGGTAATTTCTGGACAGTCTACAGAA ACACACACACACACATTCGTCAAGCTGCCTACTTC	
S945A	T7_945A R_945A	TACGTAATACGACTCAGCTATAGGTAATTTCTGGACAGTCTACAGAA ACACACACACACACATTCGTCAAGCTGCCTACTTC	
S946A	T7_946A R_946A	TACGTAATACGACTCAGCTATAGGTAATTTCTGGACAGTCTACAGAA ACACACACACACACATTCGTCAAGCTGCCTACTTC	
S1007G	T7_1007G_WT R_1007G_WT	TACGTAATACGACTCAGCTATAGGTAATTTCTGGACAGTCTACAGAA ACACACACACACACAGAGCTTTTCGTCAAGCTGCCTACTTC	24 pb
S1007A	T7_1007A R_1007A	TACGTAATACGACTCAGCTATAGGTAATTTCTGGACAGTCTACAGAA ACACACACACACACAGAGCTTTTCGTCAAGCTGCCTACTTC	
S1007T	T7_1007T R_1007T	TACGTAATACGACTCAGCTATAGGTAATTTCTGGACAGTCTACAGAA ACACACACACACACAGAGCTTTTCGTCAAGCTGCCTACTTC	
S1007C	T7_1007C R_1007C	TACGTAATACGACTCAGCTATAGGTAATTTCTGGACAGTCTACAGAA ACACACACACACACAGAGCTTTTCGTCAAGCTGCCTACTTC	
S6801A	T7_6801A_WT R_6801A_WT	TACGTAATACGACTCAGCTATAGGTAATTTCTGGACAGTCTACAGAA ACACACACACACACAGAGCTTTTCGTCAAGCTGCCTACTTC	
S6801G	T76801G R6801G	TACGTAATACGACTCAGCTATAGGTAATTTCTGGACAGTCTACAGAA ACACACACACACACAGAGCTTTTCGTCAAGCTGCCTACTTC	
		TACGTAATACGACTCAGCTATAGGTAATTTCTGGACAGTCTACAGAA ACACACACACACACAGAGCTTTTCGTCAAGCTGCCTACTTC	

La secuencia en negrita en el cebador directo (T7) indica la secuencia del promotor para el inicio de transcripción de la polimerasa T7. La secuencia en negrita en el cebador reverso (R) indica la secuencia de unión para TDP-43 que se utiliza como control de carga en los experimentos posteriores de Western Blot.

4.6 Western-Blot

Las muestras separadas en el gel de SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Hybond-C Extra Nitrocellulose, GE Healthcare) durante 90 min a 200 mA. Posteriormente se bloqueó la membrana durante 1 h con leche al 5% o con Western Blocking Reagent (Roche) al 1% (dependiendo del anticuerpo primario que posteriormente se fuera a utilizar). Se incubó la membrana durante 3 h con una dilución 1:1000 del anticuerpo primario y tras realizar 3 lavados de 10 min con PBS o TBS/Tween al 0,1%, se incubó nuevamente la membrana con una dilución 1:2000 del anticuerpo secundario durante 1 h. Los anticuerpos primarios utilizados se resumen en la Tabla 11. Para el revelado se utilizó la solución Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 11: Listado de los anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de Western Blot.

Anticuerpo 1°	Origen	Fuente	Comentarios
IH4	ratón	Invitrogen (33-9400)	Anticuerpo anti todas las proteínas SR
SRp40	ratón	Abcam (ab67175)	Policlonal
SF2	ratón	Invitrogen (32-4500)	
SC35	conejo	Abcam (ab116103)	Policlonal
Tra2-B	conejo	Prof. F.E. Baralle	
hnRNPA1	ratón	Prof. F.E. Baralle	
hnRNPA2	ratón	Prof. F.E. Baralle	
hnRNPH	conejo	Prof. F.E. Baralle	
DAZAP-1	conejo	Prof. F.E. Baralle	
PTB-C	conejo	Prof. F.E. Baralle	
TDP-43	conejo	Prof. F.E. Baralle	

4.7 Ensayo de retardo en la movilidad electroforética (EMSA)

Para el experimento de EMSA se utilizaron las sondas S1007G, S1007A, S1007T y S1007C, descritas en la Tabla 10. Para sintetizar las sondas de ARN se siguió el mismo protocolo descrito en el apartado 4.5, utilizando en este caso 2 μ l de (P^{32})-UTP. Se purificó la sonda utilizando columnas Nick Column (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. La sonda radiactiva eluida se purificó con etanol y se resuspendió en agua. La reacción de EMSA se llevó a cabo en tampón de unión (HEPES 5,2 mM pH 7,5, $MgCl_2$ 1 mM, acetato de magnesio 0,8 mM, DTT 0,52 mM, glicerol 10%, ATP 0,75 mM, GTP 1 mM) con 2 μ g de proteína hnRNPA1 y 1 μ l de

cada sonda radiactiva en un volumen final de 20 μ l. Para cada sonda se añadió un control que no contenía proteína como control negativo. Se incubó la reacción a temperatura ambiente durante 30 min y se añadieron 2 μ l de tampón de carga (HEPES 200 mM pH 7,5, EDTA 2 mM, DTT 5 mM y glicerol 60%). Las muestras se separaron en un gel de acrilamida al 6% durante 2 h a 120 V a 4°C. El gel se secó a 80°C durante 1 h en vacío antes de la autorradiografía. Se determinó la unión de hnRNPA1 a las sondas por la aparición de una banda de retraso en el gel.

4.8 Análisis cuantitativo de la doble mutación c.[6792C>A;c.6799C>T]

Primero, realizamos un análisis semicuantitativo de los transcritos que portaban el *skipping* del exón 37 en muestras con la doble mutación, con el cambio puntual c.6792C>G o con el cambio c.6792C>A. Para ello, se amplificó en condiciones cuantitativas el ADNc desde el exón 36 al 38 utilizando los cebadores NF1E36F marcado con FAM (5'-FAM- ATAATCCATCCCTGCAACCA-3') y NF1E38R 5'-AAGAAGTGCGGTACCTGCTG-3'). Los productos de PCR se separaron por electroforesis en un aparato ABI3100 (Applied Biosystems) y se cuantificaron midiendo las RPAs utilizando el GeneScan Analysis software (Applied Biosystems) correspondientes a los alelos *full-length* (FL) y alelos con *skipping* del exón 37 (Δ E37). La proporción relativa de transcritos con *skipping* se calculó de la siguiente manera: $(\Delta E37/FL+\Delta E37) \times 100$. Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces. Para el análisis estadístico se realizó una prueba t de student.

Por otro lado, calculamos la proporción relativa de transcritos FL silvestres o mutantes mediante un análisis de SNaPshot (ABI Prism SnaPshot™ Multiplex Kit, Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se amplificó el ADNc en condiciones cuantitativas utilizando los cebadores NF1E36F (sin marcar) y NFE37R (5'-TGGCTGTAATTTGGTTAGTGC-3'), favoreciendo de este modo la amplificación del alelo FL. Se amplificó el ADNg de los mismos individuos con los cebadores 5'-CATCCGAGATTCAGTTTAGGAG-3' en el intrón 36 y 5'-AAGTAACATTCAACTGATACCC-3' en el intrón 37. Para el SNaPshot se utilizaron dos cebadores, P6792 (5'-ACTGTAGCTTCTATCAGAACTT-3') y P6799 (5'-TACTGTAGCTTCTATCAGAAC-3') y se cuantificaron los productos de la extensión de cebadores midiendo las RPAs correspondientes a los transcritos FL silvestres y mutantes. La proporción relativa de transcritos FL a nivel de ADNc se

normalizó utilizando los resultados correspondientes al ADN_g para cada muestra. Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces. Para el análisis estadístico se realizó una prueba t de student.

Resultados

1. Análisis mutacional

Hemos desarrollado un protocolo para el diagnóstico genético de la Neurofibromatosis tipo 1. Este protocolo, que presenta una especificidad del 100% y una tasa de detección de mutaciones del 95%, fue validado en una cohorte de 56 pacientes (Valero *et al.*, 2011) y se utiliza como rutina diagnóstica en nuestro laboratorio.

El análisis mutacional del gen *NFI* está basado en el estudio del ADNg y del ADNc obtenido mediante retrotranscripción del ARNm. La detección de las CNV (variaciones en el número de copias) en el ADNg se efectúa mediante la técnica cuantitativa de MLPA utilizando tres “salsas” específicas para el análisis del *locus NFI*. La búsqueda de mutaciones puntuales en la secuencia codificante del gen (ADNc) se realiza mediante la técnica de DHPLC (*Denaturing High-Performance Liquid Chromatography*). Aquellas muestras que presentan un cromatograma alterado, son analizadas por secuenciación y posteriormente la mutación es confirmada a nivel de ADNg. Este tipo de análisis, basado en el estudio del ADNc tiene un beneficio claro: permite conocer la naturaleza de los cambios puntuales que producen alteraciones en el patrón de *splicing* del ARNm. Dicha información no se consigue cuando se analiza ADNg.

Hasta la fecha hemos identificado 245 mutaciones patogénicas en 327 pacientes independientes, de los cuales 216 son casos esporádicos (66%), 89 familiares (27%) y 22 casos (7%) de estatus desconocido.

En total, el espectro de mutaciones comprende 24 microdeleciones (7,3%), 17 deleciones o duplicaciones de uno o varios exones (5,2%), 80 mutaciones *nonsense* (24,5%), 97 pequeñas deleciones o inserciones (29,7%) –de las cuales 94 producen un codón de parada prematuro y tres son deleciones en fase-, 28 mutaciones *missense* (8,5%) y 81 mutaciones de *splicing* (24,8%).

Las mutaciones en *NFI* están distribuidas a lo largo de todo el gen y no existen puntos calientes de mutación. Únicamente identificamos 28 alteraciones que aparecen en más de un paciente (Tabla 12). Entre éstas se encuentra la mutación c.2970_2972delAAT (en el exón 17) identificada en dos individuos independientes. En ambos casos observamos la misma correlación genotipo-fenotipo descrita previamente en otros pacientes que portan esta misma mutación (Upadhyaya *et al.*, 2007). La

Resultados

mutación más prevalente en nuestra cohorte es la c.1466A>G, identificada en 8 pacientes, que no presentan un fenotipo particular.

Tabla 12: Listado de las 28 mutaciones recurrentes identificadas en nuestra cohorte. En la última columna se indica el número de casos independientes en los que se ha identificado cada mutación.

	Mutación en ADNg	Mutación en ARNm	Efecto en proteína	Nº de casos
1	c.204+1G>A	r.100_204del	p.Val34_Met68del	4
2	c.233delA	r.233delu	p.Asn78Ilefs*7	2
3	c.910C>T	r.[889_1062del;910c>u]	p.[Lys297_Lys354del,Arg304*]	3
4	c.1019_1020delCT	r.1019_1020delcu	p.Ser340Valfs*12	2
5	c.1260+1604A>G	r.1260_1261ins1260+1605_1261-324	p.Ser421Leufs*4	2
6	c.1318C>T	r.1318c>u	p.Arg440*	5
7	c.1466A>G	r.[1466a>g;1466_1527del]	p.[Tyr489Cys;Tyr489*]	8
8	c.1541_1542delAG	r.1541_1542delag	p.Gln514Argfs*43	4
9	c.1721+3A>G	r.1642_1721del	p.Ala548Leufs*13	2
10	c.1756_1759delACTA	r.1756_1759delacua	p.Thr586Valfs*18	4
11	c.2033_2034insC	r.2033_2034insc	p.Ile679Aspfs*21	5
12	c.2041C>T	r.2041c>u	p.Arg681*	2
13	c.2446C>T	r.2446c>u	p.Arg816*	4
14	c.2540T>C	r.2540u>c	p.Leu847Pro	2
15	c.2674delA	r.2674dela	p.Ser892Alafs*10	2
16	c.2970_2972delAAT	r.2970_2972delaa	p.Met992del	2
17	c.3826C>T	r.3826c>u	p.Arg1276*	5
18	c.4084C>T	r.4084c>u	p.Arg1362*	2
19	c.4306A>C	r.4306a>c	p.Lys1436Gln	2
20	c.4306A>G	r.4306a>g	p.Lys1436Glu	2
21	c.4495C>T	r.4495c>u	p.Gln1499*	2
22	c.4537C>T	r.4537c>u	p.Arg1513*	7
23	c.5242C>T	r.5242c>u	p.Arg1748*	3
24	c.5839C>T	r.5839c>u	p.Arg1947*	2
25	c.5944-5A>G	r.5943_5944ins5944-4_5944-1	p.Ile1982Leufs*7	2
26	c.6791dupA	r.6757_6858del	p.Ala2253_Lys2286del	2
27	c.6792C>A	r.6757_6858del	p.[Tyr2264*,Ala2253_Lys2286del]	4
28	c.7486C>T	r.7486c>u	p.Arg2496*	3

En el caso de los cambios *missense*, es necesario establecer su naturaleza patogénica. Para ello realizamos un análisis de segregación de la mutación y la enfermedad en los casos familiares y en los esporádicos se confirmó la ausencia de la mutación en los progenitores del probando. En dos casos, se recurrió a un análisis *in silico* de las mutaciones mediante los programas de predicción Polyphen-2 y SIFT. Estas aproximaciones, nos permitieron confirmar la naturaleza patogénica de los 28 cambios *missense* identificados en nuestra cohorte de pacientes.

Por último, cabe destacar la elevada proporción de mutaciones puntuales que alteran el *splicing* (24,8%) caracterizadas en nuestro grupo. Analizaremos en detalle estas mutaciones en el apartado 4.

2. Estudio de microdeleciones

2.1 Caracterización de las microdeleciones NF1

Mediante análisis de MLPA, utilizando la SALSA P122 C1, identificamos 24 grandes deleciones en la región NF1: 18 deleciones tipo 1 (18/24; 75%), tres deleciones tipo 2 (3/24; 12,5%) y tres deleciones atípicas (3/24; 12,5%) (Figura 9). Hay que destacar que únicamente uno de los tres pacientes con deleción tipo 2 (NF464) mostraba mosaicismo en sangre, según los resultados del análisis MLPA.

Con el objeto de definir con mayor precisión los puntos de rotura de las microdeleciones realizamos un *array-CGH* en varios casos (Figura 10). En las deleciones tipo 1, la distribución de las sondas de MLPA no permite caracterizar con precisión si las roturas ocurren dentro de las secuencias parálogas NF1-REPa y NF1-REPc o en regiones cercanas. Mediante un *array-CGH* confirmamos que los puntos de rotura de las 5 deleciones tipo 1 analizadas se localizan en dichas secuencias parálogas (Figura 10A). Se analizaron también dos de las deleciones tipo 2 y en ambos casos se confirmó que la recombinación ocurría entre *SUZ12P* y *SUZ12*. Al igual que en el MLPA, el *array* confirmó que el paciente NF464 es mosaico para la deleción, en sangre (Figura 10B).

Por otro lado, mediante MLPA identificamos tres deleciones atípicas (Figura 9). Dos casos (NF034 y NF343) fueron analizados mediante un *array-CGH* para acotar la extensión de dichas deleciones. Los resultados de dicho análisis mostraron que el paciente NF034 presenta una deleción de 0,6 Mb que elimina 9 genes de la región, desde el intrón 1 del gen *ATAD5* hasta el intrón 3 del gen *RAB11FIP4*. El paciente NF343 porta una deleción de 6,5 Mb comprendida entre los genes *SSH2* y *CCL18* que elimina más de 65 genes (Figura 10C). La deleción del caso NF599, según el análisis MLPA, se extiende desde el gen *CPD* hasta *MYOID*, ambos incluidos (Figura 9). El punto de rotura centromérico se localiza entre los genes *BLMH* y *CPD*. Su extremo telomérico no se determinó ya que la deleción elimina las dos sondas del gen *MYOID* que ocupan la posición más telomérica del panel del MLPA P122 C1. Por lo tanto, la deleción tiene un tamaño mayor de 2,4 Mb y elimina al menos 18 genes. Ninguna de estas deleciones atípicas ha sido previamente descrita, lo que confirma la baja recurrencia de este tipo de mutaciones.

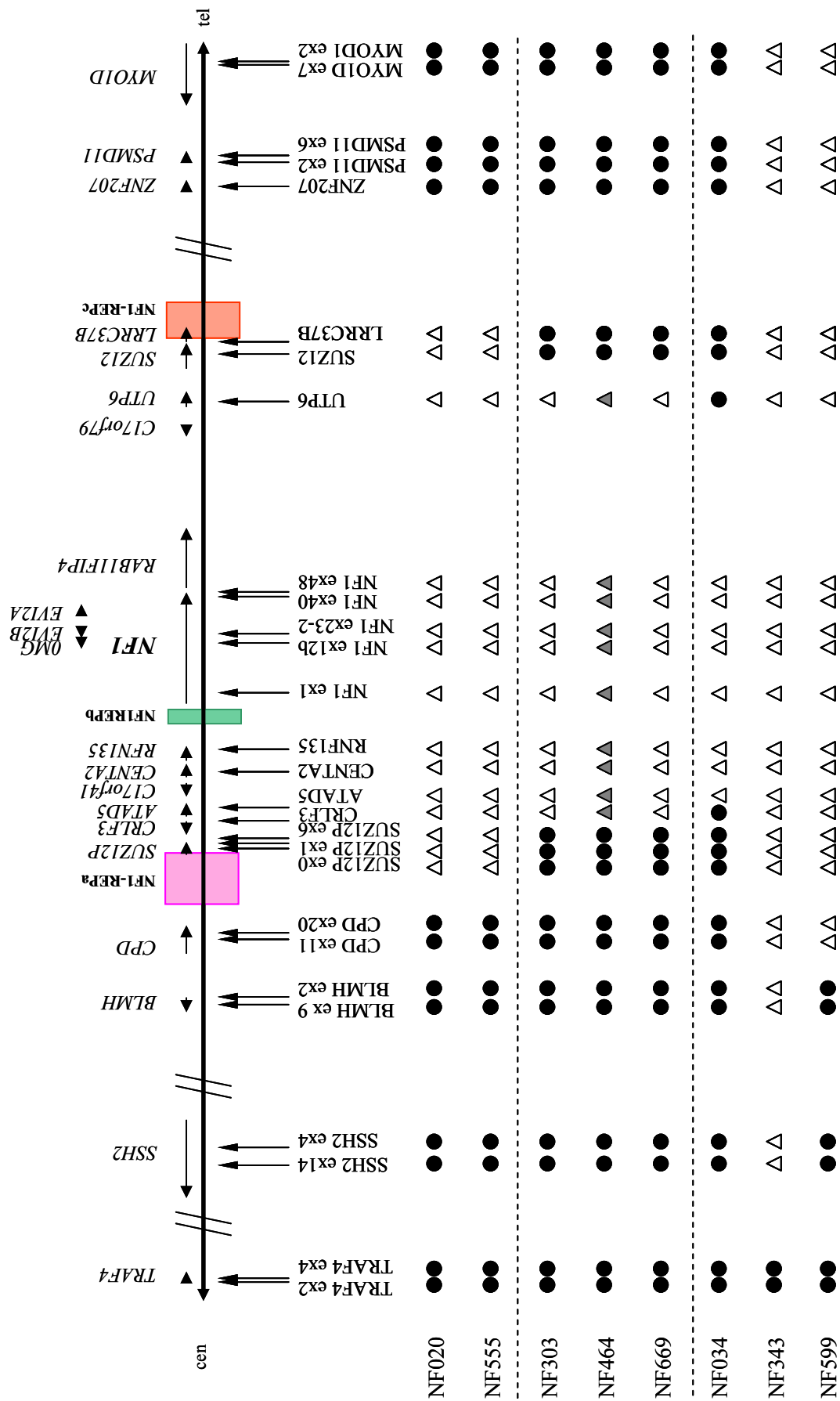


Figura 9: Representación esquemática de la región NF1 y posición de las sondas de MLPA (SALSA P122 C1). La orientación transcripcional de los genes está indicada con una flecha. Las regiones parálogos NF1-REPa, NF1-REPb y NF1-REPc se recuadran en rosa, verde y naranja, respectivamente. La posición de las sondas de MLPA se indica debajo mediante flechas verticales. Se muestran los resultados de MLPA para dos casos de delección tipo 1 (NF020 y NF555), los tres casos de delección tipo 2 (NF303, NF464 y NF669) y los tres casos de delecciones atípicas (NF034, NF343 y NF599). Los círculos negros indican sondas con valores de RPA > 0,85, los triángulos blancos indican valores de RPA < 0,65 y los triángulos grises valores de 0,65 < RPA < 0,85.

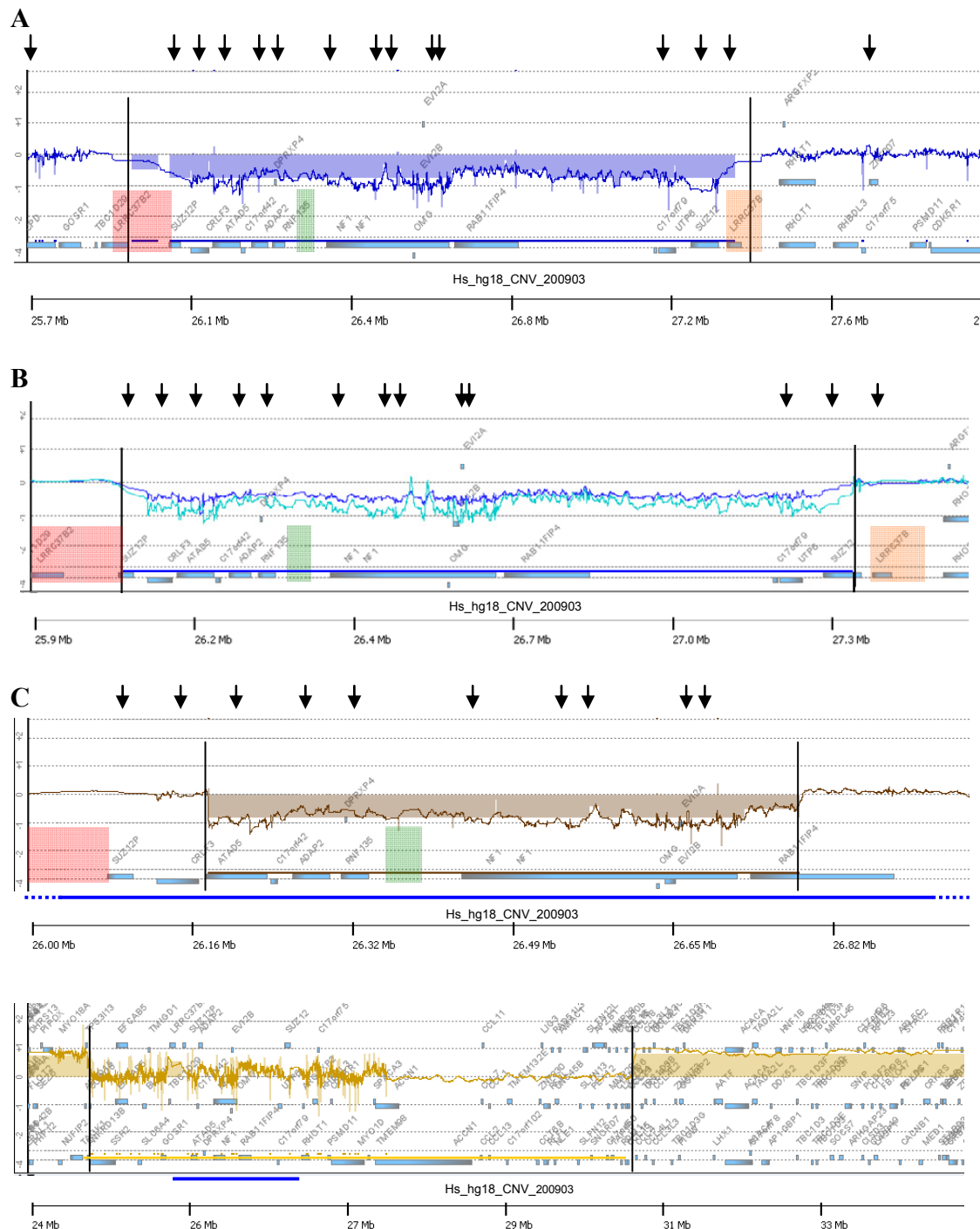


Figura 10: Array-CGH. Las flechas en la parte superior de los diagramas, indican la posición de las sondas de MLPA (SALSA P122 C1). Los recuadros en rojo, verde y naranja, indican la localización de las secuencias parálogas NF1-REPa, NF1-REPB y NF1-REPC, respectivamente. **A:** Ejemplo de deleción tipo 1 (NF239). **B:** Deleciones tipo 2 (NF303 y NF464). La línea azul oscuro representa la deleción en el paciente NF464 que es mosaico en sangre. **C:** Deleciones atípicas. El panel superior representa la deleción del paciente NF034 que se expande desde *ATAD5* hasta *RAB11FIP4* (0,6 Mb). El panel inferior muestra la deleción de 6,5 Mb del paciente NF343. La línea azul en la parte inferior de ambos diagramas indica la extensión de una deleción tipo 1.

2.2 Origen parental del cromosoma en el que se produce la delección

Completamos la caracterización de las microdeleciones determinando el origen, paterno o materno, del cromosoma que porta la microdelección. Mediante el análisis de 17 marcadores microsatélite de la región cromosómica 17q11.2 en el grupo familiar de los pacientes con microdelección, pudimos determinar el origen parental de la delección en 15 casos (Figura 11). Encontramos que las delecciones tipo 1 se producen mayoritariamente en el cromosoma materno (9/10), mientras que dos de las tres delecciones tipo 2 son de origen paterno. En el grupo de las delecciones atípicas, encontramos una paterna y otra materna, mientras que el tercer caso no pudo resolverse.

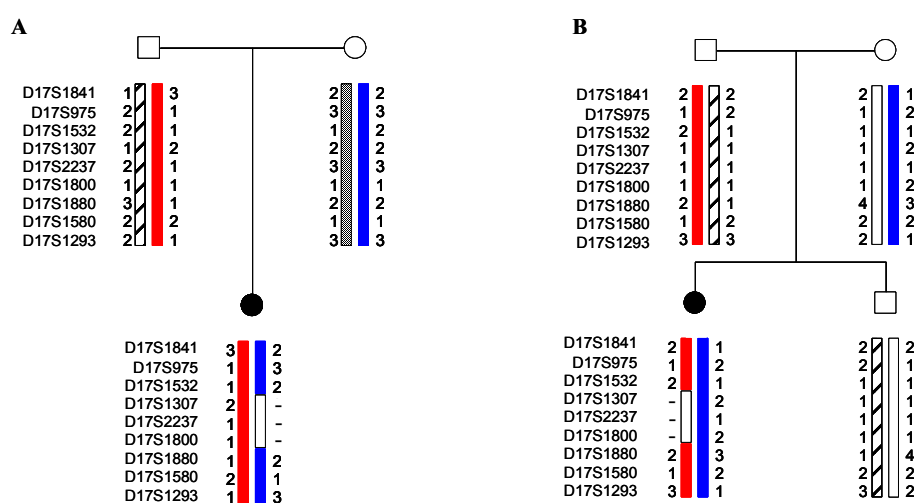


Figura 11: Origen parental del cromosoma donde se produce la delección. Se muestran 9 de los 17 marcadores microsatélite analizados. **A:** Ejemplo de delección tipo 1 que se produce en el cromosoma materno. **B:** Ejemplo de delección tipo 2 que se produce en el cromosoma paterno.

2.3 Análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNP) en la región cromosómica 17q11.2 delimitada por las secuencias NF1-REPa y NF1-REPC

Este análisis tenía como objetivo determinar el haplotipo del único alelo que portan los pacientes con una delección tipo 1, para investigar posibles diferencias entre los haplotipos de los pacientes con microdelección y controles sanos. Específicamente, nos interesamos en polimorfismos de nucleótido único (SNPs) situados a lo largo de la región cromosómica “deletada” de 1,4 Mb, limitada por las secuencias NF1-REPa y NF1-REPC. Utilizando las bases de datos de NCBI y HapMap, seleccionamos 35 SNPs

localizados en 13 de los 14 genes descritos en la región NF1-REPa – NF1-REPC: *CRLF3*, *ATAD5*, *C17orf42*, *ADAP2*, *RNF135*, *NF1*, *OMG*, *EVI2A*, *EVI2B*, *RAB11FIP4*, *C17orf79*, *UTP6* y *SUZ12*.

Con objeto de aumentar el tamaño muestral de pacientes con delección, solicitamos la colaboración de otros laboratorios de nuestro país. El análisis de los haplotipos se realizó con una muestra total de 41 pacientes españoles con delección tipo 1: 18 casos identificados en nuestra cohorte y 23 casos adicionales remitidos desde otros laboratorios. A su vez, estudiamos 100 sujetos sanos (200 cromosomas) de origen español. Los trabajos de “genotipado” se llevaron a cabo de forma automatizada utilizando la tecnología TaqMan SNP Genotyping Assay.

La comparación de las frecuencias alélicas entre el grupo de pacientes y el grupo de controles, mostró que 33 de los 35 polimorfismos estudiados no presentaban diferencias significativas. Sin embargo, en dos SNPs, localizados en los genes *UTP6* y *SUZ12* (Tabla 13 y Figura 12), sí encontramos diferencias. El marcador rs2074101 (SNP3) del gen *UTP6* presentaba una frecuencia del alelo menor (MAF) de 0,303 en controles, mientras que este valor disminuía hasta 0,122 en los pacientes con delección. De forma similar, el SNP rs578635 (SNP1) del gen *SUZ12* presentaba una MAF de 0,232 en población control mientras que en los pacientes esta frecuencia era de 0,073. Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Construimos los haplotipos con ambos SNPs: rs2074101 y rs578635. En el caso de los pacientes, el haplotipo se infirió directamente, puesto que son hemicigotos en esta región. Para la reconstrucción de haplotipos en la población general utilizamos el programa PHASE v2.1. El haplotipo mayoritario G/T (Tabla 14A), se encontraba en controles con una frecuencia del 65%, mientras que este mismo haplotipo alcanzaba una frecuencia del 88% (36/41) en los pacientes con delección tipo 1 ($p < 0,01$). Extendimos los haplotipos añadiendo tres SNPs de la región: el marcador rs12941700 del gen *C17orf79* y dos SNPs del gen *SUZ12* (rs501957 y rs527256). El análisis de los haplotipos con los cinco marcadores también mostró diferencias significativas entre pacientes y controles ($p < 0,001$) (Tabla 14B). Los cinco SNPs se localizan en tres genes contiguos localizados en la posición más telomérica del intervalo de la delección (Figura 12), en una región cromosómica de aproximadamente 150 Kb, siendo el marcador SNP3 del gen *SUZ12* el que ocupa la posición más distal, situado a 27 Kb del inicio de la secuencia NF1-REPC.

Tabla 13: Comparación de las frecuencias alélicas de 35 SNPs entre el grupo de pacientes (en azul) y el grupo control.

	Ref SNP	Alelos	Pacientes Alelo 1		Controles Alelo 2		Pacientes Alelo 2		Controles Alelo 2		χ^2 p	
			N°	Frec	N°	Frec	N°	Frec	N°	Frec		
CRLF3	SNP1	rs34756112	A/G	36	0,88	172	0,87	5	0,12	26	0,13	0,872
	SNP2	rs6505211	G/A	36	0,88	170	0,85	5	0,12	30	0,15	0,642
	SNP3	rs11871607	A/G	31	0,76	164	0,83	10	0,24	34	0,17	0,278
	SNP4	rs8078182	C/T	34	0,83	168	0,85	7	0,17	30	0,15	0,757
ATAD5	SNP1	rs9910051	A/T	35	0,85	168	0,85	6	0,15	30	0,15	0,933
	SNP2	rs9890032	C/G	26	0,63	110	0,56	15	0,37	88	0,44	0,355
	SNP3	rs3764421	A/C	36	0,88	174	0,88	5	0,12	24	0,12	1
	SNP4	rs9898911	T/A	31	0,76	158	0,80	10	0,24	40	0,20	0,549
C17orf42	SNP1	rs9897628	A/G	26	0,63	101	0,54	15	0,37	87	0,46	0,258
	SNP2	rs9914271	G/A	37	0,90	172	0,87	4	0,10	26	0,13	0,552
ADAP2	SNP1	rs7225461	G/A	26	0,63	102	0,54	15	0,37	88	0,46	0,256
	SNP2	rs6505220	T/A	21	0,51	103	0,54	20	0,49	87	0,46	0,728
RNF135	SNP1	rs952190	T/C	28	0,68	148	0,75	13	0,32	50	0,25	0,393
	SNP2	rs12453269	G/C	29	0,71	152	0,77	12	0,29	46	0,23	0,412
NF1	SNP1	rs11868459	T/C	29	0,71	148	0,74	12	0,29	52	0,26	0,666
	SNP2	rs1801052	A/G	30	0,73	146	0,74	11	0,27	52	0,26	0,938
	SNP3	rs7350943	T/C	30	0,73	120	0,61	11	0,27	78	0,39	0,13
OMG	SNP1	rs11080149	C/T	37	0,90	180	0,91	4	0,10	18	0,09	0,893
EVI2B	SNP1	rs3087591	A/G	30	0,73	154	0,78	11	0,27	44	0,22	0,523
	SNP2	rs2214538	T/C	30	0,73	120	0,61	11	0,27	78	0,39	0,13
	SNP3	rs7218930	G/A	30	0,73	120	0,61	11	0,27	78	0,39	0,13
EVI2A	SNP1	rs7505	A/G	31	0,76	120	0,61	10	0,24	78	0,39	0,07
	SNP2	rs1129506	A/G	30	0,73	126	0,64	11	0,27	72	0,36	0,243
	SNP3	rs2854306	A/G	30	0,73	120	0,61	11	0,27	78	0,39	0,13
RAB11FIP4	SNP1	rs7503263	G/A	28	0,68	134	0,68	13	0,32	64	0,32	0,938
	SNP2	rs178850	G/A	24	0,59	118	0,60	17	0,41	80	0,40	0,9
	SNP3	rs1076185	C/A	25	0,61	140	0,71	16	0,39	58	0,29	0,22
C17orf79	SNP1	rs2344310	T/C	33	0,81	136	0,69	8	0,19	62	0,31	0,13
	SNP2	rs12941700	G/A	39	0,95	170	0,86	2	0,05	28	0,14	0,103
UTP6	SNP1	rs11658318	C/T	28	0,68	118	0,60	13	0,32	80	0,40	0,298
	SNP2	rs3760454	T/C	22	0,54	110	0,56	19	0,46	88	0,44	0,824
	SNP3	rs2074101	G/A	36	0,88	138	0,70	5	0,12	60	0,30	0,018
SUZ12	SNP1	rs578635	T/G	38	0,93	152	0,77	3	0,07	46	0,23	0,022
	SNP2	rs501957	G/A	38	0,93	168	0,85	3	0,07	30	0,15	0,186
	SNP3	rs527256	C/G	38	0,93	168	0,85	3	0,07	30	0,15	0,186

Ref SNP: código del SNP en la base de datos dbSNP del NCBI; N°: número de casos que portan cada alelo; Frec: frecuencia alélica. Se ha utilizado el estadístico χ^2 para determinar si existen diferencias entre ambos grupos. En rojo se muestran los valores de p estadísticamente significativos.

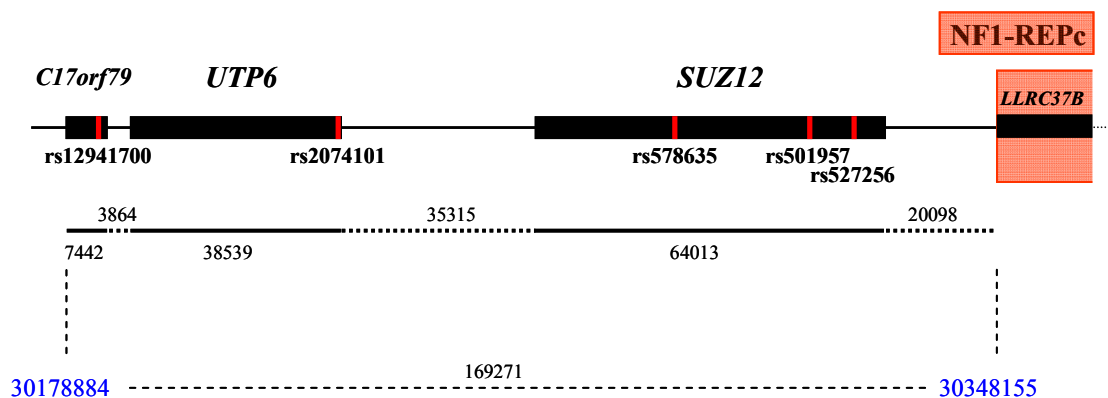


Figura 12: Figura a escala de la región telomérica del *locus NFI*. Los recuadros negros muestran los tres genes (*C17orf79*, *UTP6* y *SUZ12*) que contienen los SNPs (recuadros en rojo) que forman el haplotipo. En la parte de la derecha, se muestra el inicio de la región paróloga NF1-REPC (en naranja) con el gen *LLRC37B* contenido en ella. En la línea de abajo están indicados los tamaños de los genes (línea continua) y de las regiones que los separan (línea discontinua) en pares de bases. En la parte inferior se indican en azul las coordenadas genómicas que corresponden al constructo GRCh37/hg19.

Tabla 14: Comparación de la distribución de haplotipos entre pacientes y controles. Se ha utilizado el estadístico χ^2 para determinar si existen diferencias entre la proporción de individuos que portan un haplotipo (por ejemplo, G/T) frente al resto de haplotipos (A/G+A/T+G/G) entre el grupo de controles y pacientes. En rojo se muestran los valores de p estadísticamente significativos. **A:** Haplotipo formado por el SNP3 de *UTP6* (rs2074101) y el SNP1 de *SUZ12* (rs578635). **B:** Haplotipo formado por el SNP 2 de *C17orf79* (rs12941700), el SNP 3 de *UTP6* (rs2074101) y los 3 SNPs de *SUZ12* (rs578635, rs501957 y rs527256).

A

Haplotipo	Controles		Pacientes		χ^2 p
	Nº	%	Nº	%	
G/T	122	64,89	36	87,80	0,004
A/G	35	18,62	3	7,30	0,078
A/T	23	12,23	2	4,90	0,171
G/G	8	4,26	0	-	0,179
total	188		41		

B

Haplotipo	Controles		Pacientes		χ^2 p
	Nº	%	Nº	%	
G/G/T/G/C	113	60,75	36	87,80	0,0096
G/A/T/G/C	24	12,90	1	2,44	0,053
A/A/G/A/G	22	11,83	1	2,44	0,071
G/G/G/G/C	15	8,06	0	-	0,060
G/A/G/A/G	5	2,69	2	4,9	0,463
A/A/T/G/C	5	2,69	1	2,44	0,929
G/G/T/G/G	2	1,08	0	-	0,505
total	186		41		

En resumen, después de analizar 35 SNPs de la región cromosómica NF1-REPa - NF1-REPc, encontramos diferencias significativas entre las dos poblaciones al construir haplotipos con cinco SNPs localizados en los tres genes más cercanos a NF1-REPc. Este análisis indica que el haplotipo mayoritario (G/G/T/G/C) está más representado en los pacientes con delección tipo 1 (88%) que en la población control (61%).

3. Variaciones en el número de copias intragénicas

3.1 Caracterización de deleciones y duplicaciones intragénicas

Mediante el análisis cuantitativo por MLPA con las salsas P081 y P082 identificamos 17 (17/328; ~5%) pacientes que presentaban variaciones en el número de copias (CNV) de uno o varios exones del gen *NF1*.

La expresión del alelo mutante fue confirmada mediante secuenciación directa de la región de unión en ADNc, salvo en cuatro casos en los que la delección afectaba al primer exón o al último (exón 49). Queremos señalar el caso del paciente **NF350** que en el análisis del ADNc presentaba tres alelos: el alelo silvestre, un alelo con delección del exón 41 y otro alelo con delección del exón 42. Este resultado fue confirmado mediante amplificación por PCR de un fragmento de ADNc que se expandía desde el exón 40 al 43, purificación de las bandas del gel de agarosa y posterior clonación de los productos en el vector TOPO TA (datos no mostrados). En total, hemos identificado 18 CNVs, que incluyen 9 deleciones de un único exón, 8 deleciones multiexónicas y una duplicación del exón 39 (Figura 13A).

La mayoría de las roturas sucedían en los dos intrones de mayor tamaño: tres en el intrón 1 (>60 Kb) y seis en el intrón 27b (>60 Kb). En cuatro casos, pudimos precisar la región en la que se producían las roturas en el intrón 27b, gracias al análisis de tres marcadores microsatélite que se encuentran en este intrón (Alu, 28.4 y ACI) (Figura 13B).

De los 17 pacientes con CNVs, 13 de ellos eran casos esporádicos y 4 eran familiares. Sólo conseguimos determinar el origen parental de uno de los casos, principalmente, por la falta de informatividad de los marcadores polimórficos intragénicos. El paciente NF089, portaba una delección *de novo* de los exones 10c al 49, originada en el cromosoma paterno.

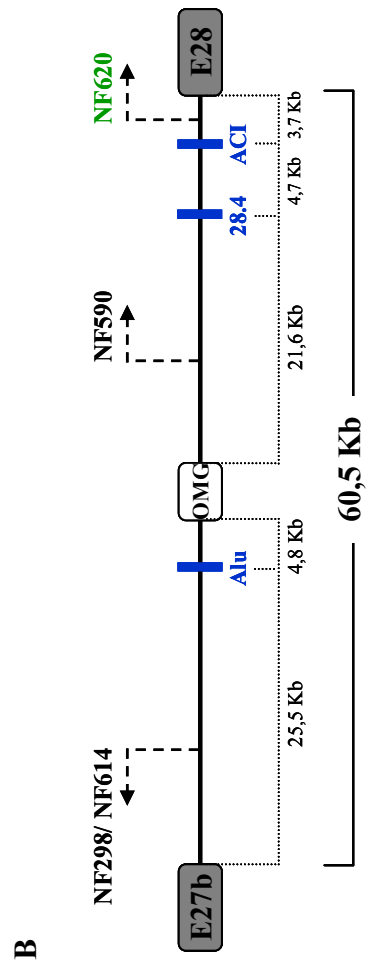
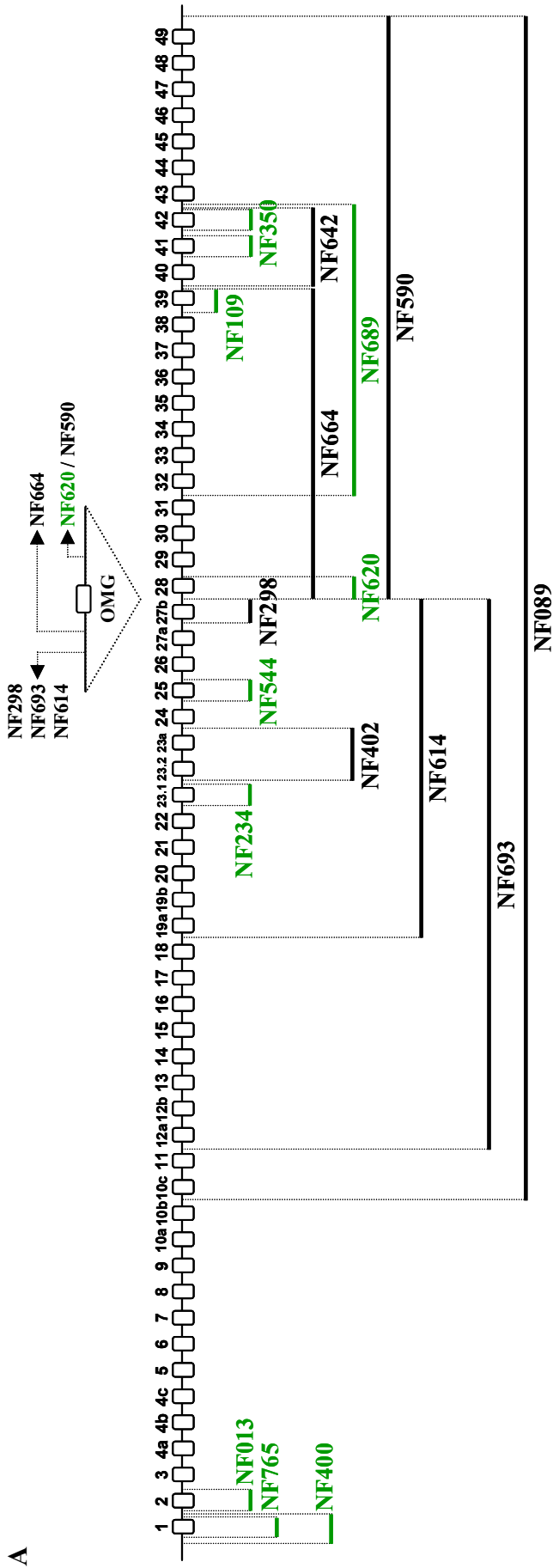


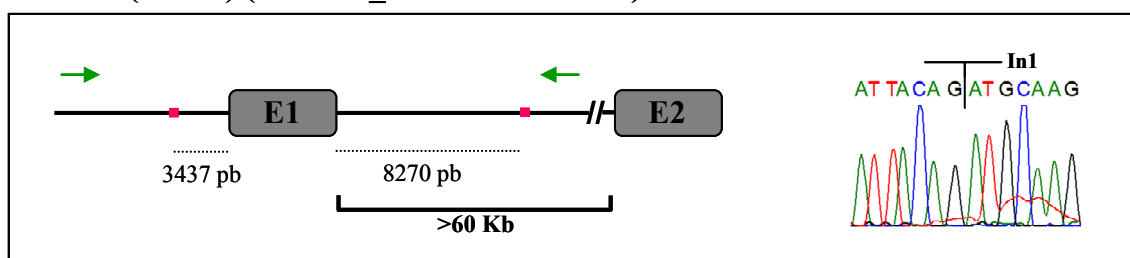
Figura 13: Representación de las CNVs identificadas en nuestra cohorte. **A:** Diagrama en el que se muestran todas las CNVs. En verde se indican los casos en los que se han caracterizado los puntos de rotura a nivel de secuencia de ADNg. **B:** Detalle del intrón 27b, flanqueado por los exones 27b y 28. Los tres marcadores microsatélite presentes en este intrón se indican en azul. Debajo del diagrama se muestra la distancia en Kb entre los exones, el gen *OMG* y los marcadores microsatélite.

3.2 Caracterización de los puntos de rotura de las deleciones/duplicaciones intragénicas

Para profundizar en los mecanismos moleculares que subyacen a este tipo de mutaciones, mediante PCRs de largo recorrido y secuenciación, caracterizamos los puntos de rotura de 8 deleciones exónicas, 1 deleción multiexónica y de la duplicación del exón 39. El tamaño de las deleciones es muy variable y oscila entre las 437 pb (NF544) y al menos 155 Kb (NF089). El caso NF109 presenta una duplicación del exón 39 de 2507 pb.

Los pacientes NF400 y NF765 portan una deleción del exón 1. El ADN del paciente NF400 fue analizado mediante un *array-CGH* diseñado para identificar con precisión las CNVs en la región 17q11.2. Dicho análisis permitió precisar la localización los puntos de rotura de la deleción. Así fue posible diseñar cebadores para amplificar por PCR la región de unión de las dos deleciones del exón 1 (Figura 14).

NF400 (del E1) (c.1-3437_60+8270del 11767)



NF765 (del E1) (c.1-2002_60+7193del 9255)

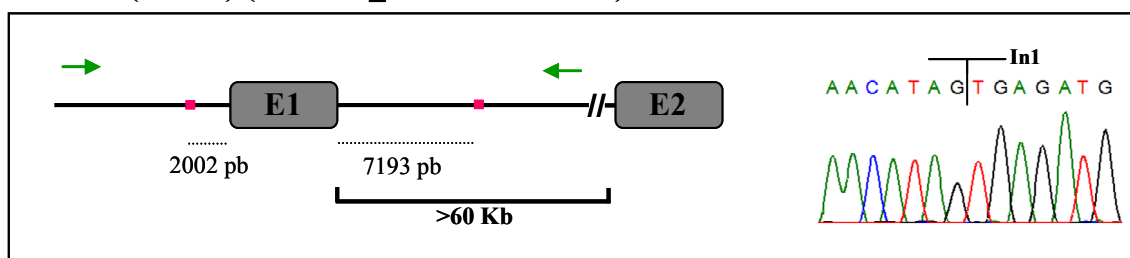


Figura 14: Identificación del punto de rotura en los pacientes NF400 y NF765. En cada panel, en la parte de la izquierda se muestra un diagrama donde se indica la región deletada (región entre los recuadros rosas) y la posición de los cebadores utilizados para la amplificación (flechas verdes). En la parte inferior, se indica el tamaño de los intrones que participan en la rotura. A la derecha, el electroferograma muestra el punto de unión.

Para el caso **NF003** (del E2), diseñamos una pareja de cebadores, en base a una deleción del exón 2 descrita en otro trabajo (Wimmer *et al.*, 2007). Este estudio mostró que los puntos de rotura del caso NF003 eran muy similares a la deleción previamente descrita e idénticos a los de otra deleción (Prof. L. Messiaen, comunicación personal) (Figura 15). Por tanto, hasta la fecha, esta es la única deleción intragénica que se ha encontrado en 2 casos independientes.

NF013 (del E2) (c.61-5185_204+1599del 6928)

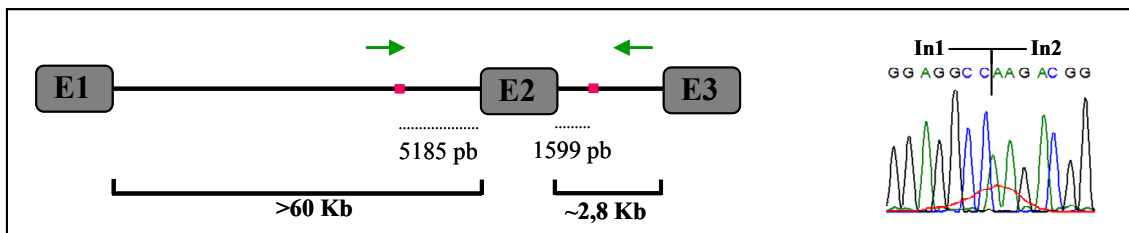
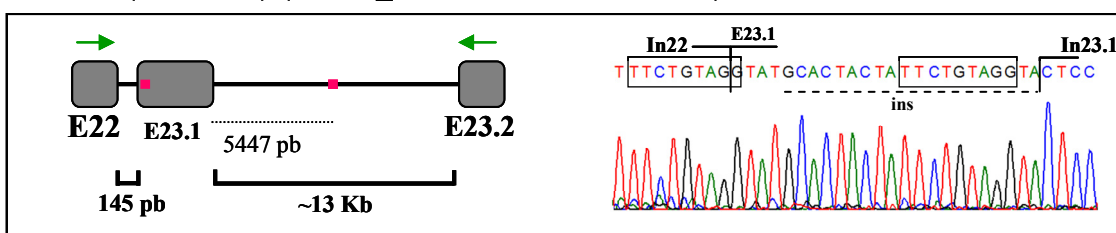


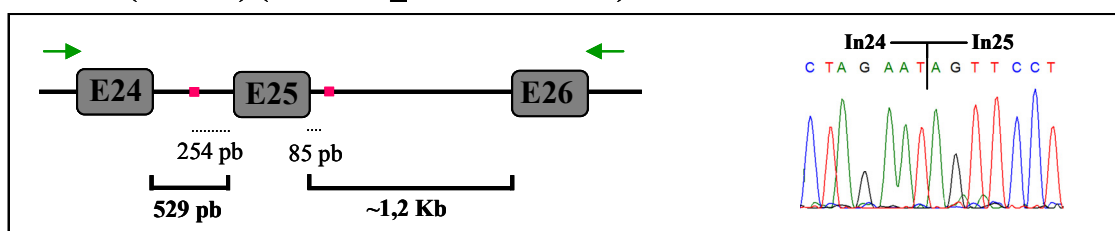
Figura 15: Identificación del punto de rotura en el paciente NF003.

Para caracterizar los puntos de rotura de los casos **NF234** (del E23.1), **NF544** (del E25), **NF620** (del E28), **NF350** (del E41 y E42) y **NF689** (del E32-42) nos basamos en los resultados del análisis de MLPA y en los estudios de segregación de los marcadores microsatélite localizados en el intrón 27b. En cinco casos identificamos una deleción simple y en el paciente **NF234**, identificamos un reordenamiento complejo ya que, además de la deleción, en el punto de unión se produce la inserción/duplicación de 20 pb (Figura 16). Por otra parte, indicar que este caso es el único con un punto de rotura que implica secuencias exónicas.

NF234 (del E23.1) (c.3875_3974+5347del5447ins18)

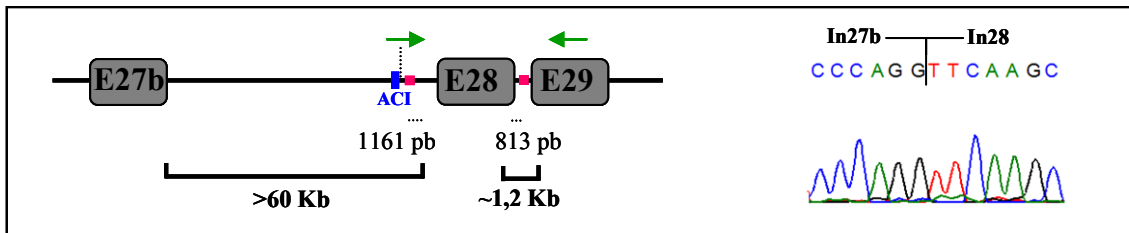


NF544 (del E25) (4270-254_4367+85del 437)

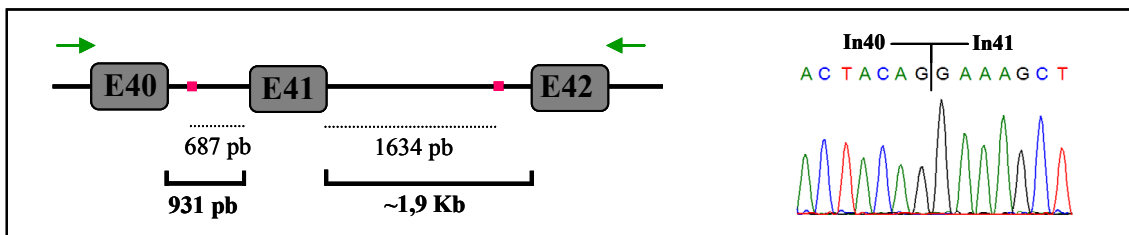


Continuación Figura 16

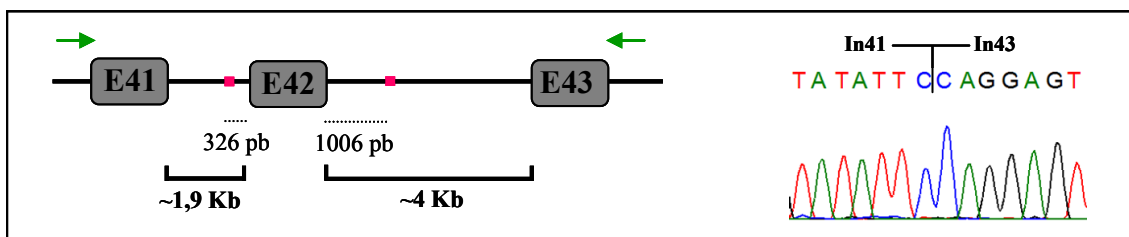
NF620 (del E28) (c.4773-1161_5205+813del2407)



NF350 (del E41) (c.7259-687_7394+1634del2457)



NF350 (del E42) (c.7395-326_7552+1006del1490)



NF689 (del E32-42) (c.5944-1070_7552+3459del 20611)

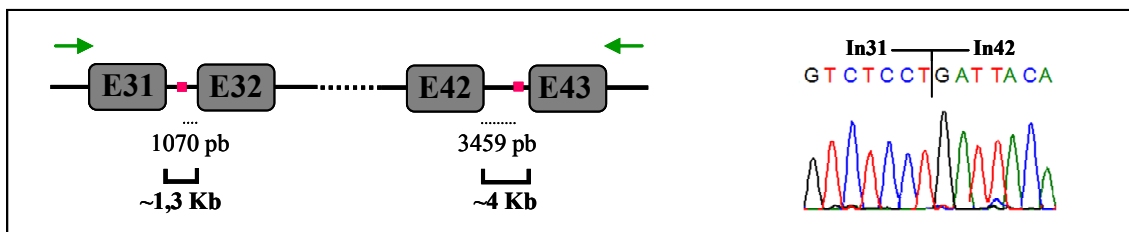


Figura 16: Identificación de los puntos de rotura en los pacientes NF234, NF544, NF350, NF620 y NF689. En el caso NF234, las bases subrayadas indican los 20 residuos insertados en el punto de unión, y los recuadros muestran la secuencia duplicada.

En nuestra serie de 18 casos de CNVs, identificamos un único caso de duplicación. El paciente NF109 porta dicha duplicación del exón 39 cuyos puntos de rotura fueron caracterizados en la secuencia de ADNg (Figura 17).

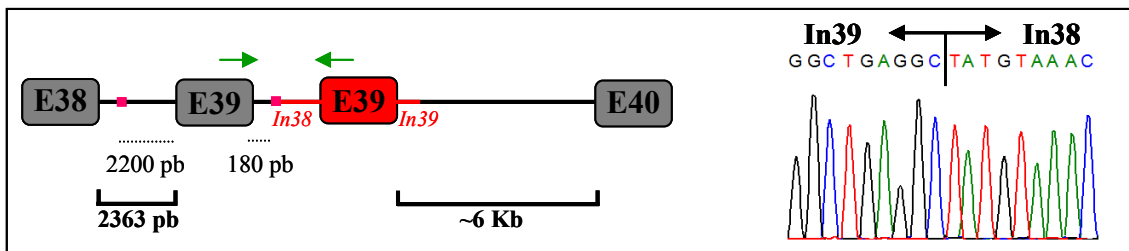
NF109 (dup E39) (c.7000-2200_7126+180dup2507)

Figura 17: Identificación de los puntos de rotura en el paciente NF109. Los cebadores se diseñaron para amplificar específicamente la duplicación, que se muestra en rojo.

3.3 Mosaicismo en las CNV intragénicas

En nuestra serie de 17 casos de CNVs intragénicas identificamos cuatro casos de mosaicismo (4/17, ~24%).

El análisis de MLPA del ADNg es un estudio cuantitativo que nos permitió identificar dos casos de mosaicismo en los pacientes **NF350** y **NF614**. En dichos análisis, se detectaron valores de RPA de las sondas que oscilaban entre 0,65 y 0,85. Los valores esperados para un suceso de delección (una copia) son RPAs de ~0,5 mientras que para la dosis génica normal (dos copias), los valores esperados se aproximan a ~1 (Figura 18).

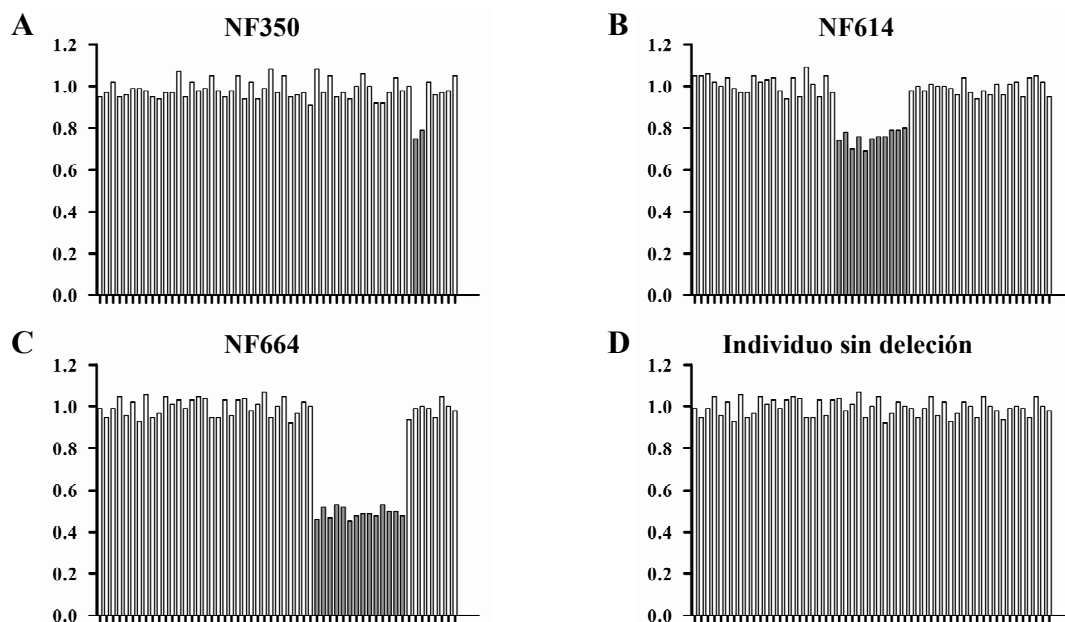


Figura 18: Análisis de MLPA. Los pacientes NF350 y NF614 portan una delección en mosaico (valores de RPA entre 0,65 y 0,85), el individuo NF664 presenta una delección multiexónica en heterocigosis (RPA ~0,5) y el último diagrama muestra a un individuo sin delección (RPA ~1).

Resultados

Por otra parte, el estudio de segregación de los haplotipos mostró otros casos de mosaicismo. El paciente **NF693**, que portaba una delección de los exones 12 al 27b, tenía un hermano afecto con la misma mutación. Ninguno de sus progenitores mostraba manifestaciones clínicas de la enfermedad, ni presentaban la delección en ADNg extraído de sangre. Este resultado indicaba que alguno de los dos progenitores presentaba mosaicismo gonadal. Del mismo modo, el estudio de segregación de la familia de la paciente **NF109**, con una duplicación *de novo* del exón 39, indicó la presencia de mosaicismo. Su progenie había heredado ambos alelos maternos (Figura 19A), sin embargo todos los hijos son individuos adultos sanos y en ninguno de ellos detectamos la presencia de la mutación en el ADNg de sangre periférica (Figura 19B). Por otra parte, valoramos la presencia de la mutación en diferentes tejidos de la paciente a través de una PCR multiplex. Este estudio indicó que existe una proporción variable del alelo mutado en ADNg extraído de sangre, bulbo piloso y saliva de la paciente (Figura 19B). Según estos resultados, la mutación *de novo* se produjo postcigóticamente en una fase muy temprana del desarrollo embrionario ya que la paciente presenta un fenotipo severo y generalizado, con múltiples neurofibromas cutáneos y plexiformes.

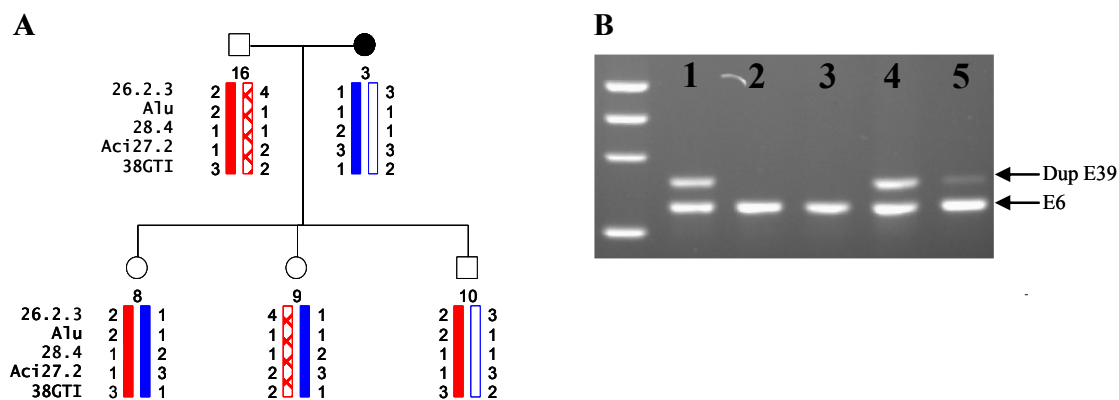


Figura 19: Caracterización del mosaicismo en el caso NF109. **A:** Análisis de segregación por marcadores microsatélite intragénicos. **B:** Análisis de los productos de amplificación de la duplicación del exón 39 y del exón 6 (control) en la descendencia de la probando (carriles 2-3) y en distintos tejidos de la paciente (carriles 1, 4-5). *Carriles 1, 2 y 3:* análisis de ADNg de sangre periférica. *Carril 4:* ADNg de bulbo piloso. *Carril 5:* ADN de saliva.

3.4 Análisis bioinformático de los puntos de rotura

Los resultados obtenidos tras la identificación de 18 CNVs indican que se trata de mutaciones no recurrentes que difieren en tamaño. Sin embargo, las roturas no se producen de forma aleatoria y sabemos que diferentes elementos de la secuencia de ADN_g, cercanos a los puntos de rotura, están implicados en el mecanismo que media la aparición de CNVs. Estos elementos son: secuencias repetitivas del genoma humano (secuencias Alu, LINEs...), microhomologías entre los puntos de rotura, secuencias capaces de producir estructuras no-B del ADN y otros motivos de secuencia que muestran propiedades recombinogénicas.

Para dilucidar los mecanismos responsables de la aparición de las CNVs intragénicas, realizamos un amplio análisis informático de las secuencias adyacentes a los diez reordenamientos cuyos puntos de rotura habían sido caracterizados a nivel de ADN_g.

3.4.1 Elementos repetitivos

Utilizando la herramienta RepeatMasker buscamos secuencias repetitivas en las 20 regiones investigadas. Encontramos elementos repetitivos en el 65% (13/20) de los casos (Tabla 15).

En los casos **NF400** y **NF765**, los puntos de rotura de ambas deleciones se encuentran embebidos en secuencias Alu pertenecientes a la misma familia (AluSx y AluJr, respectivamente). Se realizó un análisis con Blast2 para determinar el porcentaje de identidad entre las secuencias y se observó que en ambos casos, la homología entre los Alu es del 71%.

En el caso **NF013**, los puntos de rotura de la deleción se encuentran también en elementos Alu, pero en este caso, pertenecientes a diferentes familias: AluSx en la región proximal y AluY en la distal. De acuerdo a los resultados de Blast2, ambos Alu comparten una identidad de secuencia del 81%. La deleción del paciente **NF620** también se produce en secuencias Alu pertenecientes a diferentes familias (AluSz6 y AluSx1) que presentan una homología del 78%.

Resultados

El paciente **NF350** porta una deleción del exón 42 cuyo punto de rotura distal se sitúa en un elemento DNA/hAT-Charlie y el proximal en un AluJb. Estos elementos no comparten ninguna identidad entre sí.

En las deleciones de los pacientes **NF234**, **NF350** (del E41) y **NF109** identificamos un elemento repetitivo únicamente en el punto de rotura distal: L1M1 en el paciente NF234, DNA/hAT-Charlie en NF350 y AluJb en NF109.

Tabla 15: Elementos repetitivos presentes en los puntos de rotura y porcentaje de homología que comparten.

Paciente	Del / Dup	Elementos repetitivos		Homología
		Rotura proximal	Rotura distal	
NF400	E1	AluSx	AluSx	71%
NF765	E1	AluJr	AluJr	71%
NF013	E2	AluSx	AluY	81%
NF234	E23.1	-	L1M1	-
NF544	E25	-	-	-
NF620	E28	AluSz6	AluSx1	78%
NF350	E41	-	DNA/hAT-Charlie	-
NF350	E42	DNA/hAT-Charlie	AluJb	0%
NF689	E32_42	-	-	-
NF109	E39	-	AluJb	-

3.4.2 Microhomologías

La microhomología se define como la presencia de una o más pares de bases de secuencia idéntica entre los puntos de rotura proximal y distal. Identificamos microhomologías en 7 de las 10 CNVs analizadas (70%) (Figura 20). La longitud de las mismas oscila ente 1 pb (en el paciente **NF689**) y 38 pb (en el caso **NF013**). En los pacientes **NF234**, **NF544** y **NF109** no encontramos ninguna homología entre los puntos de rotura proximal y distal.

NF400

GCCTGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCCTGGGATTACAGGCATGAGCCA
 GCCTGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCCTGGGATTACAGATGCAAGCCA
 ACCTGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCCTGGGATTACAGATGCAAGCCA

NF765

AGTTCCAGACCAGCCTGGGCAACATAGCAAGACTGTGTCTCTACC
 AGTTCCAGACCAGCCTGGGCAACATAGTGAGATGCTGTCTCTAAA
 AATTCAAGACCAGCCTGTGCAACATAGTGAGATGCTGTCTCTAAA

NF013

GCACGGTGGCTCAGCCTGTAAATCCAGCACCTTTGGGAGGCCGAGG
 GCACGGTGGCTCAGCCTGTAAATCCAGCACCTTTGGGAGGCCAAGA
 GCATGGTGGCTCAGCCTGTAAATCCAGCACCTTTGGGAGGCCAAGA

NF234

TATTCGTGCATTTCTGTAGGTATATGGTGCTACCTATCTACAAAA
 TTCTGTAGGTATGCACTACTATTCTGTAGGTACTCCTGCTATTTG
 GTGTTATTATTGACGAGGACTTACTCCTGCTATTTTGTATTGTT

NF544

GACATTCGAAACAGACTAGAATGTAGACTATAGGATTTTTTATTT
 GACATTCGAAACAGACTAGAATAGTTCTGTGTAAGTTTTTTTCT
 ATCCATGTACCTGTTTTACATGAAGTTCCTGTGTAAGTTTTTTTCT

NF350 (del E41)

CATCTTTGGTTCAAGACACTACAGTGGCTCTCTGTTATCTGTTCAT
 CATCTTTGGTTCAAGACACTACAGGAAAGCTAAGAGATTGGACAC
 TCTTCTAATTCAGTGTGGCCAGGAAAGCTAAGAGATTGGACAC

NF350 (del E42)

TTTTATATGTGGCCAGTATATTCCTTAATTCAGTGTGGCCAG
 TTTTATATGTGGCCAGTATATTCAGGAGTCAAGACCAGCCTGG
 TCAGGTGGGAGGATTGCTCGAGTCAGGAGTCAAGACCAGCCTGG

NF620

CTCAGCTCGCTGCAGCCTCTGCCTCCAGGTCGAAGTATTCTCG
 CTCAGCTCGCTGCAGCCTCTGCCTCCAGGTCGAAGGATTCTGCG
 CTTGGCTCACTGCAACCTCTGCCTCCAGGTCGAAGGATTCTGCG

NF689

GCTAGTTATTTGCACAGTCTCCTTCAAGGCATAATTATATATATA
 GCTAGTTATTTGCACAGTCTCCTGATTACATGATTAGAGAAACTA
 AGAAAAAATAGTGTAAATACAATGATTACATGATTAGAGAAACTA

NF109

ACCAACATTTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGGATCACTTGAGGCTAGG
 ACCAACATTTTGGGAGGCTGAGGTATGTAACCTTGAATGCATATTT
 TTCCTTACCAGCTCATAAAGAACTATGTAACCTTGAATGCATATTT

Figura 20: Alineamiento de las diferentes secuencias implicadas en los 10 reordenamientos investigados. En cada caso, se muestran las secuencias de la zona de rotura proximal (primera línea, letras en negro) y la zona distal (tercera línea, letras en verde). La secuencia de la CNV resultante se muestra en la segunda línea. Las letras en rojo muestran la extensión de la microhomología. En el caso NF234, en azul se indica la inserción de 20 pb que ocurre en el punto de rotura y las letras subrayadas indican la secuencia duplicada.

3.4.3 Estructuras no-B del ADN

Utilizando los programas RepeatAround, non-B DNA Motif Search Tool y QGRS Mapper, analizamos las 50 pb que flanquean a los puntos de rotura. Buscamos repeticiones simples del ADN, tales como repeticiones directas, invertidas, o trectos de $(G)_n$ entre otros, que pueden adoptar conformaciones no-B del ADN favoreciendo la rotura de la doble cadena de ADN (Wang and Vasquez, 2006; Wells, 2007; Voineagu *et al.*, 2008). Consideramos tan sólo las repeticiones con una longitud mínima de 6 pb que flanquean los puntos de rotura o se encuentran sobre los mismos.

Encontramos diferentes tipos de repeticiones en 18 de 20 (90%) regiones analizadas (Figura 21). En 17 casos, una de las repeticiones se localiza sobre el punto de rotura. En la delección del exón 41 (NF350), sin embargo, las secuencias repetidas están más alejadas: encontramos dos repeticiones directas flanqueando el punto de rotura proximal a 36 pb hacia 5' y a 20 pb hacia 3'. En algunos casos encontramos dos elementos que solapan en un mismo punto, como es el caso del punto de rotura distal del paciente NF234, ambos puntos de rotura de la delección del exón 42 (NF350) y en la rotura proximal del paciente NF109. Podemos decir que hemos encontrado una alta proporción de secuencias repetidas en los puntos de rotura analizados.

3.4.4 Motivos de secuencia recombinogénicos

Se han descrito varios motivos de secuencia que presentan propiedades recombinogénicas (Abeyasinghe *et al.*, 2003). Por ello, utilizando el programa Fuzznuc, buscamos 40 de dichos motivos en las 15 pb que flanquean cada punto de rotura.

Identificamos 20 motivos de secuencia recombinogénicos en 14 de las 20 regiones analizadas (14/20, 70%) (Figura 22). En siete de los casos, el motivo se localiza sobre el punto de rotura. En el caso **NF109** encontramos 3 elementos diferentes que solapan en el punto de rotura proximal: dos *deletion hotspot consensus*, un *DNA polymerase arrest site* y una secuencia conservada de minisatélites humanos. Además, en el punto de rotura distal encontramos otros dos motivos recombinogénicos: un elemento χ -like y un motivo *Ig heavy chain class switch repeat 5*. El motivo de secuencia más frecuente en los puntos de rotura es un elemento χ -like (5'-GCTGG-3'), que es una secuencia parcial de un elemento χ de *E. coli* (5'-GCTGGTGG-3').

NF400		Tipo de repetición
P	CTGACCTCAGGTGATCTGCCTGCCTCGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCAT	Invertida y complementaria
D	CCAGGCTGCCTCAAACACCTGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGATGC	Invertida y complementaria
NF013		
P	GGCTGGGCACGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGTGGG	2 tractos (G) _n
D	GGCTGGGCACGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGTGGG	2 tractos (G) _n
NF234		
P	TATATGGAGCAGGTATAATAAACTCCTATTCTGTCATTTCTGTAGGTATATGGTGC	Invertida
D	CATTCAGTGTATTATTATGACGAGGACTTACTCCTGCTATTTTGTATTGTTTTCT	Invertida / Directa / Directa complementaria
NF544		
P	TTCTAGACATTCGAAACAGACTAGAATGTAGACTATAGGATTTTTTATTTTAAAA	Invertida complementaria
D	CATAAATCATGTACCTGTTTACATGAAGTTCCTGTGTAAGTTTTTTCTTTTCC	Invertida complementaria
NF620		
P	AGCTCGCTGCAGCCTCTGCCTCCAGGTCCAAGTGATTCTCGTGCCTCAGCCTCCC	Directa
D	GGCTCACTGCAA CCTCTGCCTCCAGGTTC AAGCGATTCTGTGCCTCAGCCTCCC	Directa
NF350 (del E41)		
P	TAAAACTGAAATGTGTCCCTTGGTCATCTTGGTTCAAGACACTACAGTGGCTC TCTGTTATCTGTCA TAAAACTGAAATGCTTCAGTCTAGCACCTGGGTCTTAAAT	Directa
D	TATTTTATA TGTGGCCAGTATATTCTTCTAATTCAGTGTGGCCAGGAAAGCTA	Directa
NF350 (del E42)		
P	TGTATTTTATA TGTGGCCAGTATATCTTCTAATTCAGTGTGGCCAGGAAAGC	Directa / Invertida
D	CTTTGAGGACTCAGGTGGGAGGATTGCTCGAGTCCAGGAGTCAAGACCAGCCTG	Invertida complementaria/ Directa complementaria
NF689		
P	AAAGCTAGTTATTTGCACAGTCTCCTTCAAGGCATAATTATATATATATATATAT ATATAATTATGCCTTGAAGGAGACTGTGCAAATAACTAGATTTTATATATATATAT	Palíndromo
D	GAAAAAATAGTGTAAATACATGATTACATGATTAGAGAACTAAAAGCCAAATG	Directa en tandem
NF109		
P	GTAATACCAACATTTTGGGAGCTGAGGCAGGAGGATCACTTGAGGCTAGGAGTTT	Directa / Tracto (G) _n
D	TACCAGCTCATAAAGAAC TATGTAAACTTGAATGCATATTTTACATAAAAATAG	Invertida complementaria

Figura 21: Secuencias que pueden generar estructuras no-B del ADN, identificadas en 9 CNVs. En cada caso se muestra la secuencia de la región proximal (P) y de la región distal (D). En la columna de la derecha se indica el tipo de repetición identificada. Las flechas indican el punto de rotura en los pacientes NF234, NF555 y NF109.

		NF400		Motivo de secuencia recombinogénico
P	GCCTGCCTCG	GCCTCCCAAGTCTGGGATTACAGGCA	TCAGCCCA	Elemento χ -like / Ig heavy chain class switch repeat 5
D	ACCTGCCTCA	GCCTCCCAAGTCTGGGATTACAGATGCAAGCCA		Elemento χ -like
NF765				
P	AGFTCCAGACCAGCCTGG	GCAACATAGCAAGACTGTGTCTCTAAA		Elemento χ -like
D	AATTCAGACCAGGCTGT	GCAACATAGTGAGATGCTGTCTCTAAA		
NF013				
P	GCACGGTGGCTCACGCCTGTAATC	CCAGCACTTTGGGAGGCCGAGG		Elemento χ -like
D	GCATGGTGGCTCACGCCTGTAATC	CCAGCACTTTGGGAGGCCAAGA		Elemento χ -like
NF234				
P	TATTCGTGCATTTCTGTAGTAAAT	TGGTGCTACCTATCTACAAAA		
D	GTGTTATTATTGACGAGGACTTA	CTCCTGCTATTGTATTGTT		Murine parvovirus recombination hotspot
NF544				
P	GACATTCTGAAACAGACTAGAAT	GTAGACTATAGGATTTTTTATTT		
D	ATCCATGTACCTGTTTTACATGA	AGTTCCTGTGTAAGTTTTTTTCT		
NF620				
P	CTCAGCTCGCTGCAG	CCTCTGCCTCCAGGTCCAAGTGATCTCG		Ig heavy chain class switch repeat 1
D	CTTGGCTCACTGCAA	CCTCTGCCTCCAGGTCAAGCGATTCTGC		Ig heavy chain class switch repeat 5
NF350 (E41)				
P	CATCTTTGGTTCAAGACACTA	CAGTGGCTCTCTGTTATCTGTCAT		
D	TCTTCTAATCCAGTGTG	SCCAGGAAGCTAAGAGATTGGACAC		Translin bining site 2
NF350 (E42)				
P	TTTTATATGTGGCCAGTATAT	CTTCTAATCCAGTGTGGCCAG		
D	TCAGTGGGAGGATTGCTCGAG	TCAGGATTCAGAACCAGCCTGG		DNA polymerase arrest site / Elem chi-like
NF689				
P	GCTAGTTATTGACAGTCTCC	TCAAGGCATAATTATATATATA		Vaccinia topoisomerase I consensus
D	AGAAAAAATAG	TGTTAATACATGATTACATGATTAGAGAACTA		Murine parvovirus recombination hotspot
NF109				
P	ACCAACATTTTGGGAGGCT	CGAGCCAGGAGATCACT	TCAGGCTAGG	Deletion hotspot consensus (verde) / DNA polymerase arrest site (azul) / Human minisatellites conserved sequence (recuadro)
D	TTCCTTACCGCTCA	TAAAGAACTATGTAACCTTGAATGCATATTT		Elemento χ -like / Ig heavy chain class switch repeat 5

Figura 22: Motivos de secuencia recombinogénicos identificados en los puntos de rotura. Los elementos χ -like identificados, están marcados en un recuadro gris. En rojo se muestran las microhomologías de los puntos de rotura. En los pacientes NF234, NF544 y NF109 el punto de rotura está indicado con una línea vertical.

4. Mutaciones de *splicing*

4.1 Caracterización de las mutaciones de *splicing*

El análisis del ADNc de los pacientes nos permitió identificar diferentes mutaciones que alteran el patrón de procesamiento del pre-ARNm del gen *NF1*. En nuestro análisis, el efecto de dichos cambios puntuales que ocurren en el ADNg está bien establecido, aunque los mecanismos y/o las señales que controlan la regulación del *splicing* del gen *NF1* y, en general, de los genes humanos son poco conocidos. Por esto nos propusimos un estudio más profundo de estas mutaciones.

Identificamos 62 mutaciones de *splicing* en 81 pacientes, que suponen el 25% de todas las mutaciones encontradas en nuestra cohorte (Tabla 16). Aproximadamente el 50% han sido previamente descritas (HGMD –Human Genome Mutation Database-) y el otro 50% han sido identificadas por primera vez en este trabajo.

La mayoría de las mutaciones (47/60, 78%) se localizan en los sitios 5' donador o 3' aceptor de *splicing*, un 17% (10/60) ocurren en la secuencia codificante de los exones y un 5% (3/60) se producen en secuencias intrónicas profundas. En cuanto a su efecto sobre el procesamiento del pre-ARNm, la mayoría provocan el *skipping* del exón (42/59, 68%), un 19% (11/59) eliminan parte de la secuencia del exón afectado y un 13% (8/59) producen la inserción de secuencias intrónicas. Únicamente en el caso NF411, no fue posible determinar el efecto de la mutación sobre el *splicing* (c.59A>C) (Tabla 16, fila 1). Dicho cambio se localiza en la penúltima base del exón 1 del gen y el análisis del ARNc mostró que el alelo con la mutación puntual no se expresa. Además, caracterizamos dos casos independientes (NF612 y NF329), en los que la inserción de secuencias *Alu*, en los exones 8 y 10b respectivamente, producen el *skipping* del exón (Tabla 16, filas 19 y 31).

Tabla 16: Espectro de las mutaciones de *splicing*, efecto sobre el ARNm y clasificación.

	Paciente	Localización	Mutación en ADN	Efecto en ARNm	N/D	Tipo
1	NF411	E1	c.59A>C		N	?
2	NF323	I2	c.204+1G>A	SK últimas 105 pb E2	D	IV
3	NF365	I2	c.204+1G>A	SK últimas 105 pb E2	D	IV
4	NF404	I2	c.204+1G>A	SK últimas 105 pb E2	D	IV
5	NF663	I2	c.204+1G>A	SK últimas 105 pb E2	D	IV
6	NF294	I2	c.205-1G>C	SK primeras 2 pb E3	N	IV
7	NF473	E4a	c.478_479delAG	SK E4a	N	I
8	NF702	I4a	c.479+1G>A	SK E4a	D	I
9	NF775	E4b	c.574C>T	SK E4b	D	V
10	NF747	I4b	c.586+5G>T	SK E4b	N	I
11	NF338	I4c	c.654+1G>T	SK E4c	N	I
12	NF681	I4c	c.655-2A>C	SK E5	N	I
13	NF038	I5	c.730+1G>C	SK E5	N	I
14	NF463	E7	c.910C>T	SK E7	D	V
15	NF580	E7	c.910C>T	SK E7	D	V
16	NF748	E7	c.910C>T	SK E7	D	V
17	NF299	I7	c.1063-2A>G	SK E8	D	I
18	NF345	I7	c.1063-13G>A	Inserción I7 (c.1063-11_1063-1)	N	IV
19	NF612	E8	c.1075_1076insAluSb	SK E8	N	?
20	NF730	I8	c.1185+1G>A	SK E8	D	I
21	NF048	I9	c.1260+1604A>G	Inserción 42 pb I9	N	II
22	NF304	I9	c.1260+1604A>G	Inserción 42 pb I9	N	II
23	NF147	E10b	c.1466A>G	SK últimas 62 pb E10b	D	III
24	NF358	E10b	c.1466A>G	SK últimas 62 pb E10b	D	III
25	NF549	E10b	c.1466A>G	SK últimas 62 pb E10b	D	III
26	NF570	E10b	c.1466A>G	SK últimas 62 pb E10b	D	III
27	NF582	E10b	c.1466A>G	SK últimas 62 pb E10b	D	III
28	NF622	E10b	c.1466A>G	SK últimas 62 pb E10b	D	III
29	NF705	E10b	c.1466A>G	SK últimas 62 pb E10b	D	III
30	NF712	E10b	c.1466A>G	SK últimas 62 pb E10b	D	III
31	NF329	E10b	c.1443_1444insAluYb8	SK E10b	N	?
32	NF732	I11	c.1721+1G>T	SK E11	N	I
33	NF374	I11	c.1721+3A>G	SK E11	D	I
34	NF558	I11	c.1721+3A>G	SK E11	D	I
35	NF313	E12a	c.1748A>G	SK primeras 27 pb E12a	D	III
36	NF517	E16	c.2850G>A	SK últimas 233 pb E16	N	IV
37	NF394	I18	c.3113+1G>A	SK E18	D	I
38	NF142	I18	c.3113+5G>C	SK E18	D	I
39	NF661	E20	c.3496G>T	SK E20	N	I
40	NF510	I21	c.3708+2T>A	SK E21	N	I
41	NF731	I21	c.3709-1G>A	Delección 1 pb E22	N	IV
42	NF300	E23.1	c.3974G>C	SK E23.1	N	I
43	NF756	I23.1	c.3974+260T>G	2 inserciones I23.1 (59 pb y 80 pb)	N	II
44	NF611	I23.2	c.4111-2A>G	SK E24	D	I
45	NF373	I24	c.4270-2A>G	SK primeras 9 pb E25	D	IV
46	NF525	E25	c.4367+2T>G	SK E25	N	I
47	NF746	I26	c.4515-2A>G	2 inserciones I26 (14 pb y 17 pb)	D	IV
48	NF433	I27a	c.4662-2A>C	SK primeras 7 pb E27b	N	IV
49	NF509	I27b	c.4772+1G>A	SK últimas 69 pb E27b	D	IV
50	NF653	I27b	c.4773-2A>G	SK primeras 293 pb E28	D	IV
51	NF506	I28	c.5205+1G>A	SK últimas 54 pb E28	D	IV
52	NF231	I28	c.5205+5G>A	SK últimas 54 pb E28	N	IV
53	NF353	E29	c.5224C>T	SK E29	D	V

Continuación Tabla 16.

	Paciente	Localización	Mutación en ADN	Efecto en ARNm	N/D	Tipo
54	NF342	I29	c.5546+2T>C	SK E29	D	I
55	NF505	I30	c.5749+332A>G	Inserción I30 (c.5749+154_5749+331)	D	II
56	NF203	I30	c.5750-1G>A	SK 1 pb E31	N	IV
57	NF714	I31	c.5943+1G>A	SK últimas 43 pb E31	D	IV
58	NF603	I31	c.5944-5A>G	Inserción I31 (c.5944-4_5944_1)	D	IV
59	NF650	I31	c.5944-5A>G	Inserción I31 (c.5944-4_5944_1)	D	IV
60	NF660	I32	c.6085-6_6085-1delTTACA	SK E33	N	I
61	NF412	I33	c.6364+1delG	SK E33	N	I
62	NF288	I33	c.6365-2A>T	SK E34	N	I
63	NF292	I33	c.6365-3C>G	SK E34	D	I
64	NF461	I34	c.6579+1G>C	Inserción I34 (c.6579+1_6579+29)	N	IV
65	NF680	I35	c.6642-2A>G	SK E36	N	I
66	NF684	E36	c.6724C>T	SK E36	D	V
67	NF401	I36	c.6756+1G>T	SK E36	N	I
68	NF528	I36	c.6756+2T>C	SK E36	D	I
69	NF496	E37	c.6791dupA	SK E37	D	V
70	NF512	E37	c.6791dupA	SK E37	D	V
71	NF575	E37	c.6792C>G	SK E37	D	V
72	NF588	E37	c.6792C>A	SK E37	D	V
73	NF595	E37	c.6792C>A	SK E37	D	V
74	NF658	E37	c.6792C>A	SK E37	D	V
75	NF671	E37	c.6792C>A	SK E37	D	V
76	NF507	E37	c.[(6792C>A; 6799C>T)]	SK E37	N	V
77	NF283	E37	c.6801A>G	SK E37	N	V
78	NF495	E37	c.6856_6858delAAG	SK E37	N	I
79	NF656	I37	c.6858+1G>T	SK E37	D	I
80	NF478	I38	c.7000-2A>G	SK E39	D	I
81	NF395	I38	c.7000-1_7000dupG	Inserción I38 (c.7000-101_7000-1)	N	IV

N: mutación nueva; D: mutación previamente descrita; E: exón; I: intrón; SK: *skipping*.

Para una mejor comprensión y análisis de las mutaciones, las clasificamos en cinco grupos siguiendo las recomendaciones de K. Wimmer (Wimmer *et al.*, 2007) (Figura 23):

Tipo I: alteran las secuencias consenso de *splicing* y producen la pérdida completa del exón (*skipping*). Son el grupo mayoritario en nuestra cohorte (28/59, 48%).

Tipo II: crean un nuevo sitio de *splicing* en secuencias intrónicas profundas y se produce la activación de un sitio crítico, lo que comporta la inserción de parte del intrón en el ARNm maduro. En nuestro grupo son minoritarias (3/59; 5%).

Tipo III: crean un nuevo sitio de *splicing* en secuencias exónicas y producen la pérdida de parte del exón. Son minoritarias en nuestra muestra (2/59, 3%).

Tipo IV: alteran las secuencias consenso de *splicing* y, además, se produce la activación de un sitio críptico de *splicing*. Según la localización del sitio críptico, estas mutaciones comportan la ganancia de secuencias intrónicas (5/17; 29%) o la pérdida de regiones exónicas (12/17; 71%). Son el segundo grupo más frecuente en nuestra cohorte (17/59, 29%).

Tipo V: se localizan en secuencias exónicas y producen la pérdida completa del exón. Son poco abundantes en nuestra muestra (9/59, 15%).

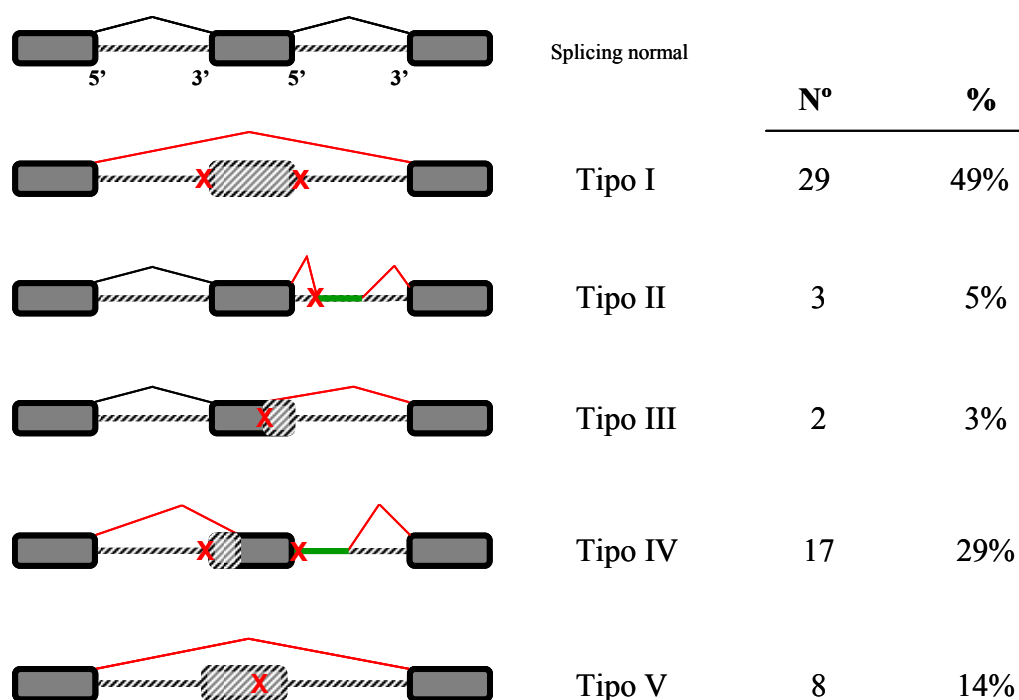


Figura 23: Clasificación de las mutaciones de *splicing*. Los recuadros grises indican los exones y las líneas horizontales entre ellos representan los intrones. Las líneas y recuadros rayados, indican las secuencias intrónicas y exónicas que se eliminan durante el proceso de *splicing*. Las líneas verdes muestran las secuencias intrónicas que se incluyen en el ARNm maduro como consecuencia de la mutación. Las “X” muestran el punto donde se produce la mutación. Las líneas rojas sobre cada diagrama indican el *splicing* alterado del pre-ARNm. 5’: sitio donador de *splicing*; 3’: sitio aceptor de *splicing*; Nº: número de casos identificados en nuestra cohorte para cada tipo de mutación; %: el porcentaje que representan respecto del total.

4.2 Análisis *in silico* de las mutaciones de *splicing*

Diferentes estudios han puesto de manifiesto que muchas mutaciones puntuales identificadas en ADN_g afectan al correcto procesamiento del pre-ARN_m. Sin embargo, para algunas patologías, el análisis de los transcritos no es posible y, por tanto, es necesario recurrir a herramientas informáticas que predican el efecto de una mutación sobre el procesamiento del pre-ARN_m. Con objeto de valorar la utilidad y acierto de estos programas, realizamos un análisis *in silico* de las mutaciones de *splicing* identificadas en nuestra cohorte. Para analizar la funcionalidad de los sitios 5' donadores o 3' aceptores utilizamos los programas MaxEntScan y Splice Site Prediction by Neural Network (SSPNN) (Tabla 17).

Según la clasificación anterior, los cambios localizados en los sitios 5' donadores y 3' aceptores son mutaciones de tipo I o IV. En estos casos, ambos programas de predicción, o al menos uno de ellos, mostraron una significativa pérdida de funcionalidad del sitio mutado. Únicamente en tres de dichas mutaciones, c.586+5G>T, c.5205+5G>A y c.1063-13G>A (Tabla 17, filas 3, 38 y 42, respectivamente), el análisis mostró una disminución menos notable, cercana al 50%. Los programas hacen una buena valoración de la funcionalidad de los sitios de *splicing* silvestres y mutados. Sin embargo, según nuestro análisis, la valoración de la funcionalidad de los sitios críticos de *splicing* no es acertada. En 7 de las 17 (41%) mutaciones tipo IV identificadas (Tabla 17, valores en azul), los sitios críticos utilizados *in vivo* mostraron muy baja o nula funcionalidad. En 6 de estos casos (filas 36, 39, 43, 45, 48 y 50), el programa SSPNN no encontró ningún sitio crítico en los exones o en las 50 pb flanqueantes (datos no mostrados). Por esta razón, la predicción del efecto de la mutación hubiera sido errónea, al considerar que estas mutaciones producirían el *skipping* del exón. Otro ejemplo ilustrativo es el caso de la mutación c.6579+1G>C (fila 40). Este cambio inactiva el sitio 5' aceptor de *splicing* (0.41>0) y se produce la activación de un sitio crítico 3' donador, localizado en la posición +29 del intrón. Ninguno de los programas valoró correctamente la funcionalidad de dicho sitio crítico. De hecho, el análisis *in silico* mostró la existencia de otro sitio crítico en el exón, con un *score* de 0,41. En resumen, para las mutaciones tipo I y tipo IV, los programas de predicción son útiles para valorar la pérdida de un sitio consenso de *splicing*, sin embargo, es difícil conocer el efecto que causarán en el ARN_m.

Tabla 17: Análisis *in silico* de las mutaciones de *splicing* tipo I, II, III y IV utilizando los programas SSPNN y MaxEntScan. En la columna "Secuencia" en minúscula aparece la secuencia intrónica y en mayúscula la exónica; en rojo se indican las mutaciones puntuales y subrayados los nucleótidos que se insertan o deletan. Los nucleótidos que corresponden a los nuevos sitios 5' donadores (GT) o 3' aceptores (AG) aparecen en negrita (mutaciones tipo II, III y IV).

Tipo I (5' donador)				Funcionalidad sitio 5' donador					
Mutación	Efecto	Secuencia		SSPNN	MAXENT	MDD	MM	WMM	
1 c.478_479delAG	SK4a	CAGgtagt	wt	1	8,2	13,18	7,77	8,12	
		ACCgtagt	mut	0,44	-0,89	6,68	-2,96	2,56	
2 c.479+1G>A	SK4a	CAGgtagt	wt	1	8,2	13,18	7,77	8,12	
		CAGattagt	mut	0	-0,16	5	-0,41	-0,06	
3 c.586+5G>T	SK4b	AGGgtaagt	wt	1	10,45	14,98	10	10,43	
		AGGgtaatt	mut	0,82	6,62	9,28	4,97	6,52	
4 c.654+1G>T	SK4c	AAGgtaagt	wt	1	11	15,48	12,2	12,71	
		AAGttaagt	mut	0	2,49	6,97	3,68	4,2	
5 c.730+1G>C	SK5	CTGgtaaggt	wt	0,99	9,68	13,48	8,54	10,1	
		CTGttaagg	mut	0	1,4	5,2	0,27	1,83	
6 c.1185+1G>A	SK8	AAGgtgaga	wt	0,99	8,68	13,98	9,67	9,98	
		AAGatgaga	mut	0	0,5	5,8	1,49	1,8	
7 c.1721+1G>T	SK11	TAGgtatata	wt	0,79	4,89	8,38	4,45	4,64	
		TAGttatata	mut	0	-3,62	-0,13	-4,05	-3,87	
8 c.1721+3A>G	SK11	TAGgtatata	wt	0,79	4,89	8,38	4,45	4,64	
		TAGgtgat	mut	0	-0,55	5,28	1,14	3,26	
9 c.3113+1G>A	SK18	TAGgtgagt	wt	0,99	8,83	13,48	9,08	9,66	
		TAGatgagt	mut	0	0,65	5,3	0,9	1,47	
10 c.3113+5G>C	SK18	TAGgtgagt	wt	0,99	8,83	13,48	9,08	9,66	
		TAGgtgact	mut	0,16	3,75	6,98	4,21	5,82	
11 c.3496G>T	SK20	TAGgtgaga	wt	0,79	6,95	10,58	7,44	8,31	
		TATgtgaga	mut	0,06	1,04	7,58	3,19	4,19	
12 c.3708+2T>A	SK21	AAGgtttgt	wt	0,92	7,81	11,58	6,11	4,81	
		AAGattgt	mut	0	-0,38	3,99	-2,07	-3,37	
13 c.3974G>C	SK23.1	CAGgtttgt	wt	0,75	7,44	11,18	6,68	5,18	
		CACgtttgt	mut	0	-1,97	2,38	-2,83	2,32	
14 c.4367+2T>G	SK25	CAGgtaatt	wt	0,88	8,55	13,08	7,72	9,17	
		CAGggaatt	mut	0	0,91	5,43	0,07	1,52	
15 c.5546+2T>C	SK29	ACGgtaggt	wt	0,97	10,15	12,98	9,79	7,99	
		ACGgcaggt	mut	0	2,4	5,22	2,04	0,24	
16 c.6364+1delG	SK33	GTGgtaagt	wt	1	10,36	14,28	9,19	9,83	
		GTGtaagt	mut	0	-15,69	-11,41	-15	-13,13	
17 c.6756+1G>T	SK36	AAGgtacct	wt	0,89	8,49	11,68	6,88	5,88	
		AAGttacct	mut	0	-0,01	3,17	-1,63	-2,62	
18 c.6756+2T>C	SK36	AAGgtacct	wt	0,89	8,49	11,68	6,88	5,88	
		AAGgcacct	mut	0	0,74	3,92	-0,88	-1,87	
19 c.6856_6858delAAG	SK37	AATAAGgtaatt	wt	0,99	8,83	12,58	7,16	8,8	
		AATgtaatt	mut	0,68	1,5	0,68	2,44	4,68	
20 c.6858+1G>T	SK37	AAGgtaatt	wt	0,99	8,83	12,58	7,16	8,8	
		AAGttaatt	mut	0	0,33	4,07	-1,34	0,3	

Continuación Tabla 17.

Tipo I (3' aceptor)				Funcionalidad sitio 3' aceptor				
Mutación	Efecto	Secuencia		SSPNN	MAXENT	MDD	MM	WMM
21 c.655-2A>C	SK5	ttatagGCA	wt	0,99	8,27		8,95	9,14
		ttatcgGCA	mut	0	0,23		0,91	1,09
22 c.1063-2A>G	SK8	ttatagAAC	wt	0,68	5,74		5,49	7,14
		ttatggAAC	mut	0	-2,22		-2,46	-0,81
23 c.4111-2A>G	SK24	tttttagGTG	wt	0,99	9,43		11,1	10,98
		ttttggGTG	mut	0	1,47		3,12	3,02
24 c.6085-6_6085-1del	SK33	ttacagGTT	wt	0,99	8,65		9,7	10,36
		gcttctGTT	mut	0	-13,5		-15	-20,65
25 c.6365-2A>T	SK34	ttacagAAG	wt	0,93	9,6		11	12,79
		ttactgAAG	mut	0,19	1,23		2,28	4,42
26 c.6365-3C>G	SK34	ttacagAAG	wt	0,93	9,6		11	12,79
		ttaggAAG	mut	0	0,14		-0,11	3,88
27 c.6642-2A>G	SK36	ttgcagAAT	wt	0,56	7,85		8,96	6,96
		ttgcggAAT	mut	0	-0,11		1,01	-1
28 c.7000-1_7000dupG	SK39	taatagAGT	wt	0,47	4,48		5,64	5,3
		aataggAGT	mut	0	-1,53		0,25	-0,78

Tipo II (crea nuevo 5' donador)				Funcionalidad sitio 5' donador				
Mutación	Efecto	Secuencia		SSPNN	MAXENT	MDD	MM	WMM
29 c.3974+260T>G	ins 59/80 pb I23.1	tagttaagt	sec wt	0	1,16	5,17	1,45	2,53
		taggtaagt	sec mut	1	9,66	13,68	9,96	11,04
		ccttagatc	3' cript 1	0,97	9,87		10,1	11,26
		ttaaggtta	3' cript 2	0,96	10,24		11,3	12,96
30 c.5749+332A>G	ins 177 pb I30	cacataagt	sec wt	0	1,97	7,1	1,54	2,04
		cacgtaagt	sec mut	1	10,16	15,28	9,72	10,22
		ctgaaggaa	3' cript	0	1,56	3,05	1,22	0,98

Tipo II (crea nuevo 3' aceptor)				Funcionalidad sitio 3' aceptor				
Mutación	Efecto	Secuencia		SSPNN	MAXENT	MDD	MM	WMM
31 c.1260+1604A>G (2 casos)	ins 42 pb I9	ctacaactg	sec wt	0	-0,49		-0,58	-1,59
		ctacagctg	sec mut	0,92	8,26		8,17	7,16
		GCTgtaagt	5' cript	0,96	8,56	12,68	6,46	5,41

Tipo III (crea un 5' donador)				Funcionalidad sitio 5' donador				
Mutación	Efecto	Secuencia		SSPNN	MAXENT	MDD	MM	WMM
32 c.1466A>G (8 casos)	SK últimas 62 pb E10b	TGTgtaagt	wt	0,86	7,65	11,48	5,9	4,64
		AGCTATAAG	sec wt	0	0,38	4,5	-1,73	-2,78
		AGCTGTAAG	sec mut	0,97	8,56	12,68	6,46	5,41

Tipo III (crea un 3' aceptor)				Funcionalidad sitio 3' aceptor				
Mutación	Efecto	Secuencia		SSPNN	MAXENT	MDD	MM	WMM
33 c.1748A>G	SK primeras 27 pb E12a	ctgcagCTC	wt	0,23	5,54		7,25	6,36
		TGCAAGAAA	sec wt	0,03	1,06		0,54	1,24
		TGCAAGAAA	sec mut	0,73	9,81		9,3	9,99

Continuación Tabla 17.

Tipo IV (inactiva el 5' donador)				Funcionalidad sitio 5' donador				
Mutación	Efecto	Secuencia		SSPNN	MAXENT	MDD	MM	WMM
34 c.204+1G>A (4 casos)	SK últimas 105 pb E2	ATGgtgagt	wt	0,99	10,13	14,08	9,22	9,29
		ATG at gagt	mut	0	1,94	5,9	1,04	1,11
		AAAG T CAGT	cript	0,48	1,98	7,18	0,06	5,02
35 c.2850G>A	SK últimas 233 pb E16	CAGgtaaag	wt	0,92	9,65	14,28	8,28	8,69
		CA A gtaaag	mut	0,31	2,69	8,18	4,6	5,52
		AACG T AAGG	cript	0,95	7,34	12,28	7,47	8,92
36 c.4772+1G>A	SK últimas 69 pb E27b	GAGgtaaga	wt	0,99	10,06	13,38	10,1	10,53
		GAG at aaga	mut	0	1,88	5,2	1,95	2,34
		AACG T TAAG	cript	0	-14,85	2,88	-6,76	0,51
37 c.5205+1G>A	SK últimas 54 pb E28	AAAgtaagt	wt	0,98	9,72	14,58	8,51	9,54
		AAA at aagt	mut	0	1,54	6,4	0,32	1,36
		AAGG T ATTC	cript	0,72	6,8	10,08	4,92	4,63
38 c.5205+5G>A	SK últimas 54 pb E28	AAAgtaagt	wt	0,98	9,72	14,58	8,51	9,54
		AAAg ta at	mut	0,45	4,06	7,28	4,04	6,09
		AAGG T ATTC	cript	0,72	6,8	10,08	4,92	4,63
39 c.5943+1G>A	SK últimas 43pb E31	CAGgtattg	wt	0,58	8,35	11,18	6,87	5,29
		CAG at attg	mut	0	0,17	3	-1,31	-2,89
		GATG T ACCC	cript	0,01	1,65	-1,42	1,82	-0,3
40 c.6579+1G>C	ins primeras 29 pb I34	GAGgtatag	wt	0,41	7,13	10,48	6,27	4,54
		GAG at atag	mut	0	-1,05	2,3	-1,91	-3,65
		taag t aaa	cript	0	-11,9	-1,62	-6,55	-1,88
Tipo IV (inactiva el 3' aceptor)				Funcionalidad sitio 3' aceptor				
41 c.205-1G>C	SK primeras 2 pb E3	tgtagAGA	wt	0,79	4,4		5,66	6,26
		tg ta cAGA	mut	0	-3,67		-2,4	-1,8
		ttagAGAAT	sec wt	0	0,54		-1,74	-0,63
		tt a AGAAT	sec mut	0,82	8,7		9,32	8,28
42 c.1063-13G>A	ins últimas 11 pb I7	ggggtttatagAAC	wt	0,68	5,74		5,49	7,14
		agg g ttttatagAAC	mut	0,65	1,68		1,64	6,73
		tg tt ggggt	sec wt	0	-1,15		-0,22	1,85
		tg tt agggt	sec mut	0,81	6,81		7,74	9,81
43 c.4270-2A>G	SK primeras 9 pb E25	gtgtagATA	wt	0,91	7,92		8,47	7,43
		gtg g ATA	mut	0	-0,03		0,52	-0,53
		tagATACTTCAGAGT	sec wt	0,07	-2,12		-0,63	2,7
		tg g ATACTTCAGAGT	sec mut	0,16	3,45		5,08	3,39
44 c.3709-1G>A	SK primera pb E22	tctcagGAT	wt	0,99	9,74		11	11,54
		tct ca aGAT	mut	0	0,99		2,2	2,79
		ctcagGATG	sec wt	0	-1,87		-0,06	1,06
		ct ca aGATG	sec mut	0,58	6,09		7,9	9,02
45 c.4515-2A>G	ins 14/17pb I26	atctagGGA	wt	0,49	5,36		6,89	7,21
		atct g GGA	mut	0	-1,99		-1,08	-0,09
		aagtagttt	cript 1	0,92	7,89		8,57	8,86
		tct a agtag	cript 2	0	1,35		2,07	1,96
46 c.4662-2A>C	SK pirmeras 7 pb E27b	ttttagGCA	wt	0,99	10,3		12,1	13,75
		ttt cg GCA	mut	0	2,26		4,1	5,71
		tagGCATCAGGTA	sec wt	0	-0,76		0,31	8,18
		t cg GCATCAGGTA	sec mut	0,95	7,15		7,87	10,41
47 c.4773-2A>G	SK primeras 293 pb E28	ccttagGTT	wt	1	11,72		12,4	13,24
		cct tg GTT	mut	0	3,76		4,39	5,29
		TCATAGACT	cript	0,84	3,02		2,46	3,75

Continuación Tabla 17.

Tipo IV (inactiva el 3' acceptor)			Funcionalidad sitio 3' acceptor					
48	c.5750-1G>A		ttccagGTA	wt	0,98	8,44	8,65	10
		SK primera	ttcca a GTA	mut	0	-0,31	-0,11	1,25
		pb E31	tccagGTAT	sec wt	0	-5,81	-4,73	-2,37
			tcca a GTAT	sec mut	0,08	2,15	3,22	5,59
49	c.5944-5A>G (2 casos)		aactagATT	wt	0,98	8,12	10,5	10,77
		ins últimas	agctagATT	mut	0	3,38	5,46	10,5
		4 pb I31	cttcaacta	sec wt	0	0,58	1,97	3,88
			cttca g cta	sec mut	0,98	9,33	10,7	12,63
50	c.7000-2A>G	ins	taatagAGT	wt	0,47	4,48	5,64	5,3
		últimas 101	taat g AGT	mut	0	-3,48	-2,31	-2,65
		pb I38	tga a aggat	cript	0	2,56	3,47	0,67

E: exón; *I*: intrón; *SK*: *skipping*; *ins*: inserción; *wt*: sitio consenso; *mut*: sitio consenso mutado; *cript*: sitio críptico; *sec wt*: secuencia intrónica o exónica que no participa en el *splicing*; *sec mut*: la sec wt mutada.

En el caso de las mutaciones tipo II y tipo III (filas 29-33) también encontramos que los programas predicen con acierto la funcionalidad de los nuevos sitios 5' donadores o 3' aceptores creados por la mutación. Sin embargo, en las tres mutaciones tipo II identificadas, además de la creación de un nuevo sitio de *splicing* se produce la activación de un sitio críptico para conseguir la “exonización” de una secuencia intrónica. La predicción sobre la funcionalidad del sitio críptico utilizado es variable. En el caso de la mutación c.3974+260T>G (fila 29) observamos que se activan dos sitios crípticos funcionales, sin embargo el sitio críptico utilizado en el caso de la mutación 5749+332A>G (fila 30) mostró un *score* bastante bajo en todos los programas. Otro hecho particular del efecto de estas mutaciones es el del cambio c.1260+1604A>G que se produce en el intrón 9, a 13 pb del inicio del exón 9br (Figura 24). Este cambio crea un nuevo sitio 3' acceptor funcional (*score* de 0,92) en el intrón (ctacaactg > ctaca**g**ctg) y el exón 9br que muestra *splicing* alternativo, se transforma en un exón constitutivo. La creación del nuevo sitio 3' acceptor comporta la utilización del sitio 5' donador que es funcional exclusivamente en algunos tejidos del sistema nervioso central, produciéndose la inclusión del 9br y de 12 pb de secuencia intrónica.

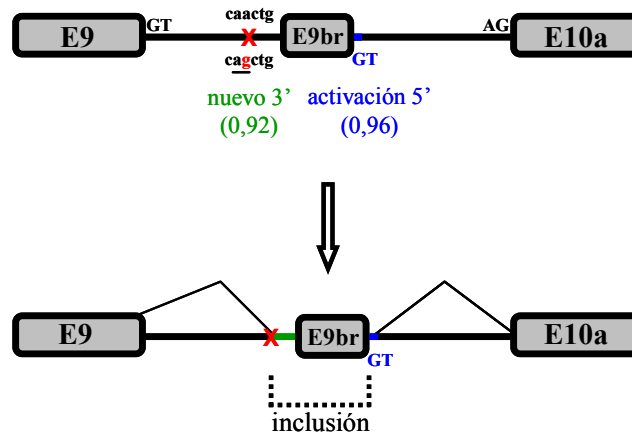


Figura 24: *Splicing* aberrante producido por la mutación c.1260+1604A>G. La “X” indica la posición de la mutación y en azul se muestra la activación del sitio 5’ donador del exón 9br. Los valores entre paréntesis indican el *score* para los diferentes sitios de *splicing* según SSPNN.

Por último, realizamos un estudio *in silico* de las mutaciones tipo V. Valoramos la capacidad de dos programas ESEfinder y RESCUE-ESE, para predecir la pérdida de elementos ESE como consecuencia de las mutaciones (Tabla 18). De las 9 mutaciones tipo V identificadas, en 8 de ellas uno de los dos programas predecía la pérdida de un ESE o la disminución del *score* para una proteína SR concreta. Sin embargo, los resultados ofrecidos por ambos programas fueron contradictorios para la mayoría de mutaciones y en ningún caso obtuvimos una predicción certera indicando la pérdida de un ESE por efecto de la mutación. Por tanto, actualmente no creemos posible catalogar un cambio puntual, identificado en ADNg, como mutación de *splicing* tipo V, utilizando únicamente las herramientas *in silico* disponibles.

Tabla 18: Análisis *in silico* de las mutaciones de *splicing* tipo V utilizando los programas ESEfinder y RESCUE-ESE.

Tipo V	Efecto en RNA		ESE finder Proteína SR	Score	RescueESE Hexámeros
c.574C>T	SK 4b	wt	SRp40	3,03286	2 hexámeros
			SRp40	3,75218	
		mut	SRp40	-	destruye 2
			SRp40	4,10887	crea 1 hexám
c.910C	SK 7	wt	SRp40	3,00931	2 hexámeros
		mut	SRp40	3,366	destruye 2 crea 2 nuevos
c.5224C>T	SK 29	wt	-	-	1 hexámero
		mut	SRp55	3,02231	desaparece hex
c.6724C>T	SK 36	wt	-	-	ninguno
		mut	SRp55	2,70848	ninguno
c.6791dupA	SK 37	wt	SRp40	4,60188	ninguno
		mut	-	-	crea 1 hexám
c.6792C>G	SK 37	wt	SRp40	4,60188	ninguno
		mut	SRp40	2,87756	crea 1 hexám
c.6792C>A	SK 37	wt	SRp40	4,60188	ninguno
		mut	SRp40	3,00000	crea 1 hexám
c.6792C>A	SK 37	wt	SRp40	4,60188	ninguno
		mut	SRp40	3,00000	crea 1 hexám
c.6799C>T	SK 37	wt	SRp40	2,80000	1 hexámero
		mut	SRp40	-	desaparece hex
c.6801A>G	SK 37	wt	SRp40	2,83813	1 hexámero
		mut	SRp40	3,40596	desaparece hex
			SF2/ASF	2,9319	

SK: *skipping*; wt: secuencia silvestre; mut: secuencia mutante; hexám: hexámero.

4.3 Análisis funcional de mutaciones tipo V

En el gen *NF1*, hasta este momento, se han descrito alrededor de 20 mutaciones tipo V (HGMD). Específicamente los exones 7 y 37 muestran una alta proporción de dicho tipo de cambios, con un total de 10 mutaciones descritas (Tabla 19). Con el objeto de confirmar la existencia de elementos SRE (ESE o ESS) en dichos exones, y para definir su naturaleza, llevamos a cabo un análisis funcional de varias mutaciones identificadas en pacientes con NF1.

Tabla 19: Mutaciones tipo V descritas hasta la fecha en los exones 7 y 37.

Exón 7		
Mutación	Efecto en proteína	Fuente
c.910C>T	NS	Hoffmeyer <i>et al.</i> , 1998
c.943C>T	NS	Wimmer <i>et al.</i> , 2000
c.[945G>A;946C>A]	silenciosa / MS	Colapietro <i>et al.</i> , 2003
c.1007G>A	NS	Wimmer <i>et al.</i> , 2000
c.1039C>T	NS	Pros <i>et al.</i> , 2006

Exón 37		
Mutación	Efecto en proteína	Fuente
c.6791dupA	FS	Pros <i>et al.</i> , 2006
c.6792C>G	NS	Messiaen <i>et al.</i> , 1997
c.6792C>A	NS	Messiaen <i>et al.</i> , 1997
c.[6792C>A;c.6799C>T]	NS / NS	En este trabajo
c.6801A>G	silenciosa	En este trabajo

NS: nonsense; MS: missense; FS: frameshift.

4.3.1 Estudio funcional de las mutaciones en el exón 7

La secuencia codificante del exón 7 (147 pb), se encuentra en fase en el gen *NFI*. Por esto, las mutaciones de *splicing* tipo V van a producir una deleción y una proteína de menor tamaño, con 58 aminoácidos menos; independientemente de la naturaleza del cambio: *missense*, *nonsense* o pequeña deleción. Sin embargo, hay que recordar que una proporción variable de los transcritos “escapa” al *skipping*, por lo que también se expresa el alelo que porta la mutación puntual.

Por otra parte, una información relevante para este análisis, que nos sirvió como punto de partida, es que los elementos ESE se asocian generalmente a sitios 5’ donadores y/o 3’ aceptores débiles (Graveley, 2000; Fairbrother *et al.*, 2002; Baralle *et al.*, 2006). Siguiendo esta regla encontramos que el exón 7 muestra un sitio 3’ aceptor de *splicing* muy débil (SSPNN: 0,64; MAXENT: 3,66; MM: 3,74; WMM: 4,5).

4.3.1.1 Construcción del minigen E7-pSPL3 para el análisis de las mutaciones tipo V

En primer lugar, se generó el vector recombinante E7-pSPL3 que contenía el exón 7 (147 pb) junto con 258 y 248 pb de los intrones 6 y 7, respectivamente. Posteriormente, por mutagénesis dirigida, se obtuvieron seis minigenes que portaban todos los cambios tipo V identificados en el exón 7, en pacientes con NF1. En el caso de la doble mutación c.[945G>A;946C>A] generamos dos minigenes (c.945G>A y c.946C>A) para determinar el efecto de cada cambio de forma independiente. En la Figura 25 se puede observar la posición relativa de dichas mutaciones a lo largo del exón 7.

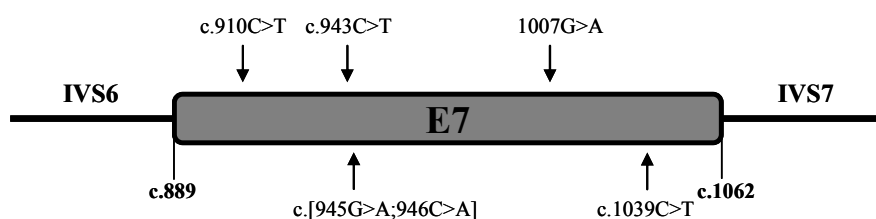


Figura 25: Localización de las mutaciones tipo V en el exón 7.

Mediante transfección de estos minigenes en células HeLa y posterior extracción del ARN y RT-PCR, analizamos el efecto de dichas mutaciones sobre el ARNm producido por cada minigen, estimando la proporción de transcritos que incluyen el exón 7 (Figura 26). En los transcritos derivados del minigen silvestre (WT) el exón 7 se incluía en el 67% de los casos. En los transcritos derivados de los minigenes mutantes, sin embargo, la tasa de inclusión se reducía a <10% para todos los constructos, excepto en el caso del minigen que portaba la mutación c.1039C>T que mostró una tasa de inclusión del 27%. Además, generamos un control negativo, el plásmido con la mutación c.1020dupT que *in vivo* no afecta al *splicing*. En este caso, encontramos que la tasa de inclusión era del 64%, muy similar a la del plásmido silvestre. Estos resultados indican que el minigen E7-pSPL3 es una buena herramienta para el estudio de las mutaciones tipo V.

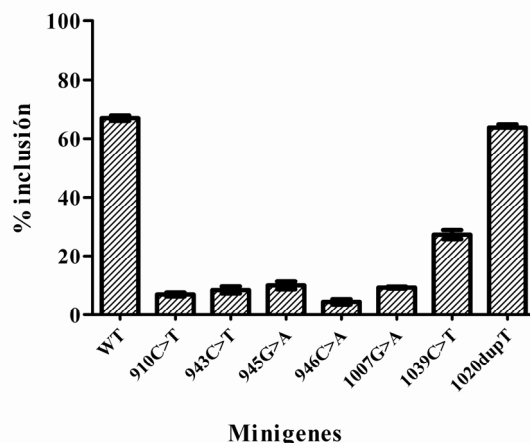


Figura 26: Proporción de transcritos derivados de los minigenes silvestre y mutantes que incluyen el exón 7. *WT*: minigen silvestre.

4.3.1.2 Definición de los elementos reguladores presentes en el exón 7

Para identificar los posibles elementos reguladores, mediante mutagénesis dirigida, generamos un total de 40 cambios en el minigen E7-pSPL3 y determinamos la proporción de transcritos producidos por cada minigen que incluían el exón 7. En la posición c.910 generamos todos los posibles cambios y también se mutaron los nucleótidos adyacentes, desde la posición c.908 a la posición c.912 (Figura 27A). Todos los cambios en c.910 comportaban una reducción significativa en la tasa de inclusión, presentando valores inferiores al 10%. Las mutaciones en posición c.911 también producían una inclusión significativamente menor que la observada con el minigen silvestre. No observamos diferencias en las posiciones c.908, c.909 y c.912. Por tanto, estos datos sugieren que las secuencias c.910 y c.911 son posiciones relevantes de un elemento ESE.

Mediante mutagénesis dirigida también investigamos la segunda región exónica que afecta el *splicing* del exón 7. Generamos los tres posibles cambios en todos los nucleótidos desde la posición c.943 a la posición c.946 (Figura 27B). Prácticamente todos los cambios en c.943, c.945 (salvo c.945G>C) y c.946 alteraban el *splicing* del exón 7, mostrando una inclusión significativamente menor que el minigen silvestre. Por el contrario, todos los cambios en posición c.944 producían una inclusión cercana al 95%, superior a la observada en el minigen silvestre. Estos datos sugieren que la región c.943_946 podría formar parte de un elemento compuesto de regulación del *splicing* (CERES) en el que existe un solapamiento de elementos ESE y ESS.

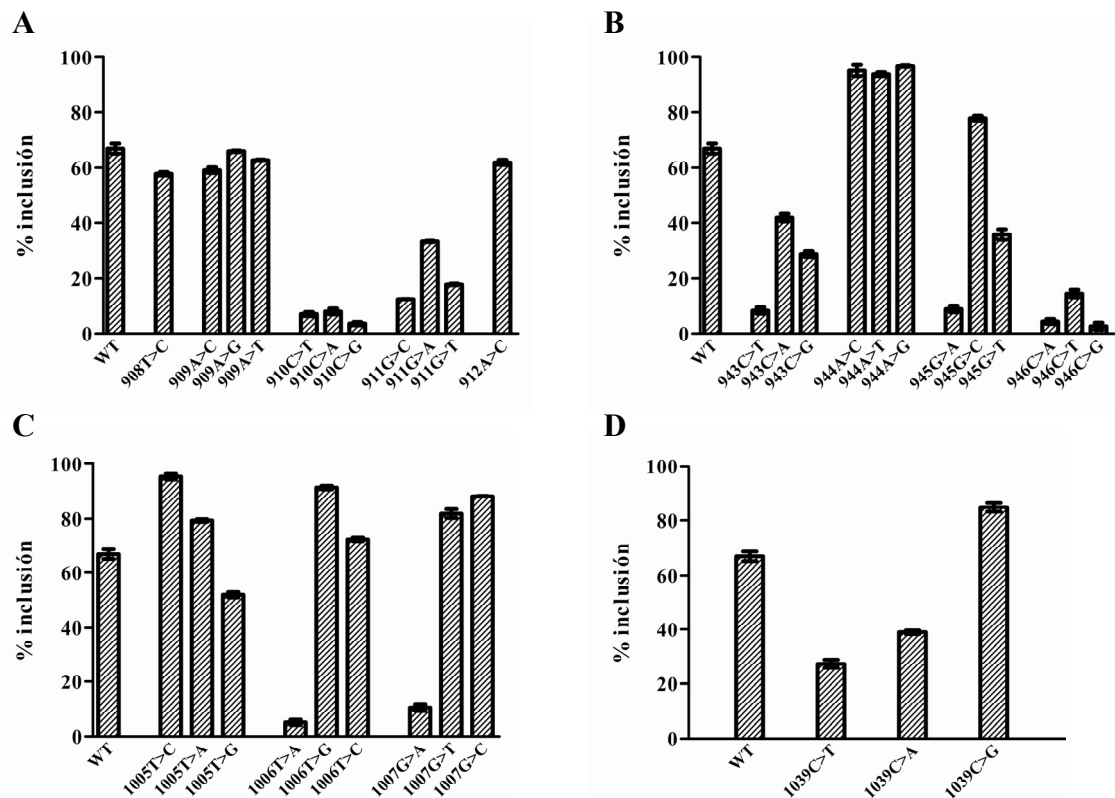


Figura 27: Definición de elementos SREs en el exón 7. Se muestra la proporción de transcritos derivados de los diferentes minigenes mutantes que incluyen el exón 7. **A:** Región c.908_912. **B:** Región 943_946. **C:** Región c.1005_1007. **D:** Posición c.1039.

También se mutagenizaron los residuos de la región c.1005_1007. Observamos que únicamente la mutación patológica c.1007G>A y el cambio c.1006T>A producían una disminución significativa de la inclusión (Figura 27C). La mutación c.1007G>A crea un motivo UAGGAA (c.1006_1011), que presenta una alta homología al motivo de unión del regulador negativo del *splicing* hnRNPA1 (UAGGGA), mientras que el cambio c.1006T>A crea una secuencia idéntica (c.1005_1010) al motivo de unión de hnRNPA1. Estos datos sugieren que la mutación patológica c.1007G>A podría generar un nuevo elemento ESS que, mediante la unión de la proteína hnRNPA1, induciría el *skipping* del exón.

En la posición c.1039 también generamos los tres posibles cambios (Figura 27D). La mutación c.1039C>T identificada en dos pacientes independientes, producía una inclusión del exón 7 menor (27%) a la observada en el minigen salvaje. El segundo cambio, C>A, disminuía moderadamente la inclusión (39%), sin embargo, el tercer

cambio, C>G, la aumentaba (85%). Por tanto, no es evidente que la mutación c.1039C>T afecte a un elemento ESE o cree un ESS.

Por último, con objeto de obtener una prueba adicional de la existencia de elementos ESE en el exón 7, se modificó el sitio 3' aceptor natural de dicho exón por otro más funcional, generando la mutación c.889-10_889-9delinsTT (SSPNN: 0,64 > 0,98). Esta modificación se realizó en el minigen silvestre y en cuatro de los minigenes mutantes: c.910C>T, c.943C>T, c.945G>A y c.946C>A. Tal y como suponíamos se incrementó significativamente la inclusión del exón 7 en los transcritos del minigen silvestre aumentando de un 67 hasta un 97% (Figura 28). Además, confirmamos que la presencia del nuevo sitio 3' mejorado revertía el efecto de las cuatro mutaciones analizadas, apoyando nuestra hipótesis inicial.

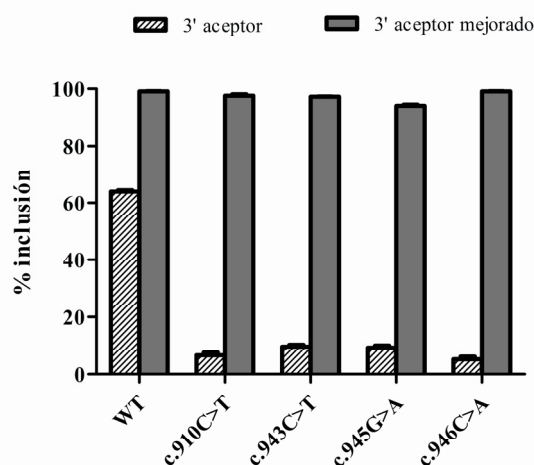


Figura 28: Proporción de transcritos que incluyen el exón 7 derivados de cada uno de los minigenes. Las barras rayadas muestran los valores para los minigenes con el sitio 3' aceptor natural del exón 7. Las barras grises muestran los valores para estos mismos minigenes que portan un sitio 3' mejorado (c.889-10_889-9delinsTT).

4.3.1.3 Estudios de sobreexpresión de proteínas SR

Con el objeto de identificar las proteínas SR que pudieran unirse a los elementos ESE del exón 7, cuantificamos los diferentes transcritos derivados del minigen, en células que sobreexpresaban diferentes proteínas SR. Para ello, se cotransfectó el minigen silvestre E7-pSPL3 junto con plásmidos que expresaban cada una de las siguientes proteínas SR: SRp20, SRp30, SRp40, SRp55, SRp75, SC35 y SF2. En dos

cultivos celulares, donde se sobreexpresaron las proteínas SRp40 y SC35, se observó un incremento significativo de la tasa de inclusión (Figura 29A). Observamos también que la proteína SRp75 ejercía un fuerte efecto silenciador, produciendo una inclusión de tan sólo el 4%. Es sabido que algunas proteínas SR, dependiendo del contexto, pueden también actuar como inhibidores del procesamiento de los exones (ver Discusión).

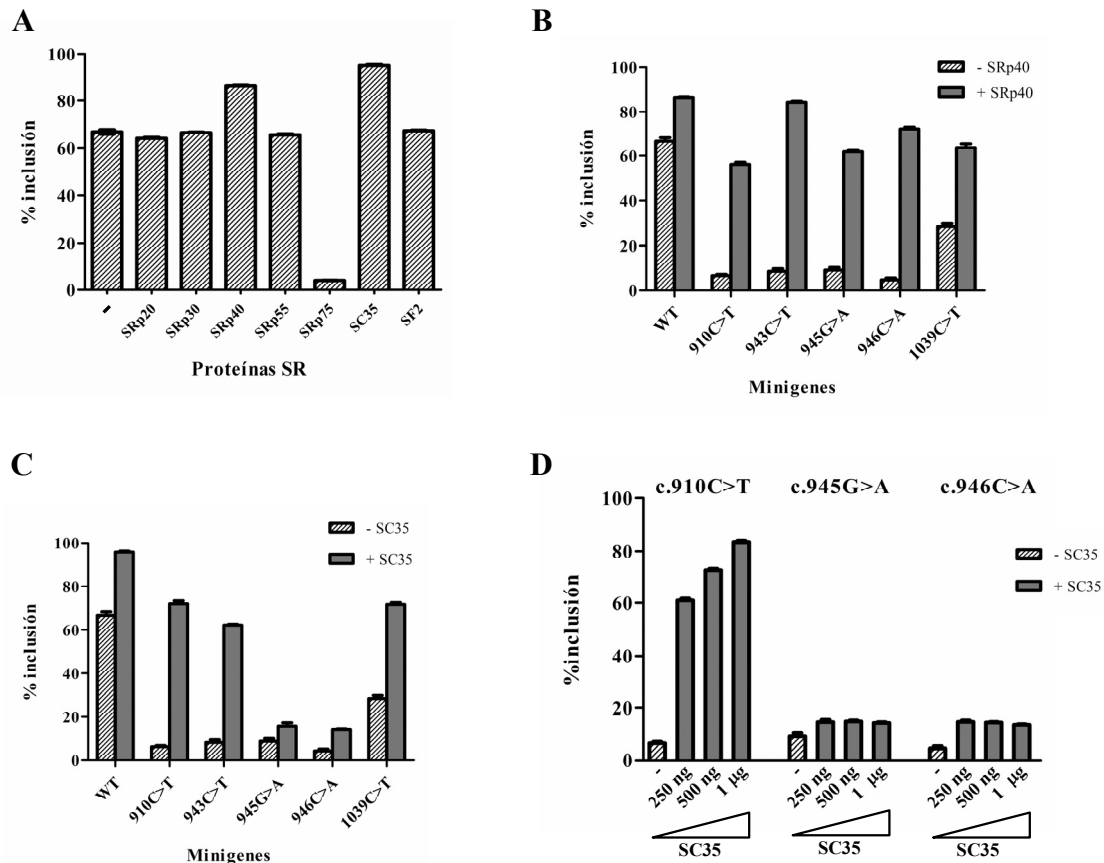


Figura 29: Ensayos de sobreexpresión de diferentes proteínas SR. **A:** Ensayos de sobreexpresión de proteínas SR en células transfectadas con el minigen silvestre. **B:** Ensayo de sobreexpresión de SRp40 en células transfectadas con el minigen silvestre y los diferentes minigenes mutantes. **C:** Ensayos de sobreexpresión de SC35. **D:** Proporción de transcritos que incluyen el exón 7 derivados de los diferentes minigenes a concentraciones crecientes de SC35.

A continuación, quisimos determinar los motivos de unión de SRp40 y SC35 en el exón 7. Para ello se cotransfectaron las células con diferentes minigenes mutantes y con los plásmidos que expresaban las proteínas SRp40 o SC35. La sobreexpresión de SRp40 producía un aumento significativo de la inclusión del exón 7 en los transcritos de todos los minigenes mutantes analizados (Figura 29B). Según este resultado, ninguna de las posiciones analizadas participa en la unión a SRp40. Sin embargo, la sobreexpresión

Resultados

de SC35 aumentaba significativamente la inclusión del exón 7 en los plásmidos mutantes c.910C>T, c.943C>T y c.1039C>T, pero no producía ningún efecto en el caso de los minigenes c.945G>A y c.946C>A (Figura 29C). Además, comprobamos que la cotransfección de las células con el minigen c.910C>T y cantidades crecientes del plásmido que expresaba SC35, producía un aumento lineal en la inclusión del exón 7. Sin embargo, no observamos ningún efecto sobre los transcritos derivados de los minigenes que portaban las mutaciones c.945G>A y c.946C>T (Figura 29D). Estos resultados indican que la unión de SC35 está mediada por los nucleótidos GC, en la posición c.945_946, que conforman un motivo ESE.

4.3.1.4 Análisis de la unión diferencial de las proteínas SR a secuencias silvestres y mutantes del exón 7

Para progresar en la investigación relativa a las proteínas que regulan el *splicing* del exón 7 mediada por unión a SREs, realizamos un conjunto de estudios *in vitro* de *pull-down* y Western Blot, utilizando una batería de anticuerpos anti diferentes proteínas SR: SRp20, SC35, SF2, SRp40, SRp50 y SRp75 y anti Tra2-β.

En primer lugar analizamos el motivo c.910_911. No detectamos diferencias entre la unión *in vitro* de la sonda silvestre S910C y las sondas mutantes S910T, S910A, S910G, con ninguna de dichas proteínas. También, analizamos la unión de proteínas silenciadoras del *splicing* utilizando anticuerpos anti hnRNPA1, hnRNPA2, hnRNPH, PTB-C y DAZAP-1. Tampoco obtuvimos ningún resultado que indicara la unión *in vitro* de alguna de dichas proteínas con alguna de las secuencias mutantes que se ensayaron.

En segundo lugar, analizamos la unión de la proteína SC35 al posible motivo ESE, en la posición c.945_946. Realizamos un experimento de *pull-down* y Western Blot con un anticuerpo anti-SC35, utilizando cuatro sondas de ARN: la sonda silvestre S943_946, y las tres sondas mutantes S943T, S945A y S946A. Sorprendentemente, no detectamos unión de la proteína SC35 a ninguna de las cuatro sondas analizadas. Se modificaron las condiciones del experimento, utilizando condiciones menos restrictivas para favorecer la unión entre las sondas y las proteínas. También utilizamos sondas de mayor longitud (45 pb) que las utilizadas inicialmente (20-28 pb). Sin embargo, no se detectó unión de la proteína SC35 en ningún caso.

4.3.1.5 Caracterización del elemento ESS en el exón 7 creado por la mutación c.1007G>A

Tal y como se ha mostrado en los resultados del apartado 4.3.1.2, postulamos que la mutación c.1007G>A podría crear un nuevo elemento ESS de unión a la proteína silenciadora del *splicing* hnRNPA1. Para confirmar esta hipótesis, realizamos análisis de *pull-down* y Western Blot con cuatro sondas de ARN: la sonda silvestre S1007G y tres sondas mutantes S1007A, S1007T y S1007C, utilizando un anticuerpo anti-hnRNPA1. Comprobamos que tan sólo la sonda mutante S1007A se unía a la proteína hnRNPA1 (Figura 30). Este resultado fue confirmado mediante un ensayo de retardo en la movilidad electroforética (EMSA), en el que se observó la formación de un complejo entre la sonda mutante S1007A y la proteína hnRNPA1. La formación de dicho complejo no se observó con las sondas restantes, incluida la sonda silvestre S1007G (Figura 31).

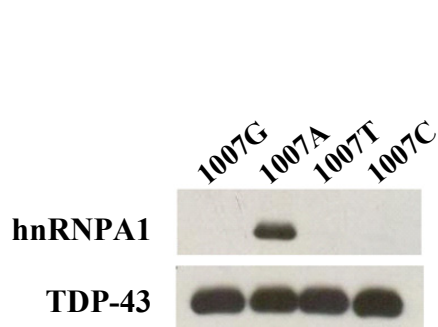


Figura 30: Western Blot utilizando un anticuerpo anti hnRNPA1. TDP-43 es el control de carga y el control positivo.

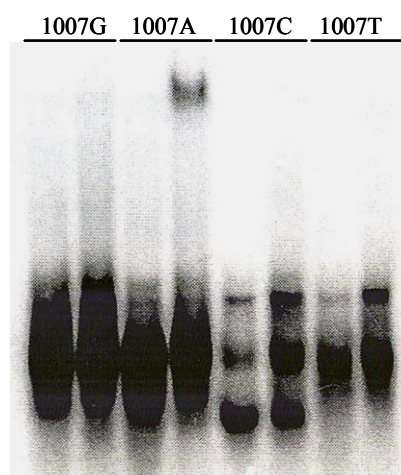


Figura 31: Ensayo de retardo en la movilidad electroforética (EMSA).

4.3.2 Estudio funcional de las mutaciones en el exón 37

Hasta la fecha se han descrito cinco mutaciones que producen el *skipping* del exón 37 (Tabla 19). Tres de ellas son recurrentes (c.6791dupA, c.6792C>G y c.6792C>A) y se ha comprobado que dichas posiciones conforman un elemento ESE (c.6791_6795) al que se une la proteína YB-1 (Baralle *et al.*, 2006; Skoko *et al.*, 2008).

En este trabajo hemos identificado dos nuevas mutaciones que también producen el *skipping* del exón: el cambio silencioso c.6801A>G y la mutación c.6799C>T identificada en *cis* junto a la mutación c.6792C>A, que denominaremos “doble mutación”, [c.6792C>A;c.6799C>T].

La fase de lectura de la secuencia codificante del exón 37, de 102 pb, está en fase en el gen *NF1*. Por ello, las mutaciones tipo V en dicho exón producirán una proteína de menor tamaño con 34 aminoácidos menos.

4.3.2.1 Efecto de la doble mutación c.[6792C>A;c.6799C>T] sobre el procesamiento del pre-ARNm

El estudio genético de una familia afectada de Neurofibromatosis tipo 1 mostró que la causa de la enfermedad era una doble mutación, con dos cambios *nonsense* en *cis*, c.[6792C>A;c.6799C>T] (Hernández-Imaz *et al.*, 2013). La presencia de la doble mutación se confirmó en 10 individuos afectados de tres generaciones (Figura 32).

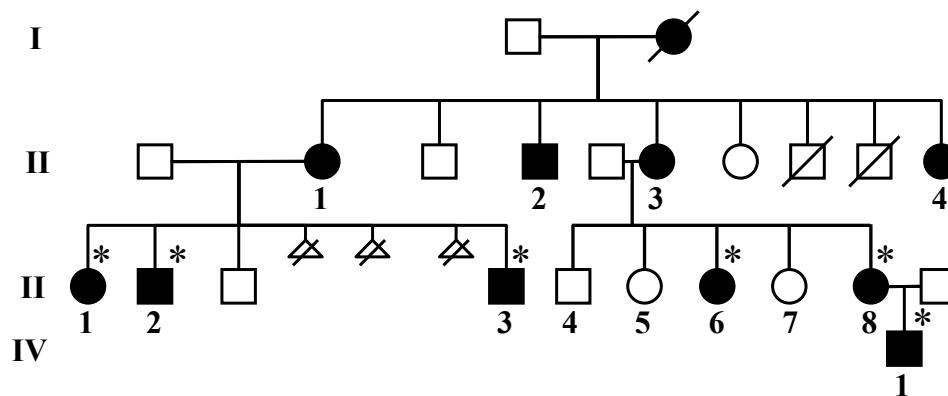


Figura 32: Pedigrí de la familia que porta la doble mutación. Los asteriscos (*) indican los individuos afectados que se estudiaron en el análisis semicuantitativo de ARN.

Partiendo de muestras de ARN extraído de cultivos cortos de linfocitos tratados con puromicina, realizamos un análisis semicuantitativo de los transcritos en seis pacientes portadores de la doble mutación, en tres pacientes con la mutación 6792C>G y en otros siete con la mutación c.6799C>A. En cada caso determinamos la proporción de transcritos con *skipping* del exón 37 (*NF1* Δ37) y encontramos diferencias significativas entre los tres grupos. Los pacientes con la mutación c.6792C>G

mostraron un valor promedio de transcritos con *skipping* del 22%, en los pacientes con la mutación 6792C>A dicha proporción aumentaba hasta el 35% y en los casos con la doble mutación se encontró un valor promedio del 42%, que era significativamente superior (Figura 33A).

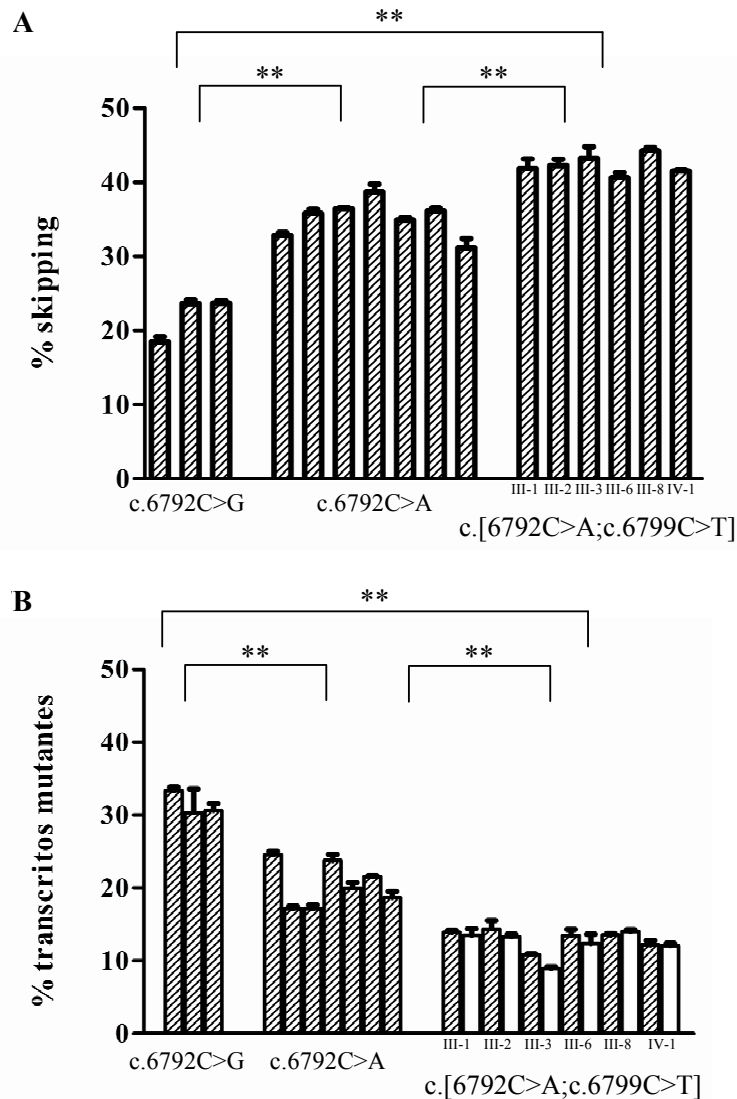


Figura 33: Estudio del efecto de la doble mutación. **A:** Análisis semicuantitativo de los transcritos con *skipping* del exón 37. En el eje de ordenadas (% *skipping*) se muestra la proporción de los transcritos calculada con la fórmula $(\Delta E37/FL + \Delta E37) \times 100$. **B:** Análisis semicuantitativo de transcritos *full-length* mediante SNaPSHOT. En el gráfico se muestra el porcentaje de transcritos mutantes frente al total según la fórmula $(mutFL/mutFL + wtFL) \times 100$. Las muestras de los 6 pacientes que portaban la doble mutación se testaron utilizando dos cebadores independientes, P6792 (barras ralladas) y P6799 (barras blancas). (**) indica que existen diferencias significativas entre los tres grupos ($p < 0,001$).

Confirmamos estos resultados realizando otro análisis semicuantitativo para determinar la proporción de transcritos *full-length* (FL) con mutación respecto al total de transcritos FL. También en este análisis encontramos diferencias significativas entre los tres grupos de pacientes (Figura 33B). Los pacientes con la mutación c.6792C>G, mostraron una proporción de transcritos FL mutados del 32%, en los pacientes con el cambio 6792C>A dicha proporción era del 20% y en los casos con la doble mutación la proporción era significativamente menor (13%). Estos análisis demuestran que las dos mutaciones tienen un efecto sumatorio sobre el *skipping* del exón 37.

4.3.2.2 Caracterización de un nuevo elemento ESE en el exón 37 e identificación de proteínas del espliceosoma implicadas

Las mutaciones identificadas en este trabajo fueron estudiadas en el minigen E31-38wt (cortesía del Prof. F.E. Baralle), cuyo patrón de procesamiento está descrito en el trabajo de Baralle *et al.*, 2006. Mediante mutagénesis dirigida se introdujeron los cambios en las posiciones c.6792 y en la región c.6798_6802 y cuantificamos la proporción de los transcritos FL, con *skipping* del exón 37 y con *skipping* conjunto de los exones 36 y 37 (Figura 34). Las mutaciones c.6792C>G, c.6792C>A, c.[6792C>A;c.6799C>T] y c.6801A>G alteraban el *splicing* de los transcritos derivados del minigen, produciendo, casi de forma exclusiva, transcritos con *skipping* del exón 37 o *skipping* de los exones 36 y 37. El mutante c.6799C>T por su parte, producía alrededor del 45% de transcritos *full-length*, y aunque su efecto era menos drástico sobre el *splicing* de los exones 36 y 37, su implicación en el procesamiento es clara. Por el contrario, los cambios en posición c.6798, c.6800 y c.6802 producían una inclusión superior al 97%.

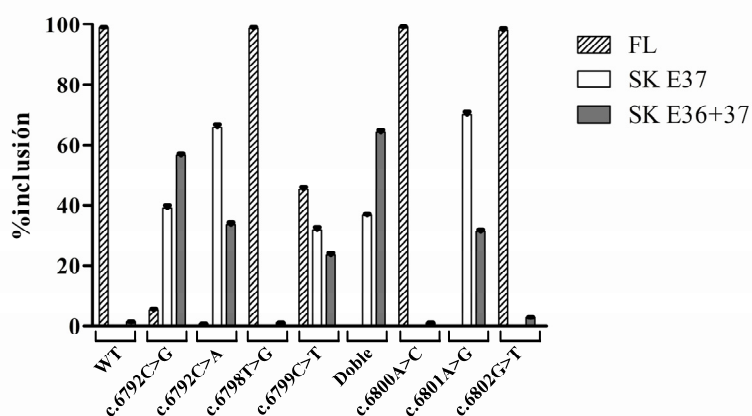


Figura 34: Cuantificación de los transcritos silvestres (FL), con *skipping* del exón 37 (SK E37) y con *skipping* de los exones 36 y 37 (SK E36+37) derivados de los diferentes minigenes mutantes.

Por tanto, estos datos sugieren que los cambios c.6799C>T y c.6801A>G afectan a otro elemento regulador del *splicing* muy próximo al ESE previamente descrito.

Para identificar la proteína SR que podría unirse a este nuevo elemento ESE, realizamos estudios de sobreexpresión utilizando el minigen E34-38 wt (cortesía del Prof. Baralle) (que produce una inclusión de los exones 36 y 37 del 75%) utilizando la misma batería de proteínas SR descritas anteriormente. Por otro lado, realizamos experimentos de *pull-down* y Western Blot siguiendo los mismos protocolos aplicados para el exón 7. Sin embargo, ninguna de las técnicas nos permitió identificar la proteína SR que se unía a esta región del exón 37 (resultados no mostrados).

Discusión

En este trabajo hemos abordado diferentes aspectos genéticos de la Neurofibromatosis tipo 1, desde la puesta a punto de un protocolo para el diagnóstico molecular de la misma, hasta el estudio de los mecanismos que median diferentes tipos de mutaciones en el gen *NF1*, cuyas bases, pueden ser extrapoladas a otras enfermedades genéticas.

1. Protocolo genético para el diagnóstico molecular de la NF1

El protocolo que hemos desarrollado en nuestro laboratorio, que utilizamos en la rutina diagnóstica, presenta una especificidad del 100% y una sensibilidad del 95% (Valero *et al.*, 2011).

El espectro mutacional identificado en nuestra cohorte de 327 pacientes, en general, concuerda con el estudio más amplio realizado en 1770 casos con NF1 (Messiaen and Wimmer, 2008) (Figura 35). Las únicas diferencias destacables son la proporción de mutaciones *missense*, que en nuestro estudio es inferior a la descrita en dicho trabajo (8,5% frente a un 15,9%), y el número de variaciones en el número de copias intragénicas que es superior (5,2% frente a un 2,2%). El aumento de la proporción de CNVs, podría ser debido a la sensibilidad de la técnica de MLPA que aplicamos, en primer lugar, en nuestro protocolo.

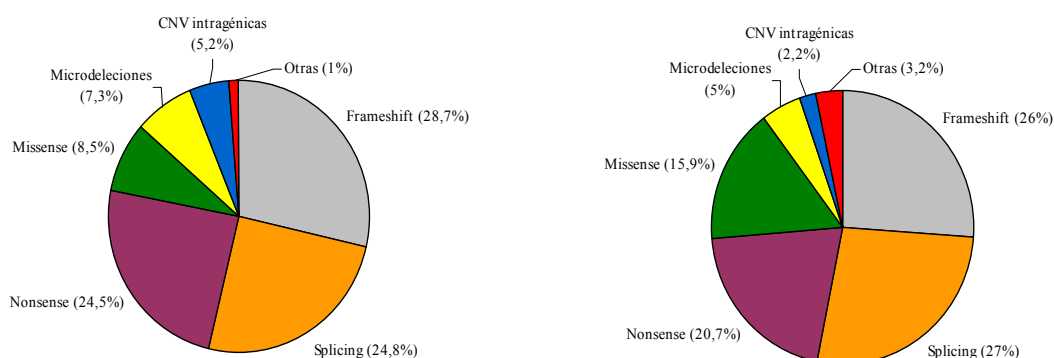


Figura 35: Diagrama mostrando el espectro mutacional en nuestra cohorte (izquierda) y en la de Messiaen y Wimmer, 2008 (derecha).

El MLPA nos ha permitido identificar la mutación en los pacientes que portan microdeleciones (~7%) o CNV intragénicas (~5%). Estos pacientes son excluidos del análisis mutacional, optimizándose el coste y el tiempo de estudio. Sin embargo, es

importante destacar que los resultados del MLPA, especialmente aquellos que indican alteraciones en la hibridación de una sola sonda, deben de ser confirmados por otra técnica. Cabe la posibilidad de que la disminución en los valores de RPA se deba a la aparición de una mutación puntual en la región del ADN_g que hibrida con la sonda. En estos casos, el estudio del ADN_c permite confirmar de los resultados del MLPA. Por otra parte, la existencia de una microdelección, identificada también por el análisis MLPA, generalmente se traduce en un suceso de LOH (pérdida de heterocigosidad) de uno o varios marcadores microsatélite de *locus NFI* que se evidencia en los estudios de segregación.

En los casos familiares, dichos estudios de segregación permiten identificar el haplotipo “de riesgo” en los miembros de la familia, permitiendo un diagnóstico precoz de la enfermedad, rápido y sencillo. En los casos esporádicos, en ocasiones, cuando el paciente que presenta la mutación *de novo* tiene descendencia, los estudios de segregación han mostrado la existencia de mosaicismo. Este ha sido el caso de los pacientes NF109 y NF639.

También es importante incidir en el interés de los protocolos basados en el estudio del ADN_c, porque dichos protocolos informan directamente sobre la naturaleza de las mutaciones de *splicing* (~ 25%).

Por otra parte, la técnica de DHPLC ha mostrado ser muy sensible en la detección de mutaciones en nuestro estudio, incluso en casos en los que existe un mosaicismo de bajo grado (~10%) (datos no mostrados). Esto subraya la importancia de optimizar las condiciones en las que se analiza cada uno de los amplicones, para asegurar la detección de todos los posibles cambios presentes en la secuencia.

Como todo protocolo, éste también presenta alguna debilidad. A pesar de que los amplicones que se analizan por DHPLC se han diseñado en fragmentos solapantes, es posible que existan regiones donde la existencia de cambios puntuales no sea detectada en el análisis por DHPLC, debido a su proximidad a los cebadores. Para solucionar este problema, diseñamos amplicones más largos que se analizaron por PCR de largo recorrido. Este análisis nos permitió identificar cinco mutaciones patogénicas de la muestra total de 327 casos.

A pesar de la utilidad e idoneidad de nuestro protocolo para la búsqueda de mutaciones en el gen *NFI*, las nuevas tecnologías están destinadas a sustituir a las técnicas actuales. Para la identificación de microdelecciones y CNVs intragénicas, si bien el MLPA es una técnica robusta, el *array-CGH* permite caracterizar con mayor

precisión el posicionamiento de los puntos de rotura. Para la identificación de cambios puntuales, el *screening* por DHPLC es muy sensible pero el estudio es laborioso y requiere mucho tiempo. La secuenciación del ADNc mediante las nuevas tecnologías de NGS (*Next Generation Sequencing*) ofrece una clara ventaja por su rapidez. Además, se podrán analizar las secuencias del promotor y el 3'UTR del gen, que normalmente no son analizadas en los protocolos actuales. Nuestro objetivo a corto plazo es desarrollar esta tecnología para su aplicación en el diagnóstico de rutina en la NF1.

2. Estudio de las microdeleciones

2.1 Caracterización de las microdeleciones

Las microdeleciones del *locus NF1* afectan al 5-10% de los pacientes con NF1 (Messiaen and Wimmer, 2008). En nuestra cohorte hemos identificado 24 casos que suponen el 7,3% de las mutaciones identificadas en este estudio. El 75% de las microdeleciones se corresponden con deleciones tipo 1 mientras que el 25% restante se divide entre deleciones tipo 2 y atípicas. Sin embargo, no hemos identificado ninguna deleción tipo 3, posiblemente porque son poco prevalentes (1,4-4%) (Vogt *et al.*, 2012).

El análisis de MLPA utilizado para distinguir entre los diferentes tipos de microdeleciones presenta limitaciones. En el caso de las deleciones tipo 1, en las que hemos centrado este trabajo, el MLPA permite distinguir si *SUZ12* y su pseudogén están deletados o no. Sin embargo, teniendo en cuenta la posición de las sondas de la salsa P122, existe una región de “incertidumbre” de más de 250 Kb, en ambos extremos. Por tanto, es posible, que algunas deleciones clasificadas como tipo 1, sean en realidad deleciones atípicas. Este problema se puede solventar realizando un *array-CGH* que cubre toda la zona de microdeleción. Hemos realizado dicho análisis en 5 casos y en todos ellos encontramos que los puntos de rotura se sitúan dentro de las secuencias parálogas NF1-REPa y NF1-REPC.

2.2 Identificación de un haplotipo “no recombinogénico” en la región de la microdeleción NF1

En este trabajo hemos llevado a cabo un análisis de 35 SNPs situados en 13 de los 14 genes comprendidos en la región NF1-REPa - NF1-REPC. Este análisis indicó

que existen diferencias significativas entre los haplotipos de los cromosomas controles y los cromosomas “no deletados” de los pacientes con delección tipo 1. Este haplotipo está constituido por 5 SNPs localizados en los tres genes más teloméricos, *C17orf79*, *UTP6* y *SUZ12*, de la región de la microdelección. El SNP más distal se encuentra a 27 Kb del inicio de NF1-REPC. Estos datos indican que dicho haplotipo se ha mantenido con una frecuencia mayor a la esperada durante la evolución, asociado a un alelo que hemos denominado “no recombinogénico”.

Es sabido que existen SNPs localizados en los puntos calientes de recombinación que afectan directamente a su actividad recombinogénica (Jeffreys and Neumann 2002 y 2005; Zheng *et al.*, 2010). Por otra parte, analizando la variación genética de las secuencias NF1-REP a lo largo de la evolución, se ha concluido que el mecanismo NAHGC (*non-allelic homologous gene conversion*) opera bidireccionalmente entre NF1-REPa y NF1-REPC. Dichas LCRs comparten más SNPs de lo esperado en el supuesto de que no existiera conversión génica entre ambas (De Raedt *et al.*, 2006). La conversión génica entre NF1-REPa y REPC tiende a aumentar la identidad entre ambas, produce una homogenización de dichas secuencias parálogas, lo que favorece la recombinación. Utilizando la misma línea de argumentación, hipotetizamos que el haplotipo que hemos identificado en los 3 genes más teloméricos de la región de la microdelección tipo 1, podrían estar en desequilibrio de ligamiento con SNPs de NF1-REPC que le confieren menor actividad recombinogénica o con secuencias que disminuyen su homología con NF1-REPa, disminuyendo su tasa de recombinación.

Para demostrar esta hipótesis, sería necesario caracterizar a nivel de secuencia dichos alelos NF1-REPC. Sin embargo, esta tarea no es fácil, precisamente por la gran homología de secuencia entre NF1-REPa y REPC.

3. Caracterización de CNV intragénicas

El uso de técnicas convencionales como el MLPA y la aplicación de otras tecnologías como los *array-CGH*, han permitido la identificación de múltiples CNVs asociadas a diversas enfermedades (Gu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Sasaki *et al.*, 2010; Stankiewicz and Lupsky, 2010).

En este trabajo hemos identificado 18 CNVs que contribuyen significativamente a ampliar el espectro de deleciones y duplicaciones descritas anteriormente en el gen

NFI. Cabe destacar que las deleciones en este gen son mucho más frecuentes que las duplicaciones, ya que hemos identificado 17 deleciones y una única duplicación. Esta relación se asemeja a los datos recogidos en HGMD, donde se han descrito 60 deleciones y tan sólo 4 duplicaciones. La relación obtenida del conjunto de datos, cercana a 15:1, es mucho mayor que la descrita previamente en otros genes autosómicos (~3:1) (Quemener *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010). Los autores postulan que esta relación se explica por una mayor implicación de la recombinación intracromátida frente a la recombinación intercromátida o intercromosoma en la formación de las CNVs. La primera sólo da lugar a deleciones mientras que las otras dos generan deleciones y duplicaciones. De manera similar, esto supondría que la recombinación intracromátida en *NFI* es mucho más frecuente que la encontrada en otros genes.

En este trabajo hemos caracterizado, a nivel de secuencia de ADN, los puntos de rotura de 8 deleciones de un único exón, de una deleción multiexónica y de una duplicación del exón 39. Este trabajo constituye el estudio más amplio, realizado hasta la fecha, en la caracterización de los puntos de rotura que median las CNV intragénicas en el gen *NFI*. Además, estamos realizando análisis de *array-CGH* para caracterizar las 8 deleciones restantes.

Hemos realizado un amplio análisis bioinformático de los puntos de rotura (datos presentados en la Tabla 20), en las 10 CNV caracterizadas a nivel de secuencia, para determinar los mecanismos que participan en la aparición de las CNVs.

3.1 Potenciales mecanismos moleculares que median las CNV intragénicas

En los últimos años, se han postulado varios mecanismos de reparación no replicativos (NHEJ –*non-homologous end joining*-, MMEJ –*microhomology-mediated end joining*- y NAHR entre elementos repetitivos) y replicativos (SRS –*serial replication slippage*-, FoSTeS –*fork stalling and template switching*- y MMBIR –*microhomology-mediated brake induced replication*-) para explicar la aparición de CNVs no recurrentes.

Tabla 20: Resumen del análisis bioinformático llevado a cabo en las 10 CNVs identificadas y mecanismo molecular propuesto para explicar su formación (última columna).

Paciente	Del / Dup	Micro-homología	Punto de rotura proximal			Punto de rotura distal			% homología	Mecanismo molecular propuesto
			Elementos repetitivos	Conformación no-B	Nº motivos secuencia	Elementos repetitivos	Conformación no-B	Nº motivos secuencia		
NF400	E1	25	AluSx	1 PR	2 PR / 3'	AluSx	1 PR	1 PR	71%	NHAR / MMEJ / Replicativo
NF765	E1	9	AluJr	-	1 5'	AluJr	-	-	71%	MMEJ / Replicativo
NF013	E2	38	AluSx	2 PR	1 PR	AluY	2 PR	1 PR	81%	NHAR / MMEJ / Replicativo
NF234	E23.1	-	-	1 PR	-	L1M1	3 2PR/1FL	1 3'	-	NHEJ / SRS trans
NF544	E25	-	-	1 PR	-	-	1 PR	-	-	NHEJ
NF620	E28	16	AluSz6	1 PR	1 5'	AluSx1	1 PR	1 5'	78%	MMEJ / Replicativo
NF350	E41	3	-	1 FL	-	DNA hAT-Charlie	1 PR	1 PR	-	NHEJ / Replicativo
NF350	E42	2	DNA hAT-Charlie	2 FL/PR	-	AluJb	2 PR	2 3'	0%	NHEJ / Replicativo
NF689	E32_42	1	-	1 PR	1 PR	-	1 PR	1 5'	-	NHEJ / Replicativo
NF109	E39	-	-	2 PR	4 3PR / 3'	AluJb	1 PR	2 5'	-	NHEJ

Conformación no-B: elementos repetidos capaces de adoptar estructuras no-B del ADN; *Nº motivos secuencia:* motivos de secuencia recombinogénicos; *Del:* delección; *Dup:* duplicación; *% homología:* porcentaje de homología entre elementos repetitivos presentes en el punto de rotura proximal y distal; *PR:* elementos hallados en el punto de rotura; *FL:* elementos hallados flanqueando el punto de rotura.

En cuatro de las deleciones encontramos que los puntos de rotura proximal y distal se localizan en elementos Alu (**NF400** –del E1-, **NF765** –del E1-, **NF013** –del E2- y **NF620** –del E28-) con una homología que varía desde el 71 hasta el 81% (Tabla 20). Para que ocurra el proceso de NAHR se requieren segmentos de ADN de unas 200-300 pb con una homología >95%, conocidos como MEPS –*minimal efficient processing segments*-. Sin embargo se ha propuesto que dicho mecanismo también puede ocurrir entre regiones que presentan una homología >95% en segmentos de ADN más cortos (<50 pb) (Lam and Jeffreys, 2006). En los casos **NF400** y **NF013**, la homología es del 97 y del 98% en una región de 34 pb y 43pb, respectivamente, en la cual se localizan los puntos de rotura. Por lo tanto, el mecanismo de NAHR entre elementos Alu podría explicar la aparición de ambas deleciones. Por otra parte, las cuatro deleciones presentan microhomologías de 9-38 pb. La existencia de dichas microhomologías, indica que el mecanismo de MMEJ o cualquiera de los modelos replicativos deberían ser considerados. A diferencia de los mecanismos de reparación replicativos, MMEJ es un mecanismo propenso a producir “errores” que comporta la inserción o deleción de unas pocas pares de bases en el punto de unión. Además, se ha sugerido que los elementos repetitivos constituyen secuencias difíciles de replicar, con mayor probabilidad de parada de la horquilla de replicación (Vissers *et al.*, 2009). Por lo tanto, la ausencia de errores en el punto de unión y la presencia de elementos repetitivos, apoyan la implicación de los modelos de reparación replicativos, frente al MMEJ, para explicar la formación de estas cuatro deleciones.

En las deleciones que portan los pacientes **NF689** (del E32-42) y **NF350** (del E41 y E42) hemos identificado pequeñas microhomologías de 1-3 pb. Teniendo en cuenta el tamaño de las microhomologías (menores de 5 pb), estas deleciones podrían haberse producido por NHEJ, o por uno de los mecanismos replicativos. La ausencia de “errores” en los puntos de unión apoyan la implicación de estos últimos, ya que en la reparación mediada por NHEJ participa una polimerasa que es propensa a introducir errores durante la síntesis de ADN (Rattray and Strathern, 2003; Pavlov *et al.*, 2006).

En los casos **NF544** (del E25) y **NF109** (dup E39) existe una transición perfecta entre los puntos de rotura, es decir, no existe microhomología entre el punto de rotura proximal y distal. Por tanto, para explicar ambos sucesos deberíamos considerar el mecanismo de NHEJ.

Por último, la deleción identificada en el paciente **NF234** (del E23.1) representa la única deleción compleja caracterizada en nuestra cohorte. La ausencia de

3.2 La arquitectura genómica favorece la formación de CNVs

La implicación de la arquitectura genómica en la formación de CNVs no recurrentes es aún poco conocida. Los elementos repetitivos, las secuencias repetidas que pueden adquirir conformaciones no-B del ADN y los motivos de secuencia recombinogénicos identificados sobre los puntos de rotura o cerca de ellos, podrían generar inestabilidad genómica que favorece las roturas en el ADN o promover la aparición de estructuras que colapsan la horquilla de replicación.

La deleción multiexónica que presenta el paciente **NF689** no parece estar mediada por elementos Alu, sin embargo, es posible que la presencia de los mismos cerca de los puntos de rotura favorezca el apareamiento entre las regiones proximal y distal. Tal y como se muestra en la Figura 37, el punto de rotura proximal se sitúa por delante de un elemento AluSz6 y el distal se localiza inmediatamente después de un AluJb. Ambos elementos presentan una homología del 79% y podrían promover el acercamiento de ambos extremos. Además, la presencia de una repetición directa de 8 bp en el extremo 5' y de un palíndromo de 45 pb en el extremo 3' podrían favorecer la rotura del ADN. La unión de ambos extremos para dar lugar a la deleción multiexónica podría producirse por un mecanismo de NHEJ favorecido por la presencia de 1 pb de microhomología.

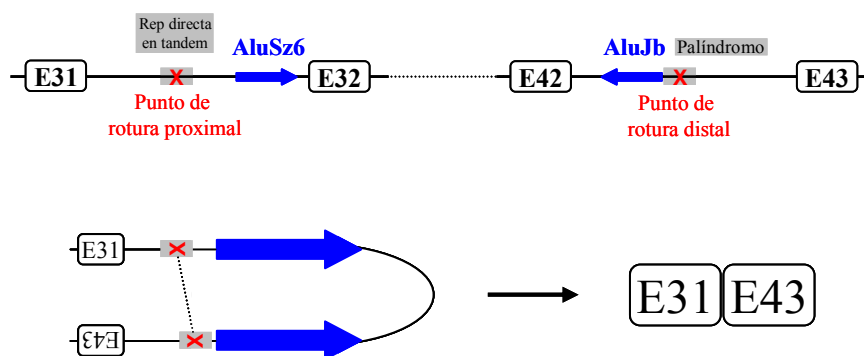


Figura 37: Modelo propuesto para la formación de la deleción identificada en el paciente NF689.

Por otro lado, es sabido que diferentes tipos de repeticiones de secuencia que pueden adoptar conformaciones no-B del ADN, y así favorecer la aparición de roturas (Bacolla *et al.*, 2009; Wells *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010). Hemos identificado este tipo de elementos en el 90% (18/20) de las secuencias analizadas. Es cierto que algunas de estas repeticiones son pequeñas (6 pb como mínimo) y que este tipo de estructuras se

reparten por todo el genoma. Sin embargo, la mayoría de las repeticiones que hemos identificado se localizan en el punto de rotura o a una distancia máxima de 15 pb. Este hallazgo indica que, también en el gen *NFI*, la presencia de secuencias capaces producir cambios conformacionales del ADN, en las inmediaciones de los puntos de rotura, favorecen la formación de roturas.

Además, hemos identificado varios motivos recombinogénicos en el 70% (14/20) de las regiones (30 bp) que flanquean los puntos de rotura. El motivo de secuencia más frecuente es el denominado χ -like (5'-GCTGG-3') que es una secuencia parcial del elemento χ de *E. coli* (5'-GCTGGTGG-3'), un mediador de la recombinación en procariotas. El motivo χ -like se ha identificado en varias deleciones mediadas por Alu, siempre embebido en estas secuencias (Rüdiger *et al.*, 1995; Harada *et al.*, 2000, Laccone *et al.*, 2004). De la misma manera, los seis motivos χ -like que hemos encontrado también están incluidos en elementos Alu (casos **NF400**, **NF765**, **NF013**, **NF350** –deleción del exón 42- y **NF109**). Por último, indicar que en el caso **NF013**, el motivo χ -like forma parte de un segmento de secuencia más largo, un núcleo de 26 bp, que ha sido identificado en diferentes secuencias Alu que median la formación de otras CNVs (Rüdiger *et al.*, 1995). Se ha postulado que este núcleo de 26 pb podría ser altamente recombinogénico. Esta particularidad en la secuencia del caso NF013, podría explicar el hallazgo de dos casos independientes con la misma deleción del exón 2, uno en nuestra cohorte y el segundo en una cohorte de 1100 pacientes (Wimmer *et al.*, 2006).

En resumen, hemos analizado las secuencias flanqueantes de los 20 puntos de rotura para comprobar la implicación de la arquitectura genómica en la formación de roturas de la cadena de ADN. En todos los casos, hemos identificado algún elemento de secuencia que favorece las roturas de la molécula a ADN. Aunque este tipo de elementos se localizan a lo largo de todo el genoma, el enriquecimiento de los mismos en las inmediaciones de los puntos de rotura analizados enfatiza la implicación de la arquitectura genómica en la formación de CNVs no recurrentes.

4. Estudio funcional de las mutaciones de *splicing* que afectan a SREs

El *splicing* del pre-ARNm es un proceso altamente regulado por cientos de proteínas y ARNs, lo que asegura el correcto reconocimiento de los exones y la escisión de los intrones, para dar lugar a moléculas de ARN maduras y funcionales. Más del 90% de los genes sufren procesos de *splicing* alternativo (Pan *et al.*, 2008; Wang *et al.*,

2008), que permiten la expresión de múltiples isoformas de ARNm a partir de un único gen y que, por tanto, aumentan la complejidad del proteoma.

Aunque se calcula que aproximadamente un tercio de las mutaciones patogénicas afectan al correcto procesamiento de los mensajeros (Lim *et al.*, 2011), se ha llegado a estimar que esta proporción podría superar el 60% (López-Bigas *et al.*, 2005) y en algunos casos, como la disautonomía familiar, dan cuenta de prácticamente el 100% de los cambios patogénicos que causan enfermedad (Anderson *et al.*, 2001; Slaugenhaupt *et al.*, 2001). Esta elevada proporción de mutaciones de *splicing*, pone de manifiesto la necesidad de caracterizar las variantes a nivel de ADNc. En los últimos años, se han desarrollado diversas herramientas informáticas diseñadas para predecir el efecto deletéreo que una mutación puede tener sobre el *splicing*. Aquellos cambios que se producen en los nucleótidos GT del sitio 5' donador o AG del sitio 3' aceptor, no requieren de un estudio informático para probar su implicación en el *splicing*, sin embargo, es importante conocer su efecto sobre el ARNm. En el caso de las mutaciones que se producen en la secuencia codificante de los exones o en secuencias “profundas” de los intrones, el uso de estas herramientas es completamente necesario para determinar su posible efecto en el *splicing*.

Para valorar la idoneidad de las herramientas informáticas más utilizadas para este fin, hemos tomando como ejemplo las 59 mutaciones de *splicing* que hemos caracterizado a nivel de ADNg y ADNc. Según hemos indicado en el apartado de resultados, los programas MaxEntScan y SSPNN predicen con acierto la pérdida de los sitios consenso de *splicing*. Del mismo modo, en el caso de las mutaciones que generan nuevos sitios de *splicing* en el sitio donde se produce la mutación, los programas predicen con acierto la funcionalidad de los nuevos sitios 5' donadores o 3' aceptores. Sin embargo, estas herramientas no son útiles para conocer el efecto de dichas mutaciones en el ARN maduro, principalmente porque no predicen con acierto la funcionalidad de los sitios críticos. Los programas *in silico* sólo valoran el grado de homología que existe entre las secuencias analizadas y las secuencias consenso de *splicing*, pero no tienen en cuenta la colaboración de otros factores o el contexto genómico de las mismas, lo que puede dar lugar a una errónea interpretación del efecto de este tipo de mutaciones.

El escenario empeora al analizar mutaciones que ocurren en la secuencia codificante y que, en principio se postula, inactivan elementos ESE produciendo el *skipping* del exón. En general, en nuestros análisis, los programas ESEfinder y

RESCUE-ESE han mostrado resultados contradictorios. De hecho, únicamente en el caso de la mutación c.6799C>T encontramos que ambos programas predicen la pérdida de un elemento ESE. El programa ESEfinder utiliza la tecnología SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) para identificar motivos ESE, (Tian and Kole, 1995; Coulter *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998; Schaal *et al.*, 1999). Mediante este análisis se obtienen varias secuencias cortas (6-8 pb) y degeneradas, muchas de ellas parcial o totalmente solapantes. Hemos analizado los 5 exones con mutaciones tipo V, caracterizadas en nuestra cohorte, y hemos comprobado que ESEfinder identifica un elemento ESE aproximadamente cada 7 pb (valor medio). Esto significa que la presencia de posibles motivos ESE de unión a proteínas SR, no es suficiente para establecer su funcionalidad. Por otro lado, el programa RESCUE-ESE predice la presencia de hexámeros que podrían funcionar como elementos ESE. La selección de dichos hexámeros se basa en que su presencia es mayor en secuencias exónicas que en intrónicas, y específicamente en exones con sitios de *splicing* débiles. Este programa predice con frecuencia la eliminación de un hexámero y la creación de otro nuevo, por efecto de un único cambio, siendo difícil discernir cuál es el efecto real. Es muy posible que la especificidad de unión de una proteína SR y su funcionalidad, estén condicionadas por factores adicionales a la secuencia del sitio de unión *per se*. En conclusión, actualmente es muy difícil predecir la pérdida de un ESE basándonos únicamente en los estudios *in silico* por lo que es necesario el uso de técnicas complementarias, como por ejemplo el estudio en minigenes, para probar la implicación de una variante en el proceso de *splicing*.

En general, los estudios sobre los mecanismos de *splicing* en genes concretos, como es el caso de este trabajo, mejorarán el conocimiento de los factores que determinan el reconocimiento de los exones, información que podrá ser aplicada en la mejora de estas herramientas informáticas.

En este trabajo hemos realizado un amplio análisis funcional de mutaciones exónicas que producen el *skipping* del exón, con el objetivo de dilucidar los mecanismos que producen dichas alteraciones. El estudio se ha centrado en la búsqueda de elementos SRE en los exones 7 y 37, en los que se han encontrado un número importante de mutaciones tipo V.

En el exón 7, analizamos cinco cambios patogénicos distribuidos a lo largo del todo el exón: c.910C>T, c.943C>T; c.[945G>A;946C>A], c.1007G>A y c.1039C>T.

En tres trabajos previos (Colapietro *et al.*, 2003; Zatkova *et al.*, 2004; Pros *et al.*, 2006), se analizó la proporción de transcritos con *skipping* del exón 7, en muestras de pacientes con estas cinco mutaciones. Observaron que cada una de ellas causaban el *skipping* del exón en una pequeña proporción de los transcritos, salvo en el caso de la mutación c.[945G>A;946C>A] que generaba exclusivamente transcritos con *skipping* del exón 7 (Colapietro *et al.*, 2003). Los estudios en minigenes (Zatkova *et al.*, 2004; Bottillo *et al.*, 2007), demostraron que los cambios c.910C>T, c.943C>T, c.945G>A, c.946C>A y c.1007G>A producían una alteración en el patrón de procesamiento del exón 7. Con objeto de precisar si estas regiones formaban parte de elementos ESE, Zatkova y colaboradores (2004) analizaron el efecto sobre el *splicing* de pequeñas secuencias (13-15 pb) del exón 7 en un sistema de *splicing* heterólogo. Específicamente valoraron el efecto de las secuencias en la inclusión del exón 2 del gen de la globina, en el minigen pSXN. Encontraron que la secuencia de la región c.908_922 promovía la inclusión del exón 2 y que, por el contrario, las secuencias de las regiones c.939_952 y c.1000_1012 mostraban un efecto débil sobre la inclusión. Los autores postularon que ambas podrían formar parte de un elemento CERES, donde existe un solapamiento entre ESE y ESS, o que ambas mutaciones podrían generar elementos silenciadores.

En este trabajo hemos querido profundizar en el conocimiento de los elementos SRE presentes en el exón 7. Para ello, mediante mutagénesis dirigida, hemos generado un total de 40 mutaciones en diferentes posiciones de interés. Además, por primera vez, hemos tratado de identificar las proteínas SR y/o hnRNP que participan en la regulación del *splicing* mediada por elementos SRE. Los resultados obtenidos en los ensayos con el minigen E7-pSPL3, tras analizar 11 mutaciones en la región c.908_912, apoyan la hipótesis de que el *skipping* es consecuencia de la pérdida de un elemento ESE. En la región c.943_946, donde generamos 12 mutaciones diferentes, observamos que la mayoría producían una disminución significativa de la inclusión. Por el contrario, todos los cambios en posición c.944 y el cambio c.945G>C producían un aumento significativo. Por tanto, es posible que, tal y como se había postulado anteriormente (Zatkova *et al.*, 2004), la región c.943_946 forme parte de un elemento CERES. Según dicho modelo algunas mutaciones ocasionan la eliminación de un ESE y, por tanto, el *skipping* del exón, mientras que otras eliminan un elemento ESS produciendo un incremento significativo de la inclusión.

Los análisis de sobreexpresión de varias proteínas SR, descritos en este trabajo, mostraron que, al menos en tres casos, se alteraba significativamente el *splicing* del

exón 7. Por un lado, la proteína SRp75 mostró un fuerte efecto represor sobre la inclusión. Es sabido que las proteínas SR también pueden funcionar como represoras del *splicing* de un exón. Por ejemplo, SRp75 está involucrada en el silenciamiento del exón 10 del gen *tau* al unirse a un elemento ISS en el intrón proximal (Wang *et al.*, 2011). Del mismo modo, en el contexto del exón 7 del gen *NF1*, SRp75 podría unirse a algún elemento ISS en los intrones flanqueantes e inhibir su reconocimiento. Por otro lado, los experimentos mostraron que las proteínas SRp40 y SC35 favorecían de forma significativa la inclusión del exón 7 (86% y 95%, respectivamente). Quisimos evaluar el efecto de la sobreexpresión de estas dos proteínas sobre los transcritos producidos por diferentes minigenes mutantes. Todos los transcritos presentaban una inclusión significativamente mayor del exón 7 al sobreexpresar SRp40, aumento que también observamos al sobreexpresar SC35 en los minigenes que portaban los cambios c.910C>T, c.943C>T y c.1039C>T. Por el contrario, este efecto quedaba abolido en los minigenes mutantes c.945G>A y c.946C>A. Estos datos indican que la secuencia GC (c.945_946) forma parte de un elemento ESE al que se une la proteína SC35, y que mutaciones en dichas posiciones impiden dicha unión, favoreciendo el *skipping* del exón. Sin embargo, no conseguimos demostrar esta unión mediante los ensayos posteriores de *pull-down* y Western Blot. En base a estos resultados postulamos que otra proteína SR diferente se uniría directamente al pre-ARNm y que la unión de SC35 a dicha proteína favorecería el reconocimiento del exón (Figura 38).

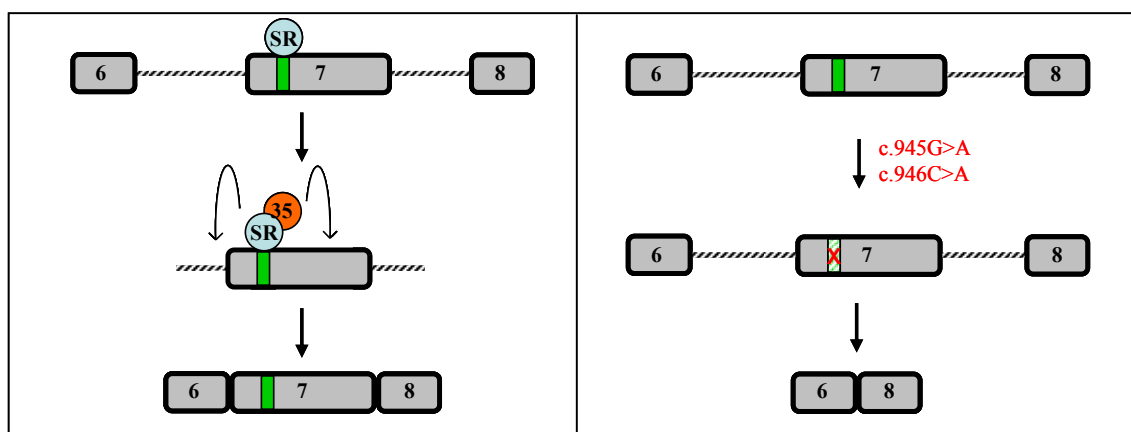


Figura 38: En el panel de la izquierda se muestra el modelo de acción de SC35 sobre el reconocimiento del exón 7. El panel de la derecha muestra el efecto de las mutaciones c.945G>A y c.946C>A sobre el ESE presente en esa región.

Siguiendo con el ejemplo de exón 10 del gen *tau*, se ha observado que hnRNPG se une directamente a SRp75, y que esta unión es necesaria para activar el efecto silenciador del elemento ISS localizado en el intrón proximal (Wang *et al.*, 2004; Heinrich *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011).

Respecto a la región c.1007, como hemos comentado anteriormente, Zatkova y colaboradores (2004), observaron que una secuencia de 13 pb de la región c.1000_1012 no producía una activación significativa del *splicing* del exón analizado. Los autores postularon la creación de un elemento ESS por efecto de la mutación c.1007G>A, aunque también sugerían que podría existir un CERES. Además, en otro trabajo se observó que el cambio silencioso c.1005T>C producía niveles elevados de inclusión del exón 7 en un análisis con minigenes (Botillo *et al.*, 2007). En nuestros ensayos también observamos que algunas de las mutaciones testadas en las tres posiciones c.1005, c.1006 y c.1007, producen un aumento en la inclusión del exón. Por tanto, no podemos descartar la presencia de un CERES en esta región. Sin embargo, el hecho de que la mutación patológica c.1007G>A y el cambio c.1006T>A disminuyan significativamente la inclusión del exón, y que los datos de secuencia indiquen la creación de motivos de unión para hnRNPA1, apoyan la hipótesis de la aparición de un ESS. De hecho, hemos comprobado en dos experimentos independientes (mediante *pull-down* y Western Blot y un ensayo de EMSA) la unión directa entre moléculas de ARN con la mutación c.1007G>A y la proteína hnRNPA1. Dicha unión no ocurre con la secuencia silvestre, ni con las secuencias mutantes G>T y G>C. En conclusión, postulamos que la mutación c.1007G>A crea un elemento ESS que, al reclutar hnRNPA1, inhibe el reconocimiento del exón (Figura 39).

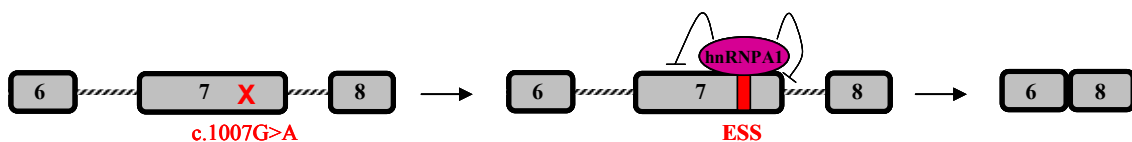


Figura 39: Efecto de la mutación c.1007G>A sobre el *splicing* del exón 7.

En este trabajo también hemos investigado los posibles elementos reguladores del *splicing* en el exón 37. Previamente, se identificó un elemento ESE en la región c.6791_6795, que era eliminado por efecto de la mutación recurrente c.6792C>G (Baralle *et al.*, 2006; Skoko *et al.*, 2008). Los autores demostraron que dicho elemento,

mediante la unión a la proteína YB-1, favorecía el reconocimiento del exón. La mutación producía simultáneamente la inactivación de dicho ESE y la creación de un silenciador al que se unían las proteínas represoras hnRNPA1, hnRNPA2 y DAZAP. En este trabajo, hemos identificado dos nuevas mutaciones cercanas a la región c.6791_6795 que también producen el *skipping* del exón: la doble mutación heredada en *cis* c.[6792C>A;c.6799C>T] y el cambio silencioso c.6801A>G.

Nuestros resultados han demostrado que la doble mutación c.[6792C>A;c.6799C>T] tienen un efecto sumatorio sobre el *skipping* del exón 37. Poco después de publicar este trabajo, se identificó la mutación c.6799C>T en un paciente con NF1 (Dra. Berta Campos, comunicación personal). Los mismos ensayos de cuantificación mostraron que el mutante c.6799C>T también presentaba *skipping* del exón 7, en el 10% de los transcritos (datos no mostrados). Por otra parte, cuantificamos el efecto la mutación c.6801A>G, también en ensayos *in vivo* y detectamos una proporción de transcritos con *skipping* del exón cercana al 50%.

Los análisis funcionales de ambas mutaciones apoyan la hipótesis de que los cambios en c.6799 y c.6801 pueden alterar un elemento regulador, contiguo al motivo ESE en la región c.6791_6795. Realizamos experimentos en minigenes que demostraron que tanto la mutación c.6799C>T, de forma aislada, como el cambio silencioso c.6801A>G producían el *skipping* del exón 37 y de los exones 36 y 37 en conjunto. Sin embargo, ni los ensayos de sobreexpresión, ni los análisis de unión ARN-proteína nos permitieron identificar la proteína que podría unir este supuesto elemento ESE.

Los estudios realizados en este trabajo muestran la dificultad que entrañan los ensayos para demostrar la unión de una proteína a su respectivo elemento regulador. Hemos analizado la unión de las proteínas SR y hnRNP más frecuentes, pero el espliceosoma se compone de más de 150 proteínas. Es posible que alguna de estas proteínas sea la responsable de reconocer los elementos SREs que hemos identificado en los exones 7 y 37.

Conclusiones

1. Hemos desarrollado un protocolo para el análisis genético-molecular del gen *NF1* que se ha implementado para el diagnóstico de rutina de esta enfermedad. Este protocolo presenta una especificidad del 100% y una sensibilidad del 95%. El análisis del ADNg y del ADNc de *NF1*, mediante la combinación de varias técnicas, permite la identificación de todos los tipos de mutaciones.
2. Hemos identificado un haplotipo mayoritario en los individuos que portan deleciones tipo 1. Este haplotipo está constituido por 5 SNPs localizados en los genes *C17orf79*, *UTP6* y *SUZ12*, próximos a NF1-REPC. Hemos comprobado que dicho haplotipo está asociado a la característica “no recombinogénica” del alelo no deletado. Estos datos sugieren que existe un desequilibrio de ligamiento entre este haplotipo y motivos de secuencia en NF1-REPC que disminuyen su frecuencia de recombinación con NF1-REPa.
3. Hemos identificado 18 CNVs intragénicas y caracterizado a nivel de secuencia de ADNg los puntos de rotura de 10 casos. Hemos observado que la proporción entre deleciones y duplicaciones intragénicas es cercana a 15:1, mucho mayor de la descrita para otros genes autosómicos (~3:1). Este resultado sugiere que la recombinación intracromátida es un mecanismo mayoritario en la génesis de las CNVs intragénicas.
4. El análisis bioinformático realizado en los 20 puntos de rotura caracterizados a nivel de secuencia nos ha permitido profundizar en los mecanismos que generan las deleciones y la duplicación. Encontramos que los mecanismos mediados por microhomologías son mayoritarios. Además, en nueve de las CNVs no se produce la inserción ni deleción de nucleótidos, lo que apoya una mayor implicación de los mecanismos de recombinación replicativos como el SRS, FoSTes o MMBIR, que son menos propensos a introducir “errores”. Por último, hemos comprobado que la arquitectura genómica juega un papel central en la formación de las CNVs intragénicas.
5. Hemos comprobado que las mutaciones que afectan al *splicing* son muy frecuentes en la NF1 (25%). Hemos identificado 62 mutaciones diferentes y hemos caracterizado su efecto sobre el procesamiento del pre-ARNm.

Conclusiones

6. Conociendo el efecto real de las mutaciones sobre el procesamiento del ARNm, el análisis *in silico* de dichas mutaciones nos ha permitido inferir las siguientes conclusiones. Las herramientas informáticas permiten establecer la patogenicidad de las mutaciones que alteran los sitios consenso de *splicing*. También comprobamos que los cambios que generan nuevos sitios de *splicing* son valorados adecuadamente, mediante la predicción de su funcionalidad. Sin embargo, concluimos que no es posible predecir el efecto final de una mutación sobre la secuencia del ARNm resultante. De igual modo, hemos determinado la incapacidad de las herramientas *in silico* para predecir si una mutación afecta a motivos SRE (tipo V). Por dichas consideraciones, actualmente, no es recomendable hacer predicciones directas del efecto de las mutaciones puntuales (*missense*, *nonsense*, silenciosas, etc.) en la composición de la proteína.

7. Los resultados obtenidos mediante mutagénesis dirigida de un minigen y análisis funcional de las mutaciones de *splicing* en el exón 7, muestran la existencia de dos elementos reguladores en las posiciones c.910_911 y c.943_946. Hemos demostrado que la proteína SC35 es necesaria para la inclusión del exón 7 y que las mutaciones en la región c.945_946 impiden dicha función. Por otra parte, la mutación patogénica c.1007G>A crea un elemento ESS en el exón 7 que se une al represor del *splicing* hnRNPA1 produciendo el *skipping* del exón.

8. La caracterización de dos nuevas mutaciones que producen el *skipping* del exón 37, c.6799C>T y c.6801A>G, indican la existencia de un nuevo elemento ESE. El análisis funcional de varias mutaciones, incluida la doble mutación [6792C>A;c.6799C>T], caracterizada en este trabajo, ha probado el efecto sumatorio de los dos cambios sobre la regulación negativa del *splicing* del exón 37.

Bibliografía

- Abeyasinghe S.S., Chuzhanova N., Krawczak M., Ball E.V., and Cooper D.N. (2003) Translocation and gross deletion breakpoints in human inherited disease and cancer I: Nucleotide composition and recombination-associated motifs. *Hum. Mutat.* 22, 229-244.
- Alwan S., Tredwell S.J., and Friedman J.M. (2005) Is osseous dysplasia a primary feature of neurofibromatosis 1 (NF1)? *Clin Genet.* 67, 378-390.
- Andersen L.B., Ballester R., Marchuk D.A., Chang E., Gutmann D.H., Saulino A.M., Camonis J., Wigler M., and Collins F.S. (1993) A conserved alternative splice in the von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) gene produces two neurofibromin isoforms, both of which have GTPase-activating protein activity. *Mol Cell Biol* 13, 487-495.
- Anderson S.L., Coli R., Daly I.W., Kichula E.A., Rork M.J., Volpi S.A., Ekstein J., and Rubin B.Y. (2001) Familial dysautonomia is caused by mutations of the IKAP gene. *Am J Hum. Genet.* 68, 753-758.
- Ars E., Serra E., Garcia J., Kruyer H., Gaona A., Lazaro C., and Estivill X. (2000) Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Hum. Mol Genet.* 9, 237-247.
- Bacolla A. and Wells R.D. (2009) Non-B DNA conformations as determinants of mutagenesis and human disease. *Mol Carcinog.* 48, 273-285.
- Ballester R., Marchuk D., Boguski M., Saulino A., Letcher R., Wigler M., and Collins F. (1990) The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell* 63, 851-859.
- Baralle M., Skoko N., Knezevich A., De Conti L., Motti D., Bhuvanagiri M., Baralle D., Buratti E., and Baralle F.E. (2006) NF1 mRNA biogenesis: effect of the genomic milieu in splicing regulation of the NF1 exon 37 region. *FEBS Lett.* 580, 4449-4456.
- Bausch B., Borozdin W., Mautner V.F., Hoffmann M.M., Boehm D., Robledo M., Cascon A., Harenberg T., Schiavi F., Pawlu C., Peczkowska M., Letizia C., Calvieri S., Arnaldi G., Klingenberg-Noftz R.D., Reisch N., Fassina A., Brunaud L., Walter M.A., Mannelli M., MacGregor G., Palazzo F.F., Barontini M., Walz M.K., Kremens B., Brabant G., Pfaffle R., Koschker A.C., Lohoefer F., Mohaupt M., Gimm O., Jarzab B., McWhinney S.R., Opocher G., Januszewicz A., Kohlhase J., Eng C., and Neumann H.P. (2007) Germline NF1 mutational spectra and loss-of-heterozygosity analyses in patients with pheochromocytoma and neurofibromatosis type 1. *J Clin Endocrinol. Metab* 92, 2784-2792.
- Bausch B., Borozdin W., and Neumann H.P. (2006) Clinical and genetic characteristics of patients with neurofibromatosis type 1 and pheochromocytoma. *N. Engl. J Med* 354, 2729-2731.
- Bendahhou S., Cummins T.R., Hahn A.F., Langlois S., Waxman S.G., and Ptacek L.J. (2000) A double mutation in families with periodic paralysis defines new aspects of sodium channel slow inactivation. *J Clin Invest* 106, 431-438.

- Bengesser K., Cooper D.N., Steinmann K., Kluwe L., Chuzhanova N.A., Wimmer K., Tatagiba M., Tinschert S., Mautner V.F., and Kehrer-Sawatzki H. (2010) A novel third type of recurrent NF1 microdeletion mediated by nonallelic homologous recombination between LRRC37B-containing low-copy repeats in 17q11.2. *Hum. Mutat.* 31, 742-751.
- Birindelli S., Perrone F., Oggionni M., Lavarino C., Pasini B., Vergani B., Ranzani G.N., Pierotti M.A., and Pilotti S. (2001) Rb and TP53 pathway alterations in sporadic and NF1-related malignant peripheral nerve sheath tumors. *Lab Invest* 81, 833-844.
- Blencowe B.J. (2000) Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem. Sci* 25, 106-110.
- Bollag G., McCormick F., and Clark R. (1993) Characterization of full-length neurofibromin: tubulin inhibits Ras GAP activity. *EMBO J* 12, 1923-1927.
- Bottillo I., Ahlquist T., Brekke H., Danielsen S.A., van den B.E., Mertens F., Lothe R.A., and Dallapiccola B. (2009) Germline and somatic NF1 mutations in sporadic and NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumours. *J Pathol.* 217, 693-701.
- Bottillo I., De Luca A., Schirinzi A., Guida V., Torrente I., Calvieri S., Gervasini C., Larizza L., Pizzuti A., and Dallapiccola B. (2007) Functional analysis of splicing mutations in exon 7 of NF1 gene. *BMC. Med Genet.* 8, 4.
- Boudry-Labis E., Roche-Lestienne C., Nibourel O., Boissel N., Terre C., Perot C., Eclache V., Gachard N., Tigaud I., Plessis G., Cuccuini W., Geffroy S., Villenet C., Figeac M., Lepretre F., Renneville A., Cheok M., Soulier J., Dombret H., and Preudhomme C. (2013) Neurofibromatosis-1 gene deletions and mutations in de novo adult acute myeloid leukemia. *Am J Hematol.* 88, 306-311.
- Boyanapalli M., Lahoud O.B., Messiaen L., Kim B., Anderle de Saylor M.S., Duckett S.J., Somara S., and Mikol D.D. (2006) Neurofibromin binds to caveolin-1 and regulates ras, FAK, and Akt. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 340, 1200-1208.
- Brannan C.I., Perkins A.S., Vogel K.S., Ratner N., Nordlund M.L., Reid S.W., Buchberg A.M., Jenkins N.A., Parada L.F., and Copeland N.G. (1994) Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues. *Genes Dev.* 8, 1019-1029.
- Burnichon N., Buffet A., Parfait B., Letouze E., Laurendeau I., Loriot C., Pasmant E., Abermil N., Valeyrie-Allanore L., Bertherat J., Amar L., Vidaud D., Favier J., and Gimenez-Roqueplo A.P. (2012) Somatic NF1 inactivation is a frequent event in sporadic pheochromocytoma. *Hum. Mol Genet.* 21, 5397-5405.
- Cartegni L., Hastings M.L., Calarco J.A., de Stanchina E., and Krainer A.R. (2006) Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2. *Am J Hum. Genet.* 78, 63-77.

- Cartegni L. and Krainer A.R. (2002) Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat. Genet.* 30, 377-384.
- Cartegni L., Wang J., Zhu Z., Zhang M.Q., and Krainer A.R. (2003) ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 31, 3568-3571.
- Cawthon R.M., Andersen L.B., Buchberg A.M., Xu G.F., O'Connell P., Viskochil D., Weiss R.B., Wallace M.R., Marchuk D.A., Culver M., and . (1991) cDNA sequence and genomic structure of EV12B, a gene lying within an intron of the neurofibromatosis type 1 gene. *Genomics* 9, 446-460.
- Cawthon R.M., O'Connell P., Buchberg A.M., Viskochil D., Weiss R.B., Culver M., Stevens J., Jenkins N.A., Copeland N.G., and White R. (1990) Identification and characterization of transcripts from the neurofibromatosis 1 region: the sequence and genomic structure of EV12 and mapping of other transcripts. *Genomics* 7, 555-565.
- Chen J.M., Cooper D.N., Ferec C., Kehrer-Sawatzki H., and Patrinos G.P. (2010) Genomic rearrangements in inherited disease and cancer. *Semin. Cancer Biol* 20, 222-233.
- Chen J.M., Ferec C., and Cooper D.N. (2009) Closely spaced multiple mutations as potential signatures of transient hypermutability in human genes. *Hum. Mutat.* 30, 1435-1448.
- Chen J.M., Chuzhanova N., Stenson P.D., Ferec C., and Cooper D.N. (2005) Complex gene rearrangements caused by serial replication slippage. *Hum. Mutat.* 26, 125-134.
- Cichowski K., Shih T.S., Schmitt E., Santiago S., Reilly K., McLaughlin M.E., Bronson R.T., and Jacks T. (1999) Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1. *Science* 286, 2172-2176.
- Colapietro P., Gervasini C., Natacci F., Rossi L., Riva P., and Larizza L. (2003) NF1 exon 7 skipping and sequence alterations in exonic splice enhancers (ESEs) in a neurofibromatosis 1 patient. *Hum. Genet.* 113, 551-554.
- Colman S.D., Williams C.A., and Wallace M.R. (1995) Benign neurofibromas in type 1 neurofibromatosis (NF1) show somatic deletions of the NF1 gene. *Nat. Genet.* 11, 90-92.
- Cooper T.A., Wan L., and Dreyfuss G. (2009) RNA and disease. *Cell* 136, 777-793.
- Coulter L.R., Landree M.A., and Cooper T.A. (1997) Identification of a new class of exonic splicing enhancers by in vivo selection. *Mol Cell Biol* 17, 2143-2150.
- Cummings L.M., Trent J.M., and Marchuk D.A. (1996) Identification and mapping of type 1 neurofibromatosis (NF1) homologous loci. *Cytogenet. Cell Genet.* 73, 334-340.

- D'Angelo I., Welti S., Bonneau F., and Scheffzek K. (2006) A novel bipartite phospholipid-binding module in the neurofibromatosis type 1 protein. *EMBO Rep.* 7, 174-179.
- Danglot G., Regnier V., Fauvet D., Vassal G., Kujas M., and Bernheim A. (1995) Neurofibromatosis 1 (NF1) mRNAs expressed in the central nervous system are differentially spliced in the 5' part of the gene. *Hum. Mol Genet.* 4, 915-920.
- Daston M.M., Scrabble H., Nordlund M., Sturbaum A.K., Nissen L.M., and Ratner N. (1992) The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes. *Neuron* 8, 415-428.
- De Luca A., Bottillo I., Dasdia M.C., Morella A., Lanari V., Bernardini L., Divona L., Giustini S., Sinibaldi L., Novelli A., Torrente I., Schirinzi A., and Dallapiccola B. (2007) Deletions of NF1 gene and exons detected by multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet.* 44, 800-808.
- De Luca A., Buccino A., Gianni D., Mangino M., Giustini S., Richetta A., Divona L., Calvieri S., Mingarelli R., and Dallapiccola B. (2003) NF1 gene analysis based on DHPLC. *Hum. Mutat.* 21, 171-172.
- De Raedt T., Brems H., Wolkenstein P., Vidaud D., Pilotti S., Perrone F., Mautner V., Frahm S., Sciot R., and Legius E. (2003) Elevated risk for MPNST in NF1 microdeletion patients. *Am J Hum. Genet.* 72, 1288-1292.
- DeClue J.E., Heffelfinger S., Benvenuto G., Ling B., Li S., Rui W., Vass W.C., Viskochil D., and Ratner N. (2000) Epidermal growth factor receptor expression in neurofibromatosis type 1-related tumors and NF1 animal models. *J Clin Invest* 105, 1233-1241.
- Dorschner M.O., Sybert V.P., Weaver M., Pletcher B.A., and Stephens K. (2000) NF1 microdeletion breakpoints are clustered at flanking repetitive sequences. *Hum. Mol Genet.* 9, 35-46.
- Douglas J., Cilliers D., Coleman K., Tatton-Brown K., Barker K., Bernhard B., Burn J., Huson S., Josifova D., Lacombe D., Malik M., Mansour S., Reid E., Cormier-Daire V., Cole T., and Rahman N. (2007) Mutations in RNF135, a gene within the NF1 microdeletion region, cause phenotypic abnormalities including overgrowth. *Nat. Genet.* 39, 963-965.
- Eichler E.E., Archidiacono N., and Rocchi M. (1999) CAGGG repeats and the pericentromeric duplication of the hominoid genome. *Genome Res* 9, 1048-1058.
- Evans D.G., Baser M.E., McGaughran J., Sharif S., Howard E., and Moran A. (2002) Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet.* 39, 311-314.
- Fahsold R., Hoffmeyer S., Mischung C., Gille C., Ehlers C., Kucukceylan N., Abdel-Nour M., Gewies A., Peters H., Kaufmann D., Buske A., Tinschert S., and Nurnberg P. (2000) Minor lesion mutational spectrum of the entire NF1 gene

- does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain. *Am J Hum. Genet.* 66, 790-818.
- Fain P.R., Barker D.F., Goldgar D.E., Wright E., Nguyen K., Carey J., Johnson J., Kivlin J., Willard H., Mathew C., and . (1987) Genetic analysis of NF1: identification of close flanking markers on chromosome 17. *Genomics* 1, 340-345.
- Fairbrother W.G., Yeh R.F., Sharp P.A., and Burge C.B. (2002) Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* 297, 1007-1013.
- Fang L., Chalhoub N., Li W., Feingold J., Ortenberg J., Lemieux B., and Thirion J.P. (2001) Genotype analysis of the NF1 gene in the French Canadians from the Quebec population. *Am J Med Genet.* 104, 189-198.
- Ferec C., Casals T., Chuzhanova N., Macek M., Jr., Bienvenu T., Holubova A., King C., McDevitt T., Castellani C., Farrell P.M., Sheridan M., Pantaleo S.J., Loumi O., Messaoud T., Cuppens H., Torricelli F., Cutting G.R., Williamson R., Ramos M.J., Pignatti P.F., Raguene O., Cooper D.N., Audrezet M.P., and Chen J.M. (2006) Gross genomic rearrangements involving deletions in the CFTR gene: characterization of six new events from a large cohort of hitherto unidentified cystic fibrosis chromosomes and meta-analysis of the underlying mechanisms. *Eur. J Hum. Genet.* 14, 567-576.
- Ferner R.E., Huson S.M., Thomas N., Moss C., Willshaw H., Evans D.G., Upadhyaya M., Towers R., Gleeson M., Steiger C., and Kirby A. (2007) Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. *J Med Genet.* 44, 81-88.
- Forbes S.H., Dorschner M.O., Le R., and Stephens K. (2004) Genomic context of paralogous recombination hotspots mediating recurrent NF1 region microdeletion. *Genes Chromosomes. Cancer* 41, 12-25.
- Graveley B.R. (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA.* 6, 1197-1211.
- Griffiths S., Thompson P., Frayling I., and Upadhyaya M. (2007) Molecular diagnosis of neurofibromatosis type 1: 2 years experience. *Fam. Cancer* 6, 21-34.
- Gu W., Zhang F., and Lupski J.R. (2008) Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics.* 1, 4.
- Gutman D.H., Andersen L.B., Cole J.L., Swaroop M., and Collins F.S. (1993) An alternatively-spliced mRNA in the carboxy terminus of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene is expressed in muscle. *Hum. Mol Genet.* 2, 989-992.
- Han K., Lee J., Meyer T.J., Remedios P., Goodwin L., and Batzer M.A. (2008) L1 recombination-associated deletions generate human genomic variation. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 105, 19366-19371.

- Han S.S., Cooper D.N., and Upadhyaya M.N. (2001) Evaluation of denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) for the mutational analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Hum. Genet.* 109, 487-497.
- Haque A., Buratti E., and Baralle F.E. (2010) Functional properties and evolutionary splicing constraints on a composite exonic regulatory element of splicing in CFTR exon 12. *Nucleic Acids Res* 38, 647-659.
- Harada T., Nagayama J., Kohno K., Mickley L.A., Fojo T., Kuwano M., and Wada M. (2000) Alu-associated interstitial deletions and chromosomal re-arrangement in 2 human multidrug-resistant cell lines. *Int. J Cancer* 86, 506-511.
- Hastings P.J., Ira G., and Lupski J.R. (2009) A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. *PLoS. Genet.* 5, e1000327.
- Heinrich B., Zhang Z., Raitskin O., Hiller M., Benderska N., Hartmann A.M., Bracco L., Elliott D., Ben Ari S., Soreq H., Sperling J., Sperling R., and Stamm S. (2009) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G regulates splice site selection by binding to CC(A/C)-rich regions in pre-mRNA. *J Biol Chem.* 284, 14303-14315.
- Henkemeyer M., Rossi D.J., Holmyard D.P., Puri M.C., Mbamalu G., Harpal K., Shih T.S., Jacks T., and Pawson T. (1995) Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking ras GTPase-activating protein. *Nature* 377, 695-701.
- Hernandez-Imaz E., Campos B., Rodriguez-Alvarez F.J., Abad O., Melean G., Gardenyes J., Martin Y., and Hernandez-Chico C. (2013) Characterization of NF1 allele containing two nonsense mutations in exon 37 that segregates with neurofibromatosis type 1. *Clin Genet.* 83, 462-466.
- Hoffmeyer S., Nurnberg P., Ritter H., Fahsold R., Leistner W., Kaufmann D., and Krone W. (1998) Nearby stop codons in exons of the neurofibromatosis type 1 gene are disparate splice effectors. *Am J Hum. Genet.* 62, 269-277.
- Hsueh Y.P., Roberts A.M., Volta M., Sheng M., and Roberts R.G. (2001) Bipartite interaction between neurofibromatosis type I protein (neurofibromin) and syndecan transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *J Neurosci.* 21, 3764-3770.
- Huson S.M. (1994) Neurofibromatosis: Historical Perspective, Classification and Diagnostic Criteria. In: Huson SM, Huges RAC, editors. *The Neurofibromatoses. A pathogenic and clinical overview.* London: *Chapman & Hall Medical.* 1-22.
- Huson S.M., Compston D.A., Clark P., and Harper P.S. (1989) A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales. I. Prevalence, fitness, mutation rate, and effect of parental transmission on severity. *J Med Genet.* 26, 704-711.
- Huson S.M., Harper P.S., and Compston D.A. (1988) Von Recklinghausen neurofibromatosis. A clinical and population study in south-east Wales. *Brain* 111 (Pt 6), 1355-1381.

- Huson S.M. (1987) The different forms of neurofibromatosis. *Br. Med J (Clin Res Ed)* 294, 1113-1114.
- Hyman S.L., Arthur S.E., and North K.N. (2006) Learning disabilities in children with neurofibromatosis type 1: subtypes, cognitive profile, and attention-deficit-hyperactivity disorder. *Dev. Med Child Neurol.* 48, 973-977.
- Izquierdo J.M., Majos N., Bonnal S., Martinez C., Castelo R., Guigo R., Bilbao D., and Valcarcel J. (2005) Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition. *Mol Cell* 19, 475-484.
- Jacks T., Shih T.S., Schmitt E.M., Bronson R.T., Bernards A., and Weinberg R.A. (1994) Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1. *Nat. Genet.* 7, 353-361.
- Jeffreys A.J. and Neumann R. (2005) Factors influencing recombination frequency and distribution in a human meiotic crossover hotspot. *Hum. Mol Genet.* 14, 2277-2287.
- Jeffreys A.J. and Neumann R. (2002) Reciprocal crossover asymmetry and meiotic drive in a human recombination hot spot. *Nat. Genet.* 31, 267-271.
- Jenne D.E., Tinschert S., Dorschner M.O., Hameister H., Stephens K., and Kehrer-Sawatzki H. (2003) Complete physical map and gene content of the human NF1 tumor suppressor region in human and mouse. *Genes Chromosomes. Cancer* 37, 111-120.
- Jett K. and Friedman J.M. (2010) Clinical and genetic aspects of neurofibromatosis 1. *Genet. Med* 12, 1-11.
- Kashima T., Rao N., David C.J., and Manley J.L. (2007) hnRNP A1 functions with specificity in repression of SMN2 exon 7 splicing. *Hum. Mol Genet.* 16, 3149-3159.
- Kashima T. and Manley J.L. (2003) A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* 34, 460-463.
- Kaufmann D., Gruener S., Braun F., Stark M., Griesser J., Hoffmeyer S., and Bartelt B. (1999) EVI2B, a gene lying in an intron of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene, is as the NF1 gene involved in differentiation of melanocytes and keratinocytes and is overexpressed in cells derived from NF1 neurofibromas. *DNA Cell Biol* 18, 345-356.
- Kehrer-Sawatzki H., Schmid E., Funsterer C., Kluwe L., and Mautner V.F. (2008) Absence of cutaneous neurofibromas in an NF1 patient with an atypical deletion partially overlapping the common 1.4 Mb microdeleted region. *Am J Med Genet. A* 146A, 691-699.
- Kehrer-Sawatzki H., Kluwe L., Sandig C., Kohn M., Wimmer K., Krammer U., Peyrl A., Jenne D.E., Hansmann I., and Mautner V.F. (2004) High frequency of mosaicism among patients with neurofibromatosis type 1 (NF1) with

- microdeletions caused by somatic recombination of the JAZ1 gene. *Am J Hum. Genet.* 75, 410-423.
- Kehrer-Sawatzki H., Schwickardt T., Assum G., Rocchi M., and Krone W. (1997) A third neurofibromatosis type 1 (NF1) pseudogene at chromosome 15q11.2. *Hum. Genet.* 100, 595-600.
- Kluwe L., Siebert R., Gesk S., Friedrich R.E., Tinschert S., Kehrer-Sawatzki H., and Mautner V.F. (2004) Screening 500 unselected neurofibromatosis 1 patients for deletions of the NF1 gene. *Hum. Mutat.* 23, 111-116.
- Knudson A.G., Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 68, 820-823.
- Kourea H.P., Orlow I., Scheithauer B.W., Cordon-Cardo C., and Woodruff J.M. (1999) Deletions of the INK4A gene occur in malignant peripheral nerve sheath tumors but not in neurofibromas. *Am J Pathol.* 155, 1855-1860.
- Kreusel K.M. (2005) Ophthalmological manifestations in VHL and NF 1: pathological and diagnostic implications. *Fam. Cancer* 4, 43-47.
- Laccone F., Junemann I., Whatley S., Morgan R., Butler R., Huppke P., and Ravine D. (2004) Large deletions of the MECP2 gene detected by gene dosage analysis in patients with Rett syndrome. *Hum. Mutat.* 23, 234-244.
- Lam K.W. and Jeffreys A.J. (2006) Processes of copy-number change in human DNA: the dynamics of α -globin gene deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 103, 8921-8927.
- Lazaro C., Ravella A., Gaona A., Volpini V., and Estivill X. (1994a) Neurofibromatosis type 1 due to germ-line mosaicism in a clinically normal father. *N. Engl. J Med* 331, 1403-1407.
- Lazaro C., Gaona A., and Estivill X. (1994b) Two CA/GT repeat polymorphisms in intron 27 of the human neurofibromatosis (NF1) gene. *Hum. Genet.* 93, 351-352.
- Lazaro C., Gaona A., Xu G., Weiss R., and Estivill X. (1993) A highly informative CA/GT repeat polymorphism in intron 38 of the human neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Hum. Genet.* 92, 429-430.
- Lee J.A., Carvalho C.M., and Lupski J.R. (2007) A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell* 131, 1235-1247.
- Lieber M.R. (2008) The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem.* 283, 1-5.
- Lim K.H., Ferraris L., Filloux M.E., Raphael B.J., and Fairbrother W.G. (2011) Using positional distribution to identify splicing elements and predict pre-mRNA processing defects in human genes. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 108, 11093-11098.

- Listernick R., Charrow J., and Gutmann D.H. (1999) Intracranial gliomas in neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet.* 89, 38-44.
- Listernick R., Louis D.N., Packer R.J., and Gutmann D.H. (1997) Optic pathway gliomas in children with neurofibromatosis 1: consensus statement from the NF1 Optic Pathway Glioma Task Force. *Ann. Neurol.* 41, 143-149.
- Liu F. and Gong C.X. (2008) Tau exon 10 alternative splicing and tauopathies. *Mol Neurodegener.* 3, 8.
- Liu H.X., Zhang M., and Krainer A.R. (1998) Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev.* 12, 1998-2012.
- Lopez-Bigas N., Audit B., Ouzounis C., Parra G., and Guigo R. (2005) Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? *FEBS Lett.* 579, 1900-1903.
- Lopez-Correa C., Dorschner M., Brems H., Lazaro C., Clementi M., Upadhyaya M., Dooijes D., Moog U., Kehrer-Sawatzki H., Rutkowski J.L., Fryns J.P., Marynen P., Stephens K., and Legius E. (2001) Recombination hotspot in NF1 microdeletion patients. *Hum. Mol Genet.* 10, 1387-1392.
- Luijten M., Redeker S., Minoshima S., Shimizu N., Westerveld A., and Hulsebos T.J. (2001) Duplication and transposition of the NF1 pseudogene regions on chromosomes 2, 14, and 22. *Hum. Genet.* 109, 109-116.
- Mangoura D., Sun Y., Li C., Singh D., Gutmann D.H., Flores A., Ahmed M., and Vallianatos G. (2006) Phosphorylation of neurofibromin by PKC is a possible molecular switch in EGF receptor signaling in neural cells. *Oncogene* 25, 735-745.
- Mantripragada K.K., Thureson A.C., Piotrowski A., Diaz d.S., Menzel U., Grigelionis G., Ferner R.E., Griffiths S., Bolund L., Mautner V., Nordling M., Legius E., Vetrie D., Dahl N., Messiaen L., Upadhyaya M., Bruder C.E., and Dumanski J.P. (2006) Identification of novel deletion breakpoints bordered by segmental duplications in the NF1 locus using high resolution array-CGH. *J Med Genet.* 43, 28-38.
- Marchuk D.A., Tavakkol R., Wallace M.R., Brownstein B.H., Taillon-Miller P., Fong C.T., Legius E., Andersen L.B., Glover T.W., and Collins F.S. (1992) A yeast artificial chromosome contig encompassing the type 1 neurofibromatosis gene. *Genomics* 13, 672-680.
- Martin G.A., Viskochil D., Bollag G., McCabe P.C., Crosier W.J., Haubruck H., Conroy L., Clark R., O'Connell P., Cawthon R.M., and . (1990) The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell* 63, 843-849.
- Martinez-Contreras R., Cloutier P., Shkreta L., Fisette J.F., Revil T., and Chabot B. (2007) hnRNP proteins and splicing control. *Adv. Exp. Med Biol* 623, 123-147.

- Mautner V.F., Brenner W., Funsterer C., Hagel C., Gawad K., and Friedrich R.E. (2007) Clinical relevance of positron emission tomography and magnetic resonance imaging in the progression of internal plexiform neurofibroma in NF1. *Anticancer Res* 27, 1819-1822.
- Mawrin C., Kirches E., Boltze C., Dietzmann K., Roessner A., and Schneider-Stock R. (2002) Immunohistochemical and molecular analysis of p53, RB, and PTEN in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Virchows Arch.* 440, 610-615.
- McGillicuddy L.T., Fromm J.A., Hollstein P.E., Kubek S., Beroukhim R., De Raedt T., Johnson B.W., Williams S.M., Nghiemphu P., Liao L.M., Cloughesy T.F., Mischel P.S., Parret A., Seiler J., Moldenhauer G., Scheffzek K., Stemmer-Rachamimov A.O., Sawyers C.L., Brennan C., Messiaen L., Mellinghoff I.K., and Cichowski K. (2009) Proteasomal and genetic inactivation of the NF1 tumor suppressor in gliomagenesis. *Cancer Cell* 16, 44-54.
- McVey M. and Lee S.E. (2008) MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet.* 24, 529-538.
- Messiaen L., Vogt J., Bengesser K., Fu C., Mikhail F., Serra E., Garcia-Linares C., Cooper D.N., Lazaro C., and Kehrer-Sawatzki H. (2011) Mosaic type-1 NF1 microdeletions as a cause of both generalized and segmental neurofibromatosis type-1 (NF1). *Hum. Mutat.* 32, 213-219.
- Messiaen L.M. and Wimmer K. (2008) NF1 Mutational Spectrum. In: Kaufmann D (ed) Neurofibromatoses. *Monogr Hum Genet Basel, Karger.* 16, 63-77.
- Messiaen L.M., Callens T., Mortier G., Beysen D., Vandenbroucke I., Van Roy N., Speleman F., and Paepe A.D. (2000) Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. *Hum. Mutat.* 15, 541-555.
- Messiaen L., Callens T., De Paepe A., Craen M., and Mortier G. (1997) Characterisation of two different nonsense mutations, C6792A and C6792G, causing skipping of exon 37 in the NF1 gene. *Hum. Genet.* 101, 75-80.
- Nasim F.U., Hutchison S., Cordeau M., and Chabot B. (2002) High-affinity hnRNP A1 binding sites and duplex-forming inverted repeats have similar effects on 5' splice site selection in support of a common looping out and repression mechanism. *RNA.* 8, 1078-1089.
- Nielsen G.P., Stemmer-Rachamimov A.O., Ino Y., Moller M.B., Rosenberg A.E., and Louis D.N. (1999) Malignant transformation of neurofibromas in neurofibromatosis 1 is associated with CDKN2A/p16 inactivation. *Am J Pathol.* 155, 1879-1884.
- NIH Consensus Development Conference. (1988) Neurofibromatosis Conference Statement. *Arch Neurol* 45, 475-578.
- North K.N., Riccardi V., Samango-Sprouse C., Ferner R., Moore B., Legius E., Ratner N., and Denckla M.B. (1997) Cognitive function and academic performance in

- neurofibromatosis. 1: consensus statement from the NF1 Cognitive Disorders Task Force. *Neurology* 48, 1121-1127.
- Orzan F., Stropi M., Venturin M., Valero M.C., Hernandez C., and Riva P. (2008) Breakpoint characterization of a novel NF1 multiexonic deletion: a case showing expression of the mutated allele. *Neurogenetics*. 9, 95-100.
- Osborn M.J. and Upadhyaya M. (1999) Evaluation of the protein truncation test and mutation detection in the NF1 gene: mutational analysis of 15 known and 40 unknown mutations. *Hum. Genet.* 105, 327-332.
- Pan Q., Shai O., Lee L.J., Frey B.J., and Blencowe B.J. (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.* 40, 1413-1415.
- Pasmant E., Masliah-Planchon J., Levy P., Laurendeau I., Ortonne N., Parfait B., Valeyrie-Allanore L., Leroy K., Wolkenstein P., Vidaud M., Vidaud D., and Bieche I. (2011) Identification of genes potentially involved in the increased risk of malignancy in NF1-microdeleted patients. *Mol Med* 17, 79-87.
- Pasmant E., Sabbagh A., Masliah-Planchon J., Haddad V., Hamel M.J., Laurendeau I., Soulier J., Parfait B., Wolkenstein P., Bieche I., Vidaud M., and Vidaud D. (2009) Detection and characterization of NF1 microdeletions by custom high resolution array CGH. *J Mol Diagn.* 11, 524-529.
- Pasmant E., Sabbagh A., Spurlock G., Laurendeau I., Grillo E., Hamel M.J., Martin L., Barbarot S., Leheup B., Rodriguez D., Lacombe D., Dollfus H., Pasquier L., Isidor B., Ferkal S., Soulier J., Sanson M., Dieux-Coeslier A., Bieche I., Parfait B., Vidaud M., Wolkenstein P., Upadhyaya M., and Vidaud D. (2010) NF1 microdeletions in neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. *Hum. Mutat.* 31, E1506-E1518.
- Pavlov Y.I., Shcherbakova P.V., and Rogozin I.B. (2006) Roles of DNA polymerases in replication, repair, and recombination in eukaryotes. *Int. Rev Cytol.* 255, 41-132.
- Perrone F., Tabano S., Colombo F., Dagrada G., Birindelli S., Gronchi A., Colecchia M., Pierotti M.A., and Pilotti S. (2003) p15INK4b, p14ARF, and p16INK4a inactivation in sporadic and neurofibromatosis type 1-related malignant peripheral nerve sheath tumors. *Clin Cancer Res* 9, 4132-4138.
- Petek E., Jenne D.E., Smolle J., Binder B., Lasinger W., Windpassinger C., Wagner K., Kroisel P.M., and Kehrer-Sawatzki H. (2003) Mitotic recombination mediated by the JJAZF1 (KIAA0160) gene causing somatic mosaicism and a new type of constitutional NF1 microdeletion in two children of a mosaic female with only few manifestations. *J Med Genet.* 40, 520-525.
- Pozzoli U. and Sironi M. (2005) Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. *Cell Mol Life Sci* 62, 1579-1604.
- Pros E., Fernandez-Rodriguez J., Benito L., Ravella A., Capella G., Blanco I., Serra E., and Lazaro C. (2010) Modulation of aberrant NF1 pre-mRNA splicing by kinetin treatment. *Eur. J Hum. Genet.* 18, 614-617.

- Pros E., Fernandez-Rodriguez J., Canet B., Benito L., Sanchez A., Benavides A., Ramos F.J., Lopez-Ariztegui M.A., Capella G., Blanco I., Serra E., and Lazaro C. (2009) Antisense therapeutics for neurofibromatosis type 1 caused by deep intronic mutations. *Hum. Mutat.* 30, 454-462.
- Pros E., Gomez C., Martin T., Fabregas P., Serra E., and Lazaro C. (2008) Nature and mRNA effect of 282 different NF1 point mutations: focus on splicing alterations. *Hum. Mutat.* 29, E173-E193.
- Pros E., Larriba S., Lopez E., Ravella A., Gili M.L., Kruyer H., Valls J., Serra E., and Lazaro C. (2006) NF1 mutation rather than individual genetic variability is the main determinant of the NF1-transcriptional profile of mutations affecting splicing. *Hum. Mutat.* 27, 1104-1114.
- Purandare S.M., Huntsman B.H., Li Y., Zhu X.L., Sawada S., Neil S.M., Brothman A., White R., Cawthon R., and Viskochil D. (1995) Identification of neurofibromatosis 1 (NF1) homologous loci by direct sequencing, fluorescence in situ hybridization, and PCR amplification of somatic cell hybrids. *Genomics* 30, 476-485.
- Quemener S., Chen J.M., Chuzhanova N., Benech C., Casals T., Macek M., Jr., Bienvenu T., McDevitt T., Farrell P.M., Loumi O., Messaoud T., Cuppens H., Cutting G.R., Stenson P.D., Giteau K., Audrezet M.P., Cooper D.N., and Ferec C. (2010) Complete ascertainment of intragenic copy number mutations (CNMs) in the CFTR gene and its implications for CNM formation at other autosomal loci. *Hum. Mutat.* 31, 421-428.
- Raedt T.D., Stephens M., Heyns I., Brems H., Thijs D., Messiaen L., Stephens K., Lazaro C., Wimmer K., Kehrer-Sawatzki H., Vidaud D., Kluwe L., Marynen P., and Legius E. (2006) Conservation of hotspots for recombination in low-copy repeats associated with the NF1 microdeletion. *Nat. Genet.* 38, 1419-1423.
- Raiker S.J., Lee H., Baldwin K.T., Duan Y., Shrager P., and Giger R.J. (2010) Oligodendrocyte-myelin glycoprotein and Nogo negatively regulate activity-dependent synaptic plasticity. *J Neurosci.* 30, 12432-12445.
- Rasmussen S.A., Yang Q., and Friedman J.M. (2001) Mortality in neurofibromatosis 1: an analysis using U.S. death certificates. *Am J Hum. Genet.* 68, 1110-1118.
- Ratray A.J. and Strathern J.N. (2003) Error-prone DNA polymerases: when making a mistake is the only way to get ahead. *Annu. Rev Genet.* 37, 31-66.
- Reese M.G., Eeckman F.H., Kulp D., and Haussler D. (1997) Improved splice site detection in Genie. *J Comput. Biol* 4, 311-323.
- Riccardi V.M. (1992) Neurofibromatosis: Phenotype, Natural History and Pathogenesis. Baltimore: *Johns Hopkins University Press.*
- Riva P., Corrado L., Natacci F., Castorina P., Wu B.L., Schneider G.H., Clementi M., Tenconi R., Korf B.R., and Larizza L. (2000) NF1 microdeletion syndrome: refined FISH characterization of sporadic and familial deletions with locus-specific probes. *Am J Hum. Genet.* 66, 100-109.

- Robertson J., Bilbao J., Zinman L., Hazrati L.N., Tokuhira S., Sato C., Moreno D., Strome R., Mackenzie I.R., and Rogaeva E. (2011) A novel double mutation in FUS gene causing sporadic ALS. *Neurobiol. Aging* 32, 553-30.
- Roehl A.C., Mussotter T., Cooper D.N., Kluwe L., Wimmer K., Hogel J., Zetzmann M., Vogt J., Mautner V.F., and Kehrer-Sawatzki H. (2012) Tissue-specific differences in the proportion of mosaic large NF1 deletions are suggestive of a selective growth advantage of hematopoietic del(+/-) stem cells. *Hum. Mutat.* 33, 541-550.
- Roehl A.C., Vogt J., Mussotter T., Zickler A.N., Spoti H., Hogel J., Chuzhanova N.A., Wimmer K., Kluwe L., Mautner V.F., Cooper D.N., and Kehrer-Sawatzki H. (2010) Intrachromosomal mitotic nonallelic homologous recombination is the major molecular mechanism underlying type-2 NF1 deletions. *Hum. Mutat.* 31, 1163-1173.
- Rossetti S., Chauveau D., Walker D., Saggar-Malik A., Winearls C.G., Torres V.E., and Harris P.C. (2002) A complete mutation screen of the ADPKD genes by DHPLC. *Kidney Int.* 61, 1588-1599.
- Roth T.M., Petty E.M., and Barald K.F. (2008) The role of steroid hormones in the NF1 phenotype: focus on pregnancy. *Am J Med Genet. A* 146A, 1624-1633.
- Rudiger N.S., Gregersen N., and Kielland-Brandt M.C. (1995) One short well conserved region of Alu-sequences is involved in human gene rearrangements and has homology with prokaryotic chi. *Nucleic Acids Res* 23, 256-260.
- Sabbagh A., Pasmant E., Imbard A., Luscan A., Soares M., Blanche H., Laurendeau I., Ferkal S., Vidaud M., Pinson S., Bellanne-Chantelot C., Vidaud D., Parfait B., and Wolkenstein P. (2013) NF1 Molecular Characterization and Neurofibromatosis Type I Genotype-Phenotype Correlation: The French Experience. *Hum. Mutat.*
- Sabbagh A., Pasmant E., Laurendeau I., Parfait B., Barbarot S., Guillot B., Combemale P., Ferkal S., Vidaud M., Aubourg P., Vidaud D., and Wolkenstein P. (2009) Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1. *Hum. Mol Genet.* 18, 2768-2778.
- Sasaki M., Lange J., and Keeney S. (2010) Genome destabilization by homologous recombination in the germ line. *Nat. Rev Mol Cell Biol* 11, 182-195.
- Schaal T.D. and Maniatis T. (1999) Selection and characterization of pre-mRNA splicing enhancers: identification of novel SR protein-specific enhancer sequences. *Mol Cell Biol* 19, 1705-1719.
- Seizinger B.R., Rouleau G.A., Lane A.H., Farmer G., Ozelius L.J., Haines J.L., Parry D.M., Korf B.R., Pericak-Vance M.A., Faryniarz A.G., and . (1987) Linkage analysis in von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) with DNA markers for chromosome 17. *Genomics* 1, 346-348.

- Sen S.K., Han K., Wang J., Lee J., Wang H., Callinan P.A., Dyer M., Cordaux R., Liang P., and Batzer M.A. (2006) Human genomic deletions mediated by recombination between Alu elements. *Am J Hum. Genet.* 79, 41-53.
- Seo J., Howell M.D., Singh N.N., and Singh R.N. (2013) Spinal muscular atrophy: An update on therapeutic progress. *Biochim. Biophys. Acta* 1832, 2180-2190.
- Serra E., Puig S., Otero D., Gaona A., Kruyer H., Ars E., Estivill X., and Lazaro C. (1997) Confirmation of a double-hit model for the NF1 gene in benign neurofibromas. *Am J Hum. Genet.* 61, 512-519.
- Sharif S., Moran A., Huson S.M., Iddenden R., Shenton A., Howard E., and Evans D.G. (2007) Women with neurofibromatosis 1 are at a moderately increased risk of developing breast cancer and should be considered for early screening. *J Med Genet.* 44, 481-484.
- Shaw C.J. and Lupski J.R. (2004) Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum. Mol Genet.* 13 Spec No 1, R57-R64.
- Shen M.H., Mantripragada K., Dumanski J.P., Frayling I., and Upadhyaya M. (2007) Detection of copy number changes at the NF1 locus with improved high-resolution array CGH. *Clin Genet.* 72, 238-244.
- Singh R.K. and Cooper T.A. (2012) Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. *Trends Mol Med* 18, 472-482.
- Skoko N., Baralle M., Buratti E., and Baralle F.E. (2008) The pathological splicing mutation c.6792C>G in NF1 exon 37 causes a change of tenancy between antagonistic splicing factors. *FEBS Lett.* 582, 2231-2236.
- Slaugenhaupt S.A., Mull J., Leyne M., Cuajungco M.P., Gill S.P., Hims M.M., Quintero F., Axelrod F.B., and Gusella J.F. (2004) Rescue of a human mRNA splicing defect by the plant cytokinin kinetin. *Hum. Mol Genet.* 13, 429-436.
- Slaugenhaupt S.A., Blumenfeld A., Gill S.P., Leyne M., Mull J., Cuajungco M.P., Liebert C.B., Chadwick B., Idelson M., Reznik L., Robbins C., Makalowska I., Brownstein M., Krappmann D., Scheidereit C., Maayan C., Axelrod F.B., and Gusella J.F. (2001) Tissue-specific expression of a splicing mutation in the IKBKAP gene causes familial dysautonomia. *Am J Hum. Genet.* 68, 598-605.
- Smith P.J., Zhang C., Wang J., Chew S.L., Zhang M.Q., and Krainer A.R. (2006) An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum. Mol Genet.* 15, 2490-2508.
- Spurlock G., Knight S.J., Thomas N., Kiehl T.R., Guha A., and Upadhyaya M. (2010) Molecular evolution of a neurofibroma to malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) in an NF1 patient: correlation between histopathological, clinical and molecular findings. *J Cancer Res Clin Oncol.* 136, 1869-1880.
- Stankiewicz P. and Lupski J.R. (2010) Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu. Rev Med* 61, 437-455.

- Stankiewicz P. and Lupski J.R. (2002) Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet.* 18, 74-82.
- Staser K., Yang F.C., and Clapp D.W. (2010) Mast cells and the neurofibroma microenvironment. *Blood* 116, 157-164.
- Steinmann K., Cooper D.N., Kluwe L., Chuzhanova N.A., Senger C., Serra E., Lazaro C., Gilaberte M., Wimmer K., Mautner V.F., and Kehrer-Sawatzki H. (2007) Type 2 NF1 deletions are highly unusual by virtue of the absence of nonallelic homologous recombination hotspots and an apparent preference for female mitotic recombination. *Am J Hum. Genet.* 81, 1201-1220.
- Stephens M. and Donnelly P. (2003) A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum. Genet.* 73, 1162-1169.
- Stephens M., Smith N.J., and Donnelly P. (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum. Genet.* 68, 978-989.
- Terzi Y.K., Sirin B., Hosgor G., Serdaroglu E., Anlar B., Aysun S., and Ayter S. (2012) Two pathogenic NF1 gene mutations identified in DNA from a child with mild phenotype. *Childs Nerv. Syst.* 28, 943-946.
- Tian H. and Kole R. (1995) Selection of novel exon recognition elements from a pool of random sequences. *Mol Cell Biol* 15, 6291-6298.
- Tsui S., Dai T., Roettger S., Schempp W., Salido E.C., and Yen P.H. (2000) Identification of two novel proteins that interact with germ-cell-specific RNA-binding proteins DAZ and DAZL1. *Genomics* 65, 266-273.
- Tucker T., Friedman J.M., Friedrich R.E., Wenzel R., Funsterer C., and Mautner V.F. (2009) Longitudinal study of neurofibromatosis 1 associated plexiform neurofibromas. *J Med Genet.* 46, 81-85.
- Upadhyaya M., Huson S.M., Davies M., Thomas N., Chuzhanova N., Giovannini S., Evans D.G., Howard E., Kerr B., Griffiths S., Consoli C., Side L., Adams D., Pierpont M., Hachen R., Barnicoat A., Li H., Wallace P., Van Biervliet J.P., Stevenson D., Viskochil D., Baralle D., Haan E., Riccardi V., Turnpenny P., Lazaro C., and Messiaen L. (2007) An absence of cutaneous neurofibromas associated with a 3-bp inframe deletion in exon 17 of the NF1 gene (c.2970-2972 delAAT): evidence of a clinically significant NF1 genotype-phenotype correlation. *Am J Hum. Genet.* 80, 140-151.
- Upadhyaya M., Spurlock G., Majounie E., Griffiths S., Forrester N., Baser M., Huson S.M., Gareth E.D., and Ferner R. (2006) The heterogeneous nature of germline mutations in NF1 patients with malignant peripheral nerve sheath tumours (MPNSTs). *Hum. Mutat.* 27, 716.
- Upadhyaya M., Han S., Consoli C., Majounie E., Horan M., Thomas N.S., Potts C., Griffiths S., Ruggieri M., von Deimling A., and Cooper D.N. (2004) Characterization of the somatic mutational spectrum of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene in neurofibromatosis patients with benign and malignant tumors. *Hum. Mutat.* 23, 134-146.

- Valadkhan S. and Jaladat Y. (2010) The spliceosomal proteome: at the heart of the largest cellular ribonucleoprotein machine. *Proteomics*. 10, 4128-4141.
- Valero M.C., Martin Y., Hernandez-Imaz E., Marina H.A., Melean G., Valero A.M., Javier Rodriguez-Alvarez F., Telleria D., and Hernandez-Chico C. (2011) A highly sensitive genetic protocol to detect NF1 mutations. *J Mol Diagn*. 13, 113-122.
- Valero M.C., Pascual-Castroviejo I., Velasco E., Moreno F., and Hernandez-Chico C. (1997) Identification of de novo deletions at the NF1 gene: no preferential paternal origin and phenotypic analysis of patients. *Hum. Genet*. 99, 720-726.
- Valero M.C., Velasco E., Valero A., Moreno F., and Hernandez-Chico C. (1996) Linkage disequilibrium between four intragenic polymorphic microsatellites of the NF1 gene and its implications for genetic counselling. *J Med Genet*. 33, 590-593.
- Valero M.C., Velasco E., Moreno F., and Hernandez-Chico C. (1994) Characterization of four mutations in the neurofibromatosis type 1 gene by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Hum. Mol Genet*. 3, 639-641.
- Vandenbroucke I., Van Oostveldt P., Coene E., De Paepe A., and Messiaen L. (2004a) Neurofibromin is actively transported to the nucleus. *FEBS Lett*. 560, 98-102.
- Vandenbroucke I., van Doorn R., Callens T., Cobben J.M., Starink T.M., and Messiaen L. (2004b) Genetic and clinical mosaicism in a patient with neurofibromatosis type 1. *Hum. Genet*. 114, 284-290.
- Venturin M., Gervasini C., Orzan F., Bentivegna A., Corrado L., Colapietro P., Friso A., Tenconi R., Upadhyaya M., Larizza L., and Riva P. (2004a) Evidence for non-homologous end joining and non-allelic homologous recombination in atypical NF1 microdeletions. *Hum. Genet*. 115, 69-80.
- Venturin M., Guarnieri P., Natacci F., Stabile M., Tenconi R., Clementi M., Hernandez C., Thompson P., Upadhyaya M., Larizza L., and Riva P. (2004b) Mental retardation and cardiovascular malformations in NF1 microdeleted patients point to candidate genes in 17q11.2. *J Med Genet*. 41, 35-41.
- Viskochil D., Cawthon R., O'Connell P., Xu G.F., Stevens J., Culver M., Carey J., and White R. (1991) The gene encoding the oligodendrocyte-myelin glycoprotein is embedded within the neurofibromatosis type 1 gene. *Mol Cell Biol* 11, 906-912.
- Viskochil D., Buchberg A.M., Xu G., Cawthon R.M., Stevens J., Wolff R.K., Culver M., Carey J.C., Copeland N.G., Jenkins N.A., and . (1990) Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell* 62, 187-192.
- Vissers L.E., Bhatt S.S., Janssen I.M., Xia Z., Lalani S.R., Pfundt R., Derwinska K., de Vries B.B., Gilissen C., Hoischen A., Nesteruk M., Wisniewiecka-Kowalnik B., Smyk M., Brunner H.G., Cheung S.W., van Kessel A.G., Veltman J.A., and Stankiewicz P. (2009) Rare pathogenic microdeletions and tandem duplications

- are microhomology-mediated and stimulated by local genomic architecture. *Hum. Mol Genet.* 18, 3579-3593.
- Vogt J., Mussotter T., Bengesser K., Claes K., Hogel J., Chuzhanova N., Fu C., van den E.J., Mautner V.F., Cooper D.N., Messiaen L., and Kehrer-Sawatzki H. (2012) Identification of recurrent type-2 NF1 microdeletions reveals a mitotic nonallelic homologous recombination hotspot underlying a human genomic disorder. *Hum. Mutat.* 33, 1599-1609.
- Voineagu I., Narayanan V., Lobachev K.S., and Mirkin S.M. (2008) Replication stalling at unstable inverted repeats: interplay between DNA hairpins and fork stabilizing proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 105, 9936-9941.
- Wallace M.R., Marchuk D.A., Andersen L.B., Letcher R., Odeh H.M., Saulino A.M., Fountain J.W., Brereton A., Nicholson J., Mitchell A.L., and . (1990) Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* 249, 181-186.
- Wang G. and Vasquez K.M. (2006) Non-B DNA structure-induced genetic instability. *Mutat. Res* 598, 103-119.
- Wang J., Gao Q.S., Wang Y., Lafyatis R., Stamm S., and Andreadis A. (2004) Tau exon 10, whose missplicing causes frontotemporal dementia, is regulated by an intricate interplay of cis elements and trans factors. *J Neurochem.* 88, 1078-1090.
- Wang K.C., Koprivica V., Kim J.A., Sivasankaran R., Guo Y., Neve R.L., and He Z. (2002) Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 417, 941-944.
- Wang Y., Wang J., Gao L., Stamm S., and Andreadis A. (2011) An SRp75/hnRNPG complex interacting with hnRNPE2 regulates the 5' splice site of tau exon 10, whose misregulation causes frontotemporal dementia. *Gene* 485, 130-138.
- Wang Z. and Burge C.B. (2008) Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA.* 14, 802-813.
- Watt S.E., Shores A., and North K.N. (2008) An examination of lexical and sublexical reading skills in children with neurofibromatosis type 1. *Child Neuropsychol.* 14, 401-418.
- Weiming X., Yu Q., Lizhi L., Ponder M., Wallace M., Gangfeng X., and Ponder B. (1992) Molecular analysis of neurofibromatosis type 1 mutations. *Hum. Mutat.* 1, 474-477.
- Wells R.D. (2009) Discovery of the role of non-B DNA structures in mutagenesis and human genomic disorders. *J Biol Chem.* 284, 8997-9009.
- Wells R.D. (2007) Non-B DNA conformations, mutagenesis and disease. *Trends Biochem. Sci* 32, 271-278.

- Welti S., Fraterman S., D'Angelo I., Wilm M., and Scheffzek K. (2007) The sec14 homology module of neurofibromin binds cellular glycerophospholipids: mass spectrometry and structure of a lipid complex. *J Mol Biol* 366, 551-562.
- Wimmer K., Roca X., Beiglbock H., Callens T., Etzler J., Rao A.R., Krainer A.R., Fonatsch C., and Messiaen L. (2007) Extensive in silico analysis of NF1 splicing defects uncovers determinants for splicing outcome upon 5' splice-site disruption. *Hum. Mutat.* 28, 599-612.
- Wimmer K., Yao S., Claes K., Kehrer-Sawatzki H., Tinschert S., De Raedt T., Legius E., Callens T., Beiglbock H., Maertens O., and Messiaen L. (2006) Spectrum of single- and multiexon NF1 copy number changes in a cohort of 1,100 unselected NF1 patients. *Genes Chromosomes. Cancer* 45, 265-276.
- Wimmer K., Eckart M., Stadler P.F., Rehder H., and Fonatsch C. (2000) Three different premature stop codons lead to skipping of exon 7 in neurofibromatosis type I patients. *Hum. Mutat.* 16, 90-91.
- Wirth B. (2002) Spinal muscular atrophy: state-of-the-art and therapeutic perspectives. *Amyotroph. Lateral. Scler. Other Motor Neuron Disord.* 3, 87-95.
- Wu B.L., Austin M.A., Schneider G.H., Boles R.G., and Korf B.R. (1995) Deletion of the entire NF1 gene detected by the FISH: four deletion patients associated with severe manifestations. *Am J Med Genet.* 59, 528-535.
- Xu G.F., Nelson L., O'Connell P., and White R. (1991) An Alu polymorphism intragenic to the neurofibromatosis type 1 gene (NF1). *Nucleic Acids Res* 19, 3764.
- Xu G.F., O'Connell P., Viskochil D., Cawthon R., Robertson M., Culver M., Dunn D., Stevens J., Gesteland R., White R., and . (1990) The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* 62, 599-608.
- Yang F.C., Ingram D.A., Chen S., Zhu Y., Yuan J., Li X., Yang X., Knowles S., Horn W., Li Y., Zhang S., Yang Y., Vakili S.T., Yu M., Burns D., Robertson K., Hutchins G., Parada L.F., and Clapp D.W. (2008) Nf1-dependent tumors require a microenvironment containing Nf1+/- and c-kit-dependent bone marrow. *Cell* 135, 437-448.
- Yang F.C., Ingram D.A., Chen S., Hingtgen C.M., Ratner N., Monk K.R., Clegg T., White H., Mead L., Wenning M.J., Williams D.A., Kapur R., Atkinson S.J., and Clapp D.W. (2003) Neurofibromin-deficient Schwann cells secrete a potent migratory stimulus for Nf1+/- mast cells. *J Clin Invest* 112, 1851-1861.
- Yeo G. and Burge C.B. (2004) Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput. Biol* 11, 377-394.
- Zatkova A., Messiaen L., Vandenbroucke I., Wieser R., Fonatsch C., Krainer A.R., and Wimmer K. (2004) Disruption of exonic splicing enhancer elements is the principal cause of exon skipping associated with seven nonsense or missense alleles of NF1. *Hum. Mutat.* 24, 491-501.

- Zhao J., Bacolla A., Wang G., and Vasquez K.M. (2010) Non-B DNA structure-induced genetic instability and evolution. *Cell Mol Life Sci* 67, 43-62.
- Zheng J., Khil P.P., Camerini-Otero R.D., and Przytycka T.M. (2010) Detecting sequence polymorphisms associated with meiotic recombination hotspots in the human genome. *Genome Biol* 11, R103.
- Zhu Y., Ghosh P., Charnay P., Burns D.K., and Parada L.F. (2002) Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. *Science* 296, 920-922.
- Zickler A.M., Hampp S., Messiaen L., Bengesser K., Mussotter T., Roehl A.C., Wimmer K., Mautner V.F., Kluwe L., Upadhyaya M., Pasmant E., Chuzhanova N., Kestler H.A., Hogel J., Legius E., Claes K., Cooper D.N., and Kehrer-Sawatzki H. (2012) Characterization of the nonallelic homologous recombination hotspot PRS3 associated with type-3 NF1 deletions. *Hum. Mutat.* 33, 372-383.
- Zoller M., Rembeck B., Akesson H.O., and Angervall L. (1995) Life expectancy, mortality and prognostic factors in neurofibromatosis type 1. A twelve-year follow-up of an epidemiological study in Goteborg, Sweden. *Acta Derm. Venereol.* 75, 136-140.

Artículos

I. Artículos firmados por la doctoranda, directamente relacionados con este trabajo de Tesis:

Hernández-Imaz E., Campos B., Rodríguez-Álvarez F.J., Abad O., Melean G., Gardenyes J., Martín Y., and Hernández-Chico C. (2013) Characterization of NF1 allele containing two nonsense mutations in exon 37 that segregates with neurofibromatosis type 1. *Clin Genet.* 83, 462-466.

Valero M.C., Martín Y., **Hernández-Imaz E.**, Marina H.A., Melean G., Valero A.M., Javier Rodríguez-Álvarez F., Tellería D., and Hernández-Chico C. (2011) A highly sensitive genetic protocol to detect NF1 mutations. *J Mol Diagn.* 13, 113-122.

II. Otros artículos firmados por la doctoranda, no directamente relacionados con este trabajo de Tesis.

Melean G., Velasco A., **Hernández-Imaz E.**, Rodríguez-Álvarez F.J., Martín Y., Valero A., and Hernández-Chico C. (2012) RNA-based analysis of two SMARCB1 mutations associated with familial schwannomatosis with meningiomas. *Neurogenetics.* 13, 267-274.

Melean G., Hernández A.M., Valero M.C., **Hernández-Imaz E.**, Martín Y., and Hernández-Chico C. (2010) Monozygotic twins with Neurofibromatosis type 1, concordant phenotype and synchronous development of MPNST and metastasis. *BMC Cancer* 10, 407.