

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**



**DESARROLLO DE TERAPIAS ESPECÍFICAS
DE MUTACIÓN EN ENFERMEDADES
METABÓLICAS HEREDITARIAS**

Patricia Yuste Checa

TESIS DOCTORAL

Madrid, 2015

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**



**DESARROLLO DE TERAPIAS ESPECÍFICAS
DE MUTACIÓN EN ENFERMEDADES
METABÓLICAS HEREDITARIAS**

**Directora de Tesis:
Dra. Belén Pérez González**

**Memoria presentada por la licenciada Patricia Yuste Checa para optar al
grado de Doctor en Biología Molecular**

Índice

RESUMEN/SUMMARY	1/3
ABREVIATURAS	5
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. ENFERMEDADES METABÓLICAS HEREDITARIAS (EMH)	9
1.2. EPILEPSIA DEPENDIENTE DE PIRIDOXINA (PDE)	10
1.3. DEFECTOS CONGÉNITOS DE GLICOSILACIÓN (CDGs)	13
1.3.1. Defecto congénito de glicosilación causado por deficiencia en la enzima Fosfomanomutasa 2 (PMM2-CDG)	19
1.3.2. Defecto congénito de glicosilación causado por deficiencia de TMEM165 (TMEM165-CDG)	22
1.4. TERAPIAS ESPECÍFICAS DE MUTACIÓN	23
1.4.1. Terapia de recuperación de mutaciones de <i>splicing</i>	24
1.4.2. Terapia de recuperación de mutantes de plegamiento	27
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	37
3.1.1 Cultivos primarios	37
3.1.2. Líneas establecidas	37
3.1.3. Cepas bacterianas	37
3.1.4. Vectores	38
3.2. MÉTODOS	38
3.2.1. Aislamiento de ácidos nucleicos	38
3.2.2. Amplificación de DNA	39
3.2.2.1. Amplificación de DNA genómico (gDNA)	39
3.2.2.2. Amplificación de DNA codificante (cDNA)	39
3.2.2.2.1 RT-PCR	39
3.2.2.2.2 qRT-PCR	40
3.2.3. Purificación de fragmentos de DNA	40
3.2.4. Secuenciación de DNA	40
3.2.5. Mutagénesis dirigida	40
3.2.6. Clonaje y transformación bacteriana	42

3.2.7. Cultivo celular	43
3.2.8. Infección con lentivirus	43
3.2.9. Transfección	43
3.2.10. Medida de citotoxicidad	44
3.2.11. Cuantificación de la cantidad de proteína	44
3.2.12. Separación electroforética de proteínas en geles SDS-PAGE	44
3.2.13. Tinción de geles SDS-PAGE con azul de Coomassie	45
3.2.14. Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas	45
3.2.15. Aislamiento de mitocondrias	46
3.2.16. Inmunofluorescencia	46
3.2.17. Expresión de la proteína PMM2 en un sistema procariota	47
3.2.18. Purificación de la proteína PMM2	47
3.2.19. Medida de actividad de PMM2	47
3.2.20. <i>Differential scanning fluorimetry</i> (DSF)	48
3.2.21. Síntesis <i>in vitro</i> de la proteína PMM2 y estudio del perfil de degradación	49
3.2.22. Soporte informático y análisis <i>in silico</i>	49
4. RESULTADOS	53
4.1. CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES DE <i>SPLICING</i>	55
4.1.1. Estudio funcional de una mutación exónica detectada en el gen <i>ALDH7A1</i>	55
4.1.2. Estudio funcional de una mutación intrónica interna detectada en el gen <i>TMEM165</i>	57
4.2. APROXIMACIÓN TERAPÉUTICA PARA MUTACIONES DE <i>SPLICING</i>. APLICACIÓN DE UNA TERAPIA ESPECÍFICA CON OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO	59
4.2.1. Aplicación de una terapia antisentido sobre una mutación exónica detectada en el gen <i>ALDH7A1</i>	59
4.2.2. Aplicación de una terapia antisentido sobre una mutación intrónica interna detectada en el gen <i>TMEM165</i>	60
4.3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MUTACIONES <i>MISSENSE</i> DETECTADAS EN EL GEN <i>PMM2</i> CAUSANTES DE <i>PMM2</i>-CDG	63
4.3.1. Análisis funcional de mutantes de <i>PMM2</i> en un sistema procariota	63
4.3.1.1. Estudio del perfil de oligomerización de los mutantes de <i>PMM2</i>	63
4.3.1.2. Estudio del efecto de las mutaciones sobre la actividad de <i>PMM2</i>	65
4.3.1.3. Estudio de la estabilidad térmica de los mutantes de <i>PMM2</i> mediante <i>differential scanning fluorimetry</i> (DSF)	66

4.3.1.4. Estudio del perfil de degradación de los mutantes de PMM2	67
4.3.2. Estudio de la actividad y cantidad de proteína de PMM2 en un modelo celular de enfermedad en condiciones permisivas de plegamiento	68
4.3.3. Estudios <i>in silico</i> de mutaciones <i>missense</i> detectadas en PMM2	69
4.3.3.1. Predicción del efecto de las mutaciones <i>missense</i> sobre la estabilidad de PMM2 mediante el algoritmo computacional FoldX	69
4.3.3.2. Análisis estructural de las mutaciones <i>missense</i> detectadas en PMM2	70
4.4. APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS EN PMM2-CDG ENFOCADAS A LA ESTABILIZACIÓN DE MUTANTES	73
4.4.1. Búsqueda de chaperonas farmacológicas (PCs) para PMM2-CDG y evaluación de su efecto	73
4.4.1.1 Rastreo de una librería de chaperonas farmacológicas	73
4.4.1.2. Análisis del efecto de los compuestos seleccionados sobre la estabilidad y actividad de PMM2 en un sistema procariota	74
4.4.1.2.1. Efecto de los compuestos sobre la actividad de PMM2 WT	74
4.4.1.2.2. Efecto de los compuestos sobre la estabilidad de PMM2 WT mediante DSF	78
4.4.1.2.3. Estudio del efecto de los compuestos sobre la estabilidad de los mutantes de PMM2 mediante DSF	80
4.4.1.2.4. Estudio del efecto de los compuestos sobre la estabilidad de PMM2 WT y mutantes mediante el análisis de su perfil de degradación	83
4.4.1.3. Análisis del efecto de los compuestos seleccionados sobre la actividad de PMM2 WT y mutantes en un modelo celular de enfermedad	86
4.4.2. Evaluación del efecto de reguladores de la proteostasis (PRs) sobre la actividad de PMM2	88
4.4.2.1. Análisis del efecto de los PRs sobre la actividad de mutantes de PMM2 en un modelo celular de enfermedad	88
5. DISCUSIÓN	91
5.1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MUTACIONES QUE AFECTAN AL PROCESO DE <i>SPLICING</i> Y TERAPIA ESPECÍFICA CON OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO	93
5.2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MUTACIONES <i>MISSENSE</i> DETECTADAS EN EL GEN <i>PMM2</i> Y TERAPIAS ENFOCADAS A LA ESTABILIZACIÓN DE MUTANTES	97

6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	109
------------------------------------	------------

7. BIBLIOGRAFÍA	115
------------------------	------------

8. PUBLICACIONES	145
-------------------------	------------

La caracterización funcional específica de mutaciones causantes de enfermedad guía el desarrollo de estrategias terapéuticas. En este trabajo hemos analizado funcionalmente mutaciones que afectan al proceso de *splicing* y mutaciones *missense* con el fin de desarrollar terapias específicas dirigidas a rescatar transcritos aberrantes y mutaciones desestabilizadoras.

En primer lugar, mediante el análisis del perfil transcripcional de células derivadas de pacientes hemos caracterizado una mutación exónica y otra intrónica interna que afectan ambas al proceso de *splicing*. La mutación exónica (c.75C>T), detectada en el gen *ALDH7A1*, genera un nuevo sitio donador de *splicing* provocando la delección de 35pb del exón 1 causando epilepsia dependiente de piridoxina (PDE). La mutación intrónica interna (c.792+182G>A), identificada en el gen *TMEM165* activa la inserción de un pseudoexón de 117pb procedentes del intrón 4 causando el defecto congénito de glicosilación TMEM165-CDG. El efecto de estas dos mutaciones sobre el proceso de *splicing* ha sido confirmado mediante el uso de un sistema *ex vivo* de minigenes. Por otra parte, con el fin de caracterizar funcionalmente mutaciones *missense* identificadas en pacientes con CDG causado por deficiencia de la enzima PMM2 (PMM2-CDG), hemos estudiado el perfil de oligomerización, la actividad y la estabilidad de estos mutantes en un sistema de expresión procariota. Los resultados *in vitro* combinados con análisis *in silico* mediante el algoritmo computacional FoldX y la localización de los residuos en un modelo estructural de la proteína PMM2, nos ha permitido la clasificación de los nueve mutantes estudiados en tres categorías: mutaciones que afectan al plegamiento (p.V44A, p.D65Y, p.R162W, p.T237M, p.F207S y p.C241S), que retienen cierta actividad residual, mutaciones que afectan al plegamiento y a las propiedades catalíticas de la proteína (p.R123Q y p.R141H), las cuales tienen actividad nula, y una mutación que afecta a la dimerización de PMM2 (p.P113L). Además, ha sido posible la recuperación de la actividad de algunos de los mutantes inestables en un modelo celular de enfermedad en condiciones permisivas de plegamiento. Todos estos resultados sugieren que la pérdida de función de la mayoría de los mutantes estudiados está basada en su inestabilidad y por lo tanto en su tendencia a agregar o a ser degradados, mecanismo subyacente en las denominadas enfermedades conformacionales.

Basándonos en estos resultados, el siguiente paso ha sido la búsqueda de terapias dirigidas a rescatar los defectos de *splicing* y los mutantes inestables caracterizados previamente. Respecto a las mutaciones de *splicing*, hemos conseguido una recuperación del perfil transcripcional y de la proteína correctamente localizada de manera secuencial y dosis específica, tras el tratamiento con oligonucleótidos antisentido que modulan el *splicing* de células de pacientes PDE y TMEM165-CDG portadoras de las mutaciones c.75C>T y c.792+182G>A respectivamente. El éxito de la terapia antisentido aplicada sobre una mutación exónica, constituye una prueba de concepto que amplía su posible uso más allá de mutaciones intrónicas internas. Respecto a la terapia de recuperación de mutantes inestables, el rastreo de una librería comercial de compuestos nos ha permitido identificar quince potenciales chaperonas farmacológicas (PCs) que estabilizan la proteína PMM2. Estos compuestos han sido evaluados posteriormente en un sistema de expresión procariota y algunos de ellos han sido capaces de aumentar significativamente la actividad de la proteína WT y la estabilidad, tanto de la PMM2 WT como de los mutantes de plegamiento. Además, cuatro compuestos han conseguido rescatar la actividad de dos mutantes inestables, p.R162W y p.T237M, en un modelo celular de enfermedad. Al mismo tiempo, hemos identificado un regulador de la proteostasis (PR), celastrol, que también ha sido capaz de incrementar la actividad de mutantes inestables de PMM2 en el mismo modelo celular. Así, el celastrol podría ser aplicado conjuntamente con PCs con el fin de aumentar de manera sinérgica la estabilidad de los mutantes y por tanto su actividad. Estos resultados constituyen una prueba de concepto sobre el posible uso de fármacos estabilizadores que recuperen la actividad de PMM2 y establece las bases para el desarrollo de una nueva terapia para PMM2-CDG, el CDG más común y actualmente sin tratamiento.

En resumen, el éxito de las aproximaciones terapéuticas descrito en este trabajo para PDE, TMEM165-CDG y PMM2-CDG, abre nuevas perspectivas para el tratamiento de enfermedades raras al demostrar la eficacia de terapias basadas en el mecanismo de acción de las mutaciones.

Functional characterization of disease causing mutations guides the development of tailored therapeutic strategies. In this work we have analyzed functionally mutations affecting the splicing process and also missense mutations to address the development of mutation specific therapies aimed to rescue aberrant mRNA transcripts or unstable mutant proteins.

Firstly, we have characterized one exonic and one deep intronic mutation, both affecting the splicing process, by analyzing the transcriptional profile of patients-derived cells. The exonic mutation (c.75C>T), detected in *ALDH7A1*, generates a new exonic donor splice site generating an aberrant transcript bearing a deletion of 35 nucleotides causing piridoxine-dependent epilepsy (PDE). The deep intronic mutation (c.792+182G>A), identified in *TMEM165* activates an intronic pseudoexon insertion of 117 nucleotides causing a congenital disorder of glycosylation (TMEM165-CDG). The effect of these two mutations on the splicing process has also been confirmed using an *ex vivo* minigene system. Secondly, in order to characterize functionally missense mutations identified in CDG due to *PMM2* deficiency (PMM2-CDG), we have studied mutants' oligomerization profile, *PMM2* activity and stability in a prokaryotic expression system. The *in vitro* results combined with the *in silico* analysis by the FoldX algorithm and the residue location in a *PMM2* protein structure model allowed us to classify the nine studied mutants into three categories: destabilizing mutations (p.V44A, p.D65Y, p.R162W, p.T237M, p.F207S and p.C241S) which retain some residual activity, mutations affecting both folding and catalytic properties of the protein (p.R123Q and p.R141H) which retain null residual activity, and one mutation affecting *PMM2* dimerization (p.P113L). Additionally, we have rescued *PMM2* residual activity in a disease cellular model using permissive folding conditions. These results suggest that the loss-of-function of most of these mutant proteins is based on increased susceptibility to degradation and/or aggregation, a common mechanism underlying conformational diseases.

Based on these results we have sought specific therapies to rescue splicing defects and unstable mutant proteins. Regarding the splicing mutations, we have been able to recover in dose and sequence specific manner the correct transcriptional profile and the proper proteins' location by applying splice-switching oligonucleotides to PDE and TMEM165-CDG patient derived cells carrying c.75C>T and c.792+182G>A mutations respectively. The success of the exonic mutation therapy is a proof-of-concept which broadens the application of antisense therapy beyond deep intronic mutations. With respect to the therapy to recover the activity of unstable mutant proteins, a high-throughput screening of a commercial compounds library has allowed us to find fifteen potential pharmacological chaperones (PCs) for *PMM2*. These hits have been subsequently evaluated in a prokaryotic system and some of them have increased significantly WT *PMM2* activity and also WT and mutants' stability. Furthermore, four of them have rescued *PMM2* activity in a cellular disease model carrying either the destabilizing mutation p.R162W or p.T237M. In addition, we have identified a proteostasis regulator (PR), celastrol, which has also increased mutants' activity in the same eukaryotic system. The PR could be co-applied with PCs in order to increase mutants' stability and subsequently residual activity in a synergistic manner. These results are a proof-of-concept of the *PMM2*-CDG treatment by small stabilizer molecules and pave the way to develop a new promising therapy for *PMM2*-CDG, the most common CDG for which, up to date, there is no curative treatment available.

In conclusion, the success of the therapeutic approaches on PDE, TMEM165-CDG and *PMM2*-CDG described in this work shed some light on novel treatments for other rare diseases by specific mutation therapies aimed at mRNA or protein targets.

2'-O-MOE:	Oligonucleótidos antisentido con sustitución 2'-O-metoxietil en el azúcar
α-AAA:	Ácido α-aminoadípico
α-AASA:	α-aminoadípico semialdehído
ALDH7A1:	Gen de la α-aminoadípico semialdehído deshidrogenasa
AO:	Oligonucleótido antisentido (<i>Antisense oligonucleotide</i>)
APOC3:	Apolipoproteína C-III
AST:	<i>Analyzer Splice Tool</i>
ATQ:	Antiquitina o α-aminoadípico semialdehído deshidrogenasa
BDGP:	<i>Berkeley Drosophila Genome Project</i>
BSA:	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
CBX:	Carbenoxolona
CDG:	Defecto congénito de glicosilación (<i>Congenital disorder of glycosylation</i>)
CFTR:	Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>)
CMP:	Citosín monofosfato
CMS:	Síndrome miasténico congénito (<i>Congenital myasthenic syndrome</i>)
DAPI:	4',6-diamino-2-fenilindol
DMD:	Distrofia muscular de Duchenne
DMSO:	Dimetil sulfóxido
Dol:	Dolicol
DSF:	<i>Differential scanning fluorimetry</i>
DTT:	1,4-ditio-L-treitol
EDTA:	Ácido etilen diamino tetraacético
EMH:	Enfermedades metabólicas hereditarias
FBS:	Suero fetal bovino (<i>Fetal bovine serum</i>)
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i>
Fuc:	Fucosa
GABA:	γ-aminobutirato
Gal:	Galactosa
GAPDH:	Gliceraldehído-fosfato deshidrogenasa
GDP:	Guanosín difosfato
Glc:	Glucosa
GlcNAc:	N-acetilglucosamina
GM130:	Proteína de la matriz de <i>cis</i> -Golgi de 130KDa (<i>130 KDa Cis-Golgi Matrix Protein</i>)
GPI:	glicosilfosfatidilinositol
GST:	Glutación sulfhidrilo transferasa
HEPES:	Ácido N-2-hibrixietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
HGMD:	<i>Human gene mutation database</i>
HSR:	Respuesta de choque térmico (<i>Heat shock response</i>)
LLO:	Oligosacárido estándar (<i>Lipid Link Oligosacharide</i>)
Man:	Manosa
MEM:	Medio mínimo esencial de Eagle
MPI:	Fosfomanoisomerasa (<i>Phosphomannose isomerase</i>)
NMD:	mecanismo de decaimiento del mRNA (<i>Nonsense mediated mRNA decay</i>)
OligodT:	Oligo de deoxitimidinas
P6C:	Δ1-piperidín-6-carboxilato
pb:	Par de bases
PBS:	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PC:	Chaperona farmacológica (<i>Pharmacological chaperone</i>)
PDB:	Banco de datos de proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
PDE:	Epilepsia dependiente de piridoxina (<i>Pyridoxine-dependent epilepsy</i>)
PLP:	Piridoxal-fosfato
PMM:	Fosfomanomutasa humana (<i>Phosphomannomutase</i>)

ABREVIATURAS

Pmm:	Fosfomanomutasa de ratón
PMO:	Oligonucleótido antisentido tipo morfolino
PR:	Regulador de la proteostasis (<i>Proteostasis regulator</i>)
PS:	Unión fosforotioato
RE:	Retículo endoplasmático
SDS:	Dodecilsulfato sódico (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
Sia:	Ácido siálico
SMA:	Atrofia muscular espinal (<i>Spinal muscular atrophy</i>)
SNC:	Sistema nervioso central
snRNP:	Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (<i>Small nuclear ribonucleoproteins</i>)
SPR:	Sepiapterina reductasa
SSO:	Oligonucleóticos antisentido que modifican el <i>splicing</i> (<i>Splice switching oligonucleotides</i>)
Tm:	Temperatura de <i>melting</i>
TMEM165:	Proteína transmembrana 165 (<i>Transmembrane protein 165</i>)
TNT:	Sistema transcripción-traducción acoplada
UDP:	Uridín difosfato
UPR:	Respuesta a proteínas mal plegadas (<i>Unfolded protein response</i>)
WT:	Salvaje o normal (<i>Wild type</i>)

Algunos términos ingleses ampliamente utilizados en biología molecular y sin clara traducción en castellano se muestran en cursiva.

1. Introducción

1.1. ENFERMEDADES METABÓLICAS HEREDITARIAS (EMH)

Las enfermedades metabólicas hereditarias (EMH) se definen como alteraciones bioquímicas de origen genético causadas por un defecto concreto en la estructura y función de una proteína. El estudio de estas enfermedades fue iniciado por Archibald Garrod (1857-1936) con sus estudios sobre la alcaptonuria y acuñando el término de Errores Congénitos del Metabolismo, definiéndolos como enfermedades producidas por el fallo o ausencia de una enzima que cataliza un paso específico de una ruta metabólica (Garrod, 1909).

En la mayoría de los casos, como definió Garrod, la proteína afectada es una enzima, y su defecto provoca el bloqueo de una ruta metabólica que puede resultar en la acumulación de metabolitos previos al bloqueo, intermediarios tóxicos derivados de rutas alternativas, deficiencias en la síntesis de productos relevantes o una combinación de todos estos problemas. Pero existen múltiples ejemplos en los que la proteína afectada no es una enzima, como es el caso de algunos defectos de glicosilación causados por deficiencias en el complejo COG, la adenoleucodistrofia ligada al cromosoma X causada por deficiencia en un transportador o la enfermedad de Niemann Pick tipo C, causada por deficiencia en una proteasa, entre otros (Pampols, 2010).

Hasta la fecha se han descrito alrededor de 700 EMH (Pampols, 2010) que individualmente son consideradas enfermedades raras, en la Unión Europea definidas como aquellas que afectan a menos de 1 individuo por cada 2.000 (*European Organisation of Rare Diseases, EURORDIS*), pero en conjunto, se ha estimado una incidencia de alrededor de 1/800 (Sanderson *et al.*, 2006). Debido al gran número de enfermedades descritas dentro de las EMH, son un grupo de enfermedades genéticas muy heterogéneo, caracterizadas por una gran variedad de presentaciones clínicas, con una importante presencia de síndromes neurológicos y causante de una tasa significativa de morbilidad y mortalidad, principalmente durante la infancia.

La mayoría de las EMH son monogénicas, el 67% se heredan de manera autosómica recesiva, el 21% de manera dominante, mientras que un 6% presentan herencia ligada al cromosoma X. Existe otro 6% ligado a herencia mitocondrial (Pampols, 2010). Recientemente, se han descrito pacientes con evidencias clínicas de defectos en el metabolismo energético, portadores de mutaciones en heterocigosis en diferentes genes implicados funcionalmente en estas vías. Estas mutaciones, de manera aislada no tendrían relevancia clínica, pero juntas parecen presentar un efecto sinérgico, lo que los autores denominan heterocigosidad sinérgica o herencia digenética. Este modelo podría ser útil para el entendimiento de algunos fenotipos complejos no diagnosticados (Vockley, 2008).

A pesar de que las EMH son enfermedades con elevada penetrancia, hay que tener en cuenta la gran heterogeneidad alélica e incluso la heterogeneidad de locus descrita para enfermedades

individuales. Esta heterogeneidad genética genera una gran variabilidad en la expresión clínica y bioquímica de cada enfermedad. Además, en el caso de las EMH autosómicas recesivas, la mayoría de los pacientes son heterocigotos compuestos, es decir, portadores de dos alelos mutantes diferentes, lo que complica aún más la determinación de la relación genotipo-fenotipo. Adicionalmente, hay que tener en cuenta que otros factores pueden estar influyendo en el fenotipo, como son, factores ambientales, las condiciones celulares, las variaciones genéticas en genes del sistema del control de calidad de las proteínas (en el caso de mutantes de plegamiento) (Gregersen *et al.*, 2001), el mecanismo de decaimiento del mRNA (NMD, *nonsense mediated mRNA decay*, en el caso de mutaciones que generan codones prematuros de terminación) (Khajavi *et al.*, 2006), o la epigenética, por lo que estas enfermedades se comportan, a menudo, como caracteres complejos (Pampols, 2010).

Los mecanismos patológicos implicados en las EMH son muy amplios y variados, por lo que es muy importante el conocimiento específico de la fisiopatología de cada enfermedad de manera individual para encontrar terapias adecuadas. Se estima que alrededor del 12% de la EMH son tratadas con éxito, en un 45% se obtienen beneficios parciales del tratamiento y en un 34% no hay respuesta al mismo (Pampols, 2010).

Desde un punto de vista fisiopatológico, las EMH pueden clasificarse en tres grupos, trastornos que dan lugar a intoxicación, trastornos que afectan al metabolismo energético y trastornos que afectan a moléculas complejas (Saudubray *et al.*, 2006). El primer grupo, abarca defectos hereditarios del metabolismo intermediario que conducen a intoxicación aguda o progresiva por la acumulación de sustancias tóxicas próximas al bloqueo metabólico y se presentan con un intervalo libre de síntomas y con signos clínicos de “intoxicación” que pueden ser agudos o crónicos. A este grupo pertenece la epilepsia dependiente de piridoxina debida a defectos en el gen *ALDH7A1* (PDE, *pyridoxine-dependent epilepsy*) descrita en este trabajo. El último grupo, trastornos que afectan a moléculas complejas, se caracteriza por síntomas permanentes, progresivos, independientes de acontecimientos intercurrentes y no relacionados con la ingesta de alimentos y a él pertenecen los defectos congénitos de glicosilación (CDGs, *congenital disorders of glycosylation*), dos de los cuales se centra gran parte de este trabajo.

1.2. EPILEPSIA DEPENDIENTE DE PIRIDOXINA (PDE)

La epilepsia dependiente de piridoxina (PDE; OMIM 266100) es una enfermedad autosómica recesiva asociada con crisis neonatales o infantiles tempranas severas que no responden al tratamiento con antiepilépticos convencionales, pero que pueden ser controladas farmacológicamente con piridoxina (vitamina B6). Fue descrita por primera vez en 1954 (Hunt *et al.*, 1954) en un bebé resistente a la terapia convencional para las crisis pero que respondió a un cóctel de vitaminas que contenía

vitamina B6. Hasta el momento, se han descrito cinco defectos monogénicos que cursan con crisis que responden a piridoxina o a sus derivados vitamínicos, la epilepsia dependiente de piridoxal-fosfato (OMIM 610090), causada por mutaciones en el gen que codifica para la piridoxamina-fosfato oxidasa (*PNPO*; OMIM 603287), la deficiencia de la fosfatasa alcalina no específica de tejido (*TNSALP*; OMIM 171760), la hiperprolinemia tipo II (OMIM 239510) causada por mutaciones en el gen que codifica para la Δ 1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa (*P5CD*; OMIM 606811), el síndrome de Mabry (OMIM 239300) causado por mutaciones en el gen que codifica para la *phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class V* (*PIGV*; OMIM 610274) y por último, la PDE causada por mutaciones en el gen que codifica para la α -aminoadípico semialdehído deshidrogenasa (*ALDH7A1*; OMIM 107323). Esta última es la más frecuente, aunque su incidencia exacta se desconoce, variando entre 1/20.000 (Ebinger *et al.*, 1999) y 1/700.000 (Baxter, 1999).

Pasaron 52 años desde que se describió el primer caso de PDE (Hunt *et al.*, 1954), hasta que se identificó el gen responsable, *ALDH7A1*, localizado en cromosoma 5, en la región q23.2 (Mills *et al.*, 2006). Hasta el momento se han descrito 97 mutaciones en este gen, un 51,3 % son mutaciones *missense*, un 9,3 % son mutaciones *nonsense*, un 20,6 % afectan al proceso de *splicing*, y el resto son pequeñas inserciones y deleciones o grandes reordenamientos (Stenson *et al.*, 2014) (*HGMD® professional release 2014.3*). Seis de las 97 mutaciones descritas en el gen *ALDH7A1*, han sido reportadas en pacientes con la llamada epilepsia dependiente de ácido fólico, enfermedad que ha resultado ser genéticamente idéntica a la epilepsia dependiente de piridoxina (Gallagher *et al.*, 2009).

El gen *ALDH7A1* presenta 18 exones y codifica para una proteína denominada α -aminoadípico semialdehído deshidrogenasa o antiquitina (ATQ), cuyo nombre le fue dado debido a su aparente origen antiguo, ya que comparte una gran homología, 60%, con su ortólogo en plantas (Vasiliou y Nebert, 2005). La forma funcional de la proteína es un tetrámero, y cada monómero presenta tres dominios, de unión a NAD⁺, de catálisis y de oligomerización. Está localizada en el citosol, en la mitocondria (Wong *et al.*, 2010) y recientemente se ha descrito su presencia en el núcleo (Brocker *et al.*, 2010; Chan *et al.*, 2011). ATQ es una adheído deshidrogenasa implicada en el catabolismo de la lisina por la vía del ácido piperídico (Figura 1). Éste ácido es convertido en Δ 1-piperidín-6-carboxilato (P6C), el cual se encuentra en equilibrio químico con su forma lineal, el α -aminoadípico semialdehído (α -AASA). ATQ es la encargada de convertir el α -AASA en el ácido α -aminoadípico (α -AAA), que finalmente se convertirá en Acetil-CoA (Mills *et al.*, 2006; Stockler *et al.*, 2011) (Figura 1). Además de intervenir en el metabolismo de la lisina, se ha descrito también su implicación en la defensa contra el estrés hiperosmótico y el estrés oxidativo (Brocker *et al.*, 2010), su posible relación con la progresión del ciclo celular (Chan *et al.*, 2011) y con el desarrollo normal del cerebro, la neurogénesis y la migración celular (Jansen *et al.*, 2014).

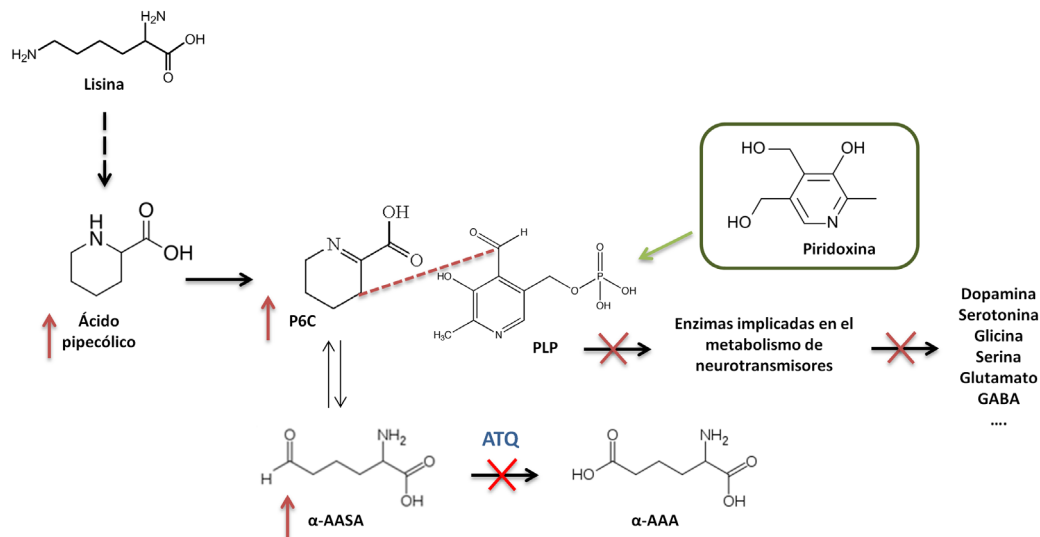


Figura 1. Catabolismo del ácido pipercolico, fisiopatología bioquímica de la deficiencia de ATQ y tratamiento actual. Reacciones detalladas en el texto. La deficiencia de la enzima Antiquitina (ATQ) provoca el aumento de α-AASA, P6C y ácido pipercolico (flechas rojas). El aumento de P6C provoca un aumento de la probabilidad de reaccionar espontáneamente con piridoxal-fosfato (PLP) (línea roja discontinua), lo que hace disminuir la cantidad de éste libre y deja de estar disponible como cofactor. El tratamiento con piridoxina hace aumentar la cantidad de PLP libre (verde) aliviando los síntomas producidos por el aumento de P6C.

La fisiopatología de la enfermedad viene dada por diferentes componentes, la acumulación en estos pacientes de α-AASA y P6C, la deficiencia de piridoxal-fosfato (PLP) debida a esta acumulación, la acumulación de ácido pipercolico y la deficiencia enzimática por su posible implicación en otras funciones. La acumulación de P6C, metabolito altamente reactivo, aumenta la probabilidad de reaccionar de manera espontánea con PLP, formándose el complejo P6C-PLP, reduciendo de esta manera el PLP libre (Mills *et al.*, 2006). PLP es el cofactor de aproximadamente 100 enzimas, incluyendo muchas implicadas en la síntesis o catabolismo de neurotransmisores como dopamina, serotonina, glicina, D-serina, glutamato, γ-aminobutirato (GABA) e histamina (Clayton, 2006). Por otra parte, la acumulación de α-AASA también puede jugar un papel patogénico debido a su alta reactividad, así como la acumulación del complejo P6C-PLP, del cual se desconoce el destino y probablemente sea altamente tóxico (Stockler *et al.*, 2011). Además, hay que tener en cuenta que el ácido pipercolico es un modulador de GABA (Gutierrez y Delgado-Coello, 1989) y por lo tanto, su acumulación también contribuye potencialmente a las crisis. Por último, el impacto de la deficiencia de la enzima sobre otras funciones y otros sustratos diferentes a α-AASA debe ser elucidada, pero probablemente también esté contribuyendo a la fisiopatología de la enfermedad.

La acumulación de estos metabolitos es usada para el diagnóstico de la PDE, principalmente niveles elevados de α-AASA/P6C presentes en orina, plasma y líquido cefalorraquídeo y niveles elevados de ácido pipercolico en plasma y líquido cefalorraquídeo (Stockler *et al.*, 2011).

El tratamiento estándar para la PDE es el suplemento de piridoxina en dosis farmacológicas

durante toda la vida. Aunque los pacientes responden a la administración de piridoxina, y a menudo permanecen libres de crisis, la mayoría de los niños con PDE presentan déficit cognitivo. Además, el suplemento con piridoxina no afecta a la acumulación de α -AASA y P6C (Mills *et al.*, 2006; Perez *et al.*, 2013; Stockler *et al.*, 2011). Actualmente se están estudiando otras terapias alternativas, con el fin de disminuir la acumulación de estos metabolitos tóxicos. Recientemente se ha publicado un estudio observacional de pacientes sometidos a una dieta restringida en lisina (van Karnebeek *et al.*, 2012) y otro estudio de un paciente suplementado con L-arginina, con el fin de disminuir el transporte de lisina, ya que lisina y arginina comparten el mismo transportador en el sistema nervioso central (SNC) (Mercimek-Mahmutoglu *et al.*, 2014).

1.3. DEFECTOS CONGÉNITOS DE GLICOSILACIÓN (CDGs)

Los defectos congénitos de glicosilación (CDGs) son enfermedades metabólicas hereditarias causadas por defectos en la biosíntesis de glicoconjugados. La glicosilación es la síntesis de glicanos, y su posterior adición enzimática a proteínas o lípidos, generando de esta manera glicoconjugados (Jaeken, 2003). Los dos tipos principales de glicosilación de proteínas son la N-, y la O-glicosilación. La N-glicosilación es la unión covalente del glicano, siendo N-acetilglucosamina (GlcNAc) el amino azúcar implicado en la unión, a un residuo de asparragina de la secuencias consenso Asn-X-Ser/Thr de la proteína en formación, siendo X cualquier aminoácido excepto prolina. Tiene lugar en el citoplasma, retículo endoplasmático (RE) y en el aparato de Golgi y consiste principalmente en 4 pasos: el primero es la biosíntesis del oligosacárido estándar o LLO (*Lipid Link Oligosacharide*, $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{PP-Dol}$) unido al dolicol fosfato (Dol) embebido en la membrana del RE, el segundo es la transferencia en bloque del glicano desde el dolicol fosfato a la proteína en formación, el tercero es el procesado del glicano en el RE y finalmente, el cuarto es su modificación en el aparato de Golgi (Cylwik *et al.*, 2013b) (Figura 2). En este último paso, se suelen eliminar algunas manosas y añadir un número variable de GlcNAc, galactosas (Gal), fucosas (Fuc) y ácido siálico (Sia). Alrededor de 40 proteínas conocidas están implicadas en la síntesis y la transferencia del glicano y alrededor de 35 están implicadas en el procesamiento del glicano en el RE y en el Golgi. Defectos en muchas de estas proteínas se han descrito como causantes de diferentes CDGs (Freeze *et al.*, 2014) (Figura 2).

La O-glicosilación, es la unión covalente del glicano, siendo el azúcar implicado en la unión N-acetilgalactosamina (GalNAc), GlcNAc, Gal, manosa (Man), glucosa (Glc), Fuc, o el tetrasacárido formado por Sia-Gal-Gal-xilosa, al grupo hidroxilo de un residuo de serina o treonina o hidroxilisina de la proteína ya plegada. La unión del glicano tiene lugar en el Golgi. Los O-glicanos están formados por una gran variedad de uniones diferentes entre azúcares y presentan una elevada diversidad de estructuras, a pesar de que una vez transferidos a la proteína, no sufren modificaciones (Cylwik *et al.*, 2013a).

Para la formación del glicano, tanto en la N-glicosilación, como en la O-glicosilación, se utilizan como donadores de azúcares los monosacáridos activados en forma de nucleótido-azúcar y/o dolicol-azúcar, por lo tanto en ambas rutas es necesaria su correcta activación y su transferencia al RE o al Golgi (Cylwik *et al.*, 2013a).

Respecto a la glicosilación de lípidos, se han descrito CDGs causados por defectos en la síntesis de glucoesfingolípidos y por defectos en la síntesis del anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Freeze *et al.*, 2014).

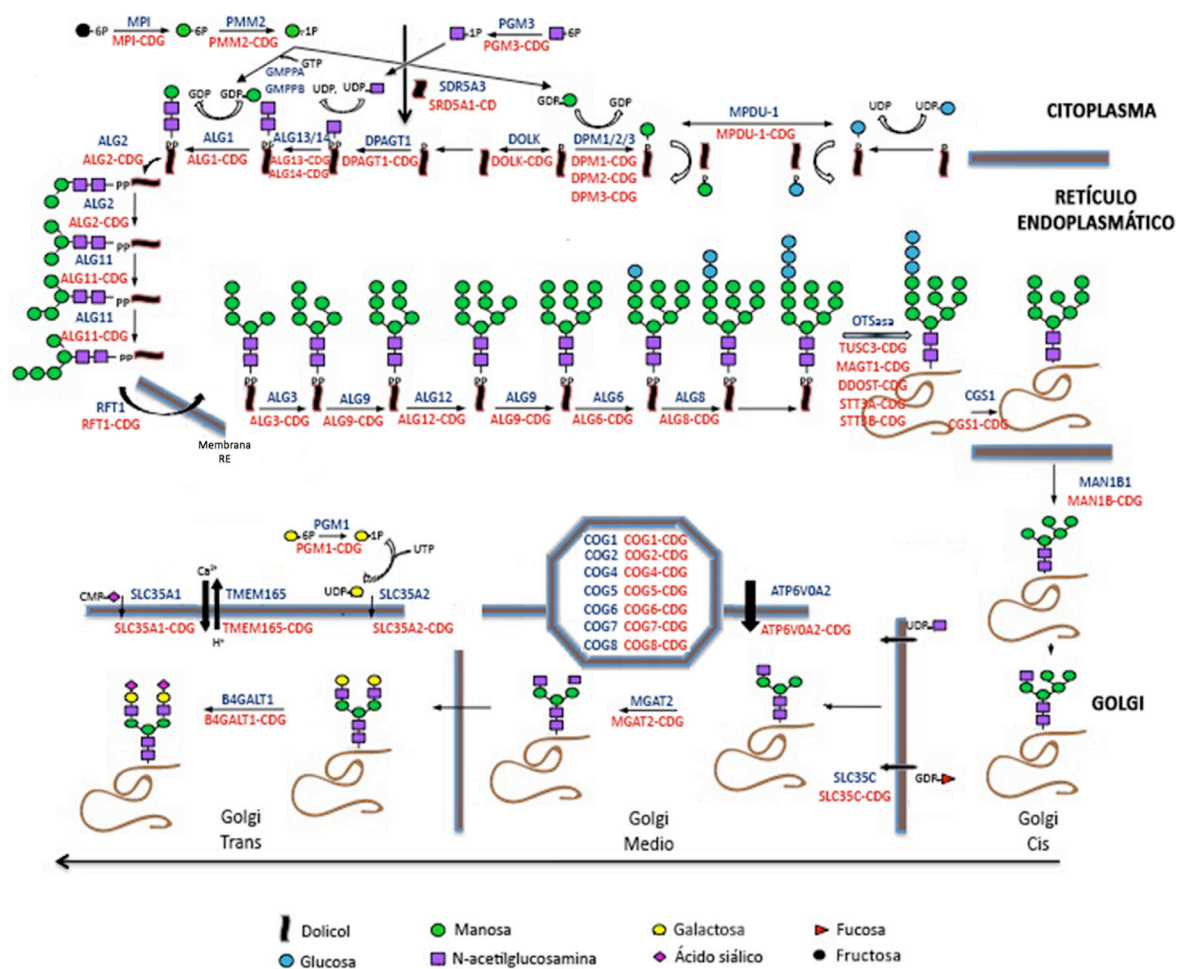


Figura 2. N-glicosilación de proteínas, se muestran los genes en los que se ha descrito un defecto causante de enfermedad (azul) y su CDG correspondiente (rojo). La N-glicosilación comienza en el citoplasma mediante la activación de los azúcares como nucleótidos-azúcar, y su transferencia al dolicol embebido en la membrana del RE. Hacia el citoplasma el dolicol-P-P-Glc₂Man₅ es sintetizado y posteriormente traslocado al lumen del RE por una flipasa. Allí, continúa su formación gracias a una serie de manosil y glucosiltransferasas. El LLO es entonces transferido por el complejo oligosacariiltransferasa (OST) a la proteína en formación. El oligosacárido ya unido a la proteína sufre una serie de modificaciones en el RE, la eliminación de 3 Glc y 1 Man y tras ello, es transferido por transporte vesicular al aparato de Golgi. Allí sufre otra serie de modificaciones gracias a GlcNAc, Fuc, Man y Sia transferasas y finalmente la glicoproteína madura es transportada a su destino. Figura modificada de Scott *et al.*, 2014.

Cada estructura glucídica tiene una función diferente en la biología humana. La N-glicosilación tiene gran impacto sobre el plegamiento de la proteína y su estabilidad, en la formación de estructuras cuaternarias, en la resistencia a proteasas, en el transporte inter e intracelular, así como en el reconocimiento célula-célula y en señalización celular. La O-glicosilación tiene importancia en la defensa inmune antibacteriana, en la presentación de antígenos a los linfocitos durante el proceso inflamatorio y en la determinación del grupo sanguíneo AB0. Ambas, son también importantes durante el desarrollo fetal. Los glicolípidos están implicados en la integridad y función de la membrana plasmática, mientras que los proteoglicanos, definen la estructura y función del espacio extracelular (Wolfe y Krasnewich, 2013). Por lo tanto, no es de extrañar, el amplio espectro clínico que presentan los pacientes CDGs, los cuales en la mayoría de los casos, presentan afectación de múltiples sistemas orgánicos que pueden incluir, retraso en el desarrollo, hipotonía, falta de crecimiento, anomalías en el cerebro, en el sistemas gastrointestinal, hepático, visual e inmune (Freeze y Schachter, 2009; Wolfe y Krasnewich, 2013).

Los CDGs son un conjunto de enfermedades que actualmente está en plena expansión. Desde la descripción del primer caso (Jaeken *et al.*, 1980), un PMM2-CDG, el cual es el defecto más frecuente, hasta el momento se han descrito cerca de 90 CDGs y más de 100 enfermedades relacionadas con la glicosilación, de las cuales en el año 2000 sólo habían sido descritas 16 (Freeze *et al.*, 2014). Este aumento vertiginoso en la identificación de nuevos defectos ha sido debido, en parte, al rápido avance de las tecnologías de secuenciación masiva (Matthijs *et al.*, 2013) y no es de extrañar, ya que se estima que alrededor del 2% del genoma está implicado en glicosilación (Freeze, 2006). Además, se piensa que aproximadamente el 50% de nuestras proteínas están glicosiladas (Jaeken, 2003).

La frecuencia de la mayoría de los CDGs de manera individual y de los CDGs colectivamente se desconoce. A pesar de ello, recientemente se ha realiza una estimación global infiriendo el número de portadores heterocigotos presentes en la población. Aplicando el filtro más estricto, describen una frecuencia de 1/10.000, la cual es mucho mayor de la estimada para el subtipo más frecuente, PMM2-CDG, 1/20.000. Esta discrepancia entre la frecuencia predicha y la estimada, puede ser debido a varios factores, como son a las propias limitaciones del método de predicción, a la probable letalidad durante la embriogénesis de algunas mutaciones en homocigosis, o en heterocigosis compuesta y/o a que algunos alelos pueden resultar en una presentación clínica inusual (Freeze *et al.*, 2014).

Los CDGs pueden ser clasificados en 4 categorías, defectos en la N-glicosilación de proteínas, defectos en la O-glicosilación de proteínas, defectos en la glicosilación de lípidos y en la glicosilación del anclaje GPI y defectos en múltiples rutas de glicosilación u otras rutas (Jaeken *et al.*, 2009). Los CDGs más conocidos y estudiados son los defectos en la N-glicosilación de proteínas. Dentro de

ellos, se ha propuesto una subclasificación complementaria, basada en la localización subcelular del defecto, así son clasificados como defectos en la ruta de la manosa, del dolicol fosfato, en el RE, en el compartimento intermedio RE-Golgi o en el aparato de Golgi (Jaeken, 2011).

Desde su descripción en 1984 (Jaeken *et al.*, 1984), el isoelectroenfoque de la transferrina sérica sigue siendo el método más ampliamente empleado para el diagnóstico de defectos en la N-glicosilación. La transferrina presenta dos sitios de glicosilación a los cuales se une un oligosacárido. Cada uno de ellos puede presentar hasta cuatro ácidos siálicos en los extremos, pero, la forma más abundante en el plasma humano es la tetrasialotransferrina, con dos ácidos siálicos en el extremo de cada glicano (Figura 3A). En general, se pueden distinguir dos patrones anormales diferentes, el clasificado como CDG tipo I, caracterizados por un incremento de las formas disialo- y/o asialotransferrina, que apunta a un defecto en la síntesis o transferencia del LLO a la proteína (tiene lugar en el citoplasma y RE), ya que los glicanos que presenta la transferrina son menos, pero están completos, y el clasificado como CDG tipo II, caracterizado por un incremento variable en las formas, tri-, di-, mono-, y/o asialotransferrina, que apunta a un defecto en el procesamiento del glicano unido a la proteína (tiene lugar en RE y en Golgi), ya que los glicanos unidos a la transferrina están mal procesados e incompletos (Figura 3A). Es importante descartar otras causas secundarias que pueden generar falsos positivos, como los debidos a CDGs secundarios como la galactosemia o la intolerancia congénita a la fructosa, alcoholismo, patologías hepáticas, sialidasas bacterianas o mutaciones raras en el sitio de glicosilación de la transferrina. Además, se han reportado pacientes CDGs con mutaciones detectadas en genes descritos, con un patrón de transferrina normal o incluso en algunos pacientes se ha observado recuperación del perfil transcripcional normal con el paso del tiempo (Freeze *et al.*, 2012; Jaeken y Matthijs, 2007; Lefeber *et al.*, 2011; Scott *et al.*, 2014).

Debido al uso de esta técnica para su diagnóstico, los CDGs clásicamente se han clasificado como tipo I seguidos de una letra, por un defecto en la síntesis o transferencia del glicano y tipo II seguidos de una letra, por un defecto en el procesamiento del glicano unido a la proteína, pero esta nomenclatura está cambiando debido al gran incremento de genes nuevos descritos y a la aparición de defectos causados por genes implicados en el tráfico vesicular (Foulquier *et al.*, 2007; Foulquier *et al.*, 2006; Reynders *et al.*, 2011; Reynders *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2004) y en el mantenimiento de la homeostasis del aparato de Golgi (Demaegd *et al.*, 2013; Kornak *et al.*, 2008), a los cuales se ha propuesto nombrar como “CDG plus” (Jaeken, 2011). Actualmente los CDGs se nombran combinando el nombre del gen causante de enfermedad seguido de -CDG (Jaeken *et al.*, 2009) (Figura 2). Los defectos estructurales del aparato de Golgi, se caracterizan por afectar tanto la N- como la O-glicosilación y por lo tanto son clasificados como defectos en múltiples rutas de glicosilación. Su diagnóstico, además de ser clasificados como CDGs tipo II mediante el isoelectroenfoque de la transferrina, suele ir acompañado del estudio del patrón de glicosilación

de la apolipoproteína C-III (APOC3) también mediante isoelectroenfoque. APOC3 presenta un sitio de O-glicosilación y el glicano unido puede no presentar ninguno, presentar uno o dos ácidos siálicos. El patrón normal es 50% de la forma monosialo, 45% disialo y 5% asialo. Se han descrito dos patrones anormales, el APOC3-0, caracterizada por un incremento en la forma asialo y el APOC3-1 caracterizado por un incremento en la forma monosialo y una reducción de la forma disialo (Lefebvre *et al.*, 2011) (Figura 3B). Para el diagnóstico de CDGs son también necesarias técnicas complementarias al isoelectroenfoque, como son las estrategias basadas en espectrofotometría de masas para el estudio de la estructura de los glicanos presentes en plasma o suero (Scott *et al.*, 2014).

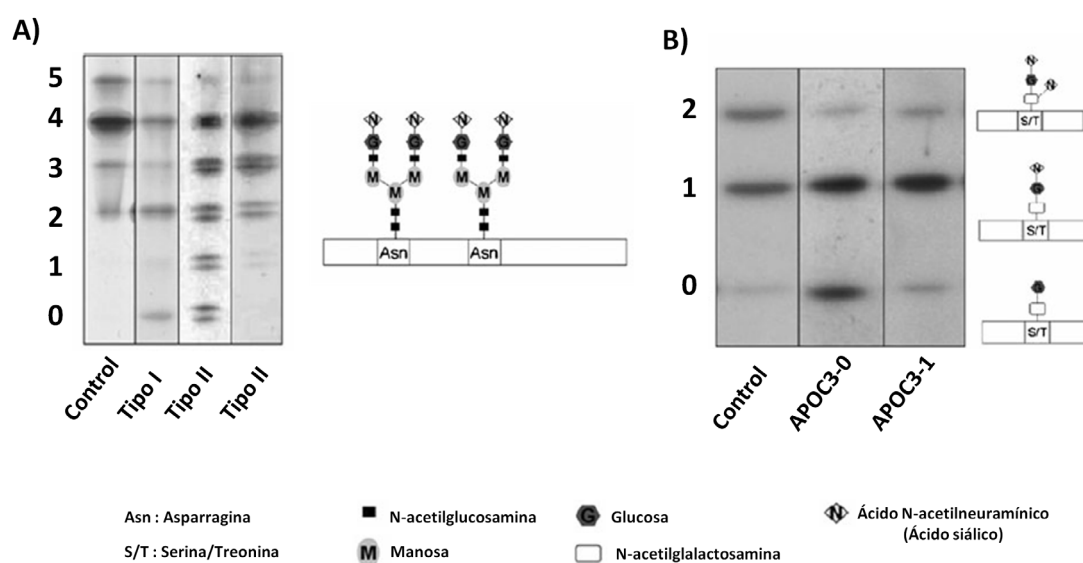


Figura 3. Técnicas de isoelectroenfoque para el diagnóstico de CDGs. A) Isoelectroenfoque de la transferrina plasmática para la detección de defectos en la N-glicosilación. Representación de la isoforma glicosilada más abundante de la transferrina, con dos N-glicanos con dos antenas, cada una de ellas terminadas en dos ácidos siálicos, correspondiente con la tetrasialotransferrina. B) Isoelectroenfoque de la apolipoproteína C-III (APOC3) para la detección de defectos en la O-glicosilación tipo mucina. Representación de las diferentes isoformas glicosiladas. Número de ácidos siálicos presentes en los glicanos unidos a las proteínas indicados a la izquierda de los geles. Modificado de Lefebvre *et al.*, 2011.

Se han descrito varias terapias para algunos de los CDGs descritos, pero la mayoría de estas enfermedades actualmente no tienen tratamiento. La enzima fosfomanosa isomerasa (MPI; OMIM 154550) es la encargada de catalizar la conversión de fructosa-6-P a manosa-6-P. Este bloqueo produce una disminución en la cantidad del nucleótido-azúcar guanosín difosfato-manosa (GDP-manosa) y su posterior producto metabólico dolicol-P-manosa. En el caso del MPI-CDG (OMIM 602579), se administra manosa oralmente, la cual es convertida en manosa-6-P por una vía independiente a MPI, sorteando así el bloqueo (Niehues *et al.*, 1998). En el caso del SLC35C1-CDG (OMIM 266265), la administración de L-fucosa tiene un éxito parcial. SLC35C1 (OMIM 605881) es el transportador de GDP-fucosa del aparato de Golgi. El efecto de la administración de fucosa en estos pacientes no se comprende en su totalidad, pero se hipotetiza que el aumento de fucosa intracelular lleva a un aumento de su transporte a Golgi. Esta terapia es altamente dependiente del tipo de mutación y de la

actividad residual del transportador, por lo que en algunos pacientes se ha aplicado con éxito mientras que en otros no (Marquardt *et al.*, 1999; Sturla *et al.*, 2001). Otra terapia dependiente de mutación, ha sido la aplicada a un paciente PIGM-CDG (OMIM 610293). La enzima α -1,4 manosiltransferasa PIGM (OMIM 610273) forma parte de un complejo implicado en la formación del anclaje GPI. Se ha descrito una mutación en el promotor del gen causantes de PIGM-CDG que provoca la hipoacetilación de histonas en el promotor y por lo tanto una reducción en la transcripción de este gen que es recuperada tras el tratamiento del paciente con butirato de sodio, un inhibidor de deacetilasas de histonas (Almeida *et al.*, 2007). Recientemente, se han descrito pacientes diagnosticados con síndromes miasténicos congénitos (CMS, *congenital myasthenic syndrome*), con defectos en genes previamente descritos como causantes de CDGs, como en el gen que codifica para la UDP-GlcNAc:Dolicol-P N-acetilglucosamina-1-P transferasa (*DPAGT1*; OMIM 191350), α -1,3 manosiltransferasa (*ALG2*; OMIM 607905) o para una de las subunidades de la UDP-GlcNAc transferasa (*ALG14*; OMIM 612866) (Belaya *et al.*, 2012b; Cossins *et al.*, 2013) (Figura 2), además de otros genes implicados en glicosilación, como el que codifica para la glutamina-fructosa-6-fosfato transaminasa 1 (*GFPT1*; OMIM 138292) (Senderek *et al.*, 2011). Este síndrome está caracterizado por deficiencias en la transmisión de la señal en la unión neuromuscular provocando debilidad muscular localizada o generalizada. Una de las causas del CMS son mutaciones en alguna de las subunidades del receptor de la acetilcolina (AChR) (Engel *et al.*, 1999), y la deficiencia de estos genes implicados en glicosilación, parece causar inestabilidad del receptor AChR debido a su incorrecta glicosilación (Belaya *et al.*, 2012a; Cossins *et al.*, 2013; Zoltowska *et al.*, 2013). Por lo tanto, es posible, que la hipotonía que caracteriza a la mayoría de pacientes CDGs con defectos en la N-glicosilación, sea causada por la deficiencia en el receptor AChR. Esto abre una prometedora opción terapéutica, ya que pacientes con CMS causado por mutaciones en *DPAGT1* (CMSTA2; OMIM 614750) y *GFPT1* (CMSTA1; OMIM 610542) responden bien al tratamiento con colinesterasa y a drogas que incrementan la liberación de acetilcolina de los terminales nerviosos (Belaya *et al.*, 2012b; Zoltowska *et al.*, 2013). Finalmente, la fosfoglucomutasa 1 (*PGM1*; OMIM 171900) es una enzima clave situada entre la glicolisis y la glucogénesis, que cataliza la conversión de glucosa-1-P a glucosa-6-P, cuyo defecto causa PGM1-CDG (OMIM 614921), previamente clasificado como glucogenosis tipo XIV (Stojkovic *et al.*, 2009). La glucosa-1-P está conectada con el metabolismo de la galactosa. La detección de una disminución en el ratio UDP-galactosa/UDP-glucosa en pacientes PGM1-CDG sugirió un efecto limitante de la galactosa en la N-glicosilación, lo que llevó a su tratamiento con galactosa administrada de manera oral con resultados positivos (Tegtmeyer *et al.*, 2014). A pesar del éxito de esta terapia es necesario su evaluación en ensayos clínicos, para la determinación de la dosis óptima y de las posibles terapias metabólicas adyuvantes (Scott *et al.*, 2014).

Cabe destacar, que además de en CDGs, se han descrito cambios en el patrón de glicosilación en otras situaciones patológicas, como en cáncer, enfermedades autoinmunes e inflamación, así

como en condiciones fisiológicas como durante el embarazo y durante el envejecimiento (Barone *et al.*, 2012; Freeze *et al.*, 2014). Adicionalmente, se ha descrito que una inesperada alta proporción de mutaciones que causan enfermedades genéticas humanas, generan nuevos sitio de N-glicosilación (Vogt *et al.*, 2005).

1.3.1. Defecto congénito de glicosilación causado por deficiencia en la enzima Fosfomanomutasa 2 (PMM2-CDG).

El primer paciente PMM2-CDG (OMIM 212065) fue descrito en 1980 (Jaeken *et al.*, 1980), pero no fue hasta 15 años después, cuando se descubrió el defecto subyacente a esta enfermedad, la deficiencia de una enzima con actividad fosfomanomutasa (Van Schaftingen y Jaeken, 1995), y no fue hasta 3 años más tarde cuando se describió el gen responsable, el gen que codifica para la fosfomanomutasa 2 (*PMM2*; OMIM 601785) (Matthijs *et al.*, 1997a). Este gen está situado en cromosoma 16, región 16p13, está compuesto por 8 exones con una fase de lectura de 738 pb y codifica para una proteína de 246 aminoácidos. PMM2 es una enzima homodimérica citoplasmática que cataliza la conversión de manosa-6-P a manosa-1-P, el cual es precursor de GDP-manosa y posteriormente de Dolicol-P-manosa, principales donadores de manosa en la N-glicosilación, O-glicosilación y formación del anclaje GPI (Hennet, 2012), por lo tanto, PMM2-CDG sería clasificado en el grupo de defectos en múltiples vías de glicosilación. A pesar de que se ha descrito alguna evidencia de su implicación en la O-glicosilación (Zdebska *et al.*, 2001) y en la formación del anclaje GPI (de la Morena-Barrio *et al.*, 2013) en células sanguíneas, su deficiencia se ha estudiado y clasificado clásicamente en la N-glicosilación.

Se ha descrito una isoforma, la fosfomanomutasa 1, PMM1, cuyo gen está situado en la región 22q13 (Matthijs *et al.*, 1997b), pero esta isoforma no ha sido asociado con ninguna patología humana. Su expresión es similar a la PMM2, prácticamente en todos los tejidos, incluidas las mismas regiones del cerebro (Cromphout *et al.*, 2005; Cromphout *et al.*, 2006), pero es incapaz de compensar su falta, ya que el ratón *knock out* para *Pmm2* es letal (Thiel *et al.*, 2006). Sin embargo, el ratón *knock out* para *Pmm1* presenta un fenotipo normal, lo que sugiere que no es esencial para el desarrollo normal del ratón (Cromphout *et al.*, 2006). A pesar de su nombre, parece que su principal función es como glucofosfatasa, ya que se corresponde con la enzima previamente caracterizada como glucosa-1,6-bifosfatasa sensible a inosina monofosfato (IMP), responsable de la degradación de glucosa-1,6-bifosfato en el cerebro durante isquemia (Veiga-da-Cunha *et al.*, 2008). También se ha descrito un pseudogen, *PMM2 ψ* en la región 18p generado por retrotransposición (Schollen *et al.*, 1998).

Gracias a la cristalización de la PMM1 se ha logrado generar un modelo molecular de la PMM2 (código de acceso PDB, 2AMY), ya que ambas presentan una homología en la secuencia proteica del 65%. Según este modelo, el monómero de PMM2 se compone de dos dominios, el *core* formado

por seis láminas- β y cinco α -hélices y el *cap* formado por cuatro láminas- β y tres α -hélices, insertado entre la $\beta 5$ y $\alpha 7$ del *core*. La forma activa de la proteína es un homodímero cuyos monómeros interactúan a través del *cap*. El centro activo se sitúa en la interfaz de los dos dominios. El sustrato inicialmente se une a la parte del centro activo del *cap*, provocando presumiblemente un cambio conformacional, cerrando así la estructura y colocando el sustrato en el centro activo (Silvaggi *et al.*, 2006).

Hasta el momento se han descrito más de 800 pacientes diagnosticados como PMM2-CDG (Hauptle y Hennet, 2009) y 116 mutaciones, de las cuales un 79,3 % son *missense*, un 4,3 % son *nonsense*, un 8,6% de *splicing* y el resto son pequeñas inserciones o deleciones o grandes deleciones (Stenson *et al.*, 2014) (HGMD® *professional release* 2014.3). Es el tipo más frecuente de CDG y se ha estimado una frecuencia en la población de 1/20.000 siendo la p.R141H la mutación más frecuente en poblaciones europeas. Este mutante presenta actividad nula y a pesar de la alta frecuencia de portadores de la misma en la población, 1/80, nunca ha sido descrita en homocigosis lo que sugiere que la falta total de actividad PMM2 es incompatible con la vida (Matthijs *et al.*, 1998; Schollen *et al.*, 2000). Otro indicio que apoya esta evidencia, es la letalidad descrita para el ratón *knock out* de *Pmm2* (Thiel *et al.*, 2006).

PMM2-CDG es una enfermedad multisistémica con un fenotipo muy variable, desde suave a severo. Todos los pacientes presentan afectación del sistema nervioso, siendo algunos de los síntomas, estrabismo, movimientos anormales de los ojos, hipotonía, retraso psicomotor, ataxia, epilepsia y atrofia cerebelar. También pueden presentar retraso en el desarrollo, hepatomegalia, anomalías esqueléticas, cardiomiopatías y coagulopatías. Suele ser diagnosticado durante el periodo neonatal. Las características predominantes en estos bebés son, hipotonía, pezones invertidos y distribución anormal de la grasa. También pueden presentar dismorfias faciales. El curso clínico de estos pacientes pasa por cuatro estadios: el estadio multisistémico o visceral infantil, el estadio de ataxia y retraso mental durante la niñez, el estadio de atrofia en las piernas durante la adolescencia y el estadio de hipogonadismo durante la vida adulta. La mayor tasa de mortalidad, alrededor del 20%, se produce durante el estado visceral debido a la implicación de órganos vitales y a infecciones severas (Grunewald, 2009; Jaeken, 2010). A causa del amplio espectro de síntomas presentes en los pacientes PMM2-CDG y a la existencia de casos que presentan un fenotipo leve (Grunewald, 2009; Perez-Duenas *et al.*, 2009), probablemente, muchos de los pacientes quedan sin diagnosticar.

PMM2-CDG, a pesar de ser el CDG más frecuente, no se ha descrito ninguna terapia efectiva en pacientes, sólo se pueden tratar los síntomas (Grunewald, 2009). Se han publicado diferentes aproximaciones terapéuticas, algunas de ellas exitosas en modelos celulares pero lejos de poder ser aplicables en pacientes. La primera aproximación, fue el tratamiento de estos pacientes

con suplementos de manosa, basándose en el éxito del tratamiento en células de pacientes (Panneerselvam y Freeze, 1996), y el éxito observado en pacientes MPI-CDG (Niehues *et al.*, 1998), paso anterior en la ruta de N-glicosilación, pero no se apreció ninguna mejoría (Kjaergaard *et al.*, 1998; Mayatepek y Kohlmuller, 1998). El ratio de actividad MPI/PMM2 determina el destino de la manosa-6-P. Si éste es elevado, la manosa-6-P se desvía hacia la glicolisis y si es reducido, se desvía hacia la glicosilación (Figura 4). Una de las hipótesis que se baraja para la explicación del fracaso de este tratamiento es que en el caso de los pacientes PMM2-CDG, la MPI permanece intacta, sin embargo la PMM2 presenta menor actividad, por lo tanto este ratio es reducido, desviándose la manosa-6-P, generada a partir de la manosa exógena gracias a una hexokinasa (HK), hacia la glicolisis en vez de hacia la glicosilación (Figura 4) (Freeze y Sharma, 2010). Basándose en esta hipótesis, se ha llevado a cabo con éxito, pero sólo en algunas líneas celulares derivadas de pacientes, otra aproximación terapéutica, en la cual inhiben la MPI a la vez que se añade un suplemento de manosa a las células, desviando de esta manera el flujo de manosa exógena hacia la glicosilación (Sharma *et al.*, 2011). Otra aproximación bastante estudiada, sería el tratamiento de estos pacientes con suplementos de manosa-1-P, con el fin de sortear el bloqueo, pero ésta es impermeable a la membrana celular (Figura 4). Se han probado diferentes modificaciones químicas, de las cuales algunas de ellas han tenido éxito en células de pacientes (Eklund *et al.*, 2005; Hardre *et al.*, 2007; Rutschow *et al.*, 2002), pero estos derivados son demasiado inestables y tóxicos para su uso clínico. Son necesarios más estudios o el uso de transportadores lipídicos (Rawat *et al.*, 2008) para poder trasladar esta terapia a pacientes.

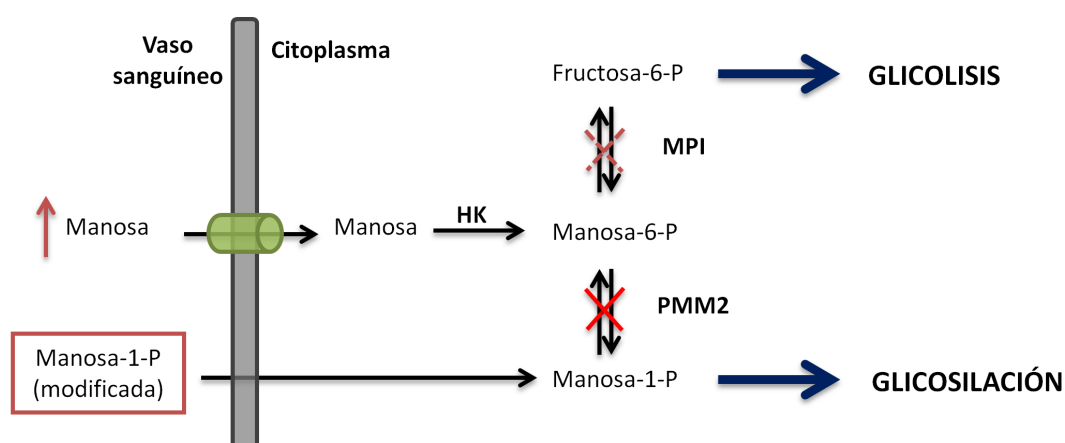


Figura 4. Aproximaciones terapéuticas propuestas para PMM2-CDG. Defecto de la vía marcado en rojo. La aplicación de suplementos de manosa (flecha verde) para incrementar el sustrato de la reacción no ha tenido éxito en pacientes PMM2-CDG, presumiblemente, por el desvío de la manosa-6-P hacia la glicolisis en vez de hacia la glicosilación debido a la actividad de la fosfomanosa isomerasa (MPI). La aplicación de la combinación de este suplemento junto con la inhibición de la MPI (cruz verde discontinua) desviaría el flujo hacia la glicosilación. Por otra parte, una terapia basada en el suplemento con manosa-1-P modificada o aplicada con transportadores lipídicos sortearía el bloqueo de la vía. HK:Hexokinasa.

La mayor limitación para el desarrollo de terapias efectivas ha sido la falta de modelos animales adecuados. Como ya se ha mencionado, el ratón *knock out* de *Pmm2* es letal (Thiel *et al.*, 2006), pero recientemente, se ha descrito un nuevo modelo de ratón PMM2-CDG, portador de las mutaciones p.R137H, homóloga a la mutación más frecuente en humanos, p.R141H, y p.F118L, homóloga a la mutación p.F122L en humanos, mutación no descrita en ningún paciente hasta el momento, pero predicha bioinformáticamente como leve. El ratón heterocigoto para estas dos mutaciones es letal, pero se consigue superar esta letalidad y obtener un ratón fenotípicamente normal, añadiendo un suplemento de manosa a la alimentación de la madre empezando una semana antes del apareamiento y continuando hasta el destete (Schneider *et al.*, 2012). Otro modelo animal descrito recientemente es el modelo PMM2-CDG de pez cebra, en el que consiguen reducir la actividad PMM2 hasta un 33,4% respecto a la normal, mediante un oligonuclótido antisentido tipo morfolino. Esta reducción provoca el desarrollo de alguna de las características fenotípicas descritas en los pacientes, como anomalías craneofaciales y defectos de movilidad. También describen una disminución de la N-glicosilación y de los niveles de LLO y una sorprendente acumulación de manosa-6-P (Cline *et al.*, 2012).

1.3.2. Defecto congénito de glicosilación causado por deficiencia de TMEM165 (TMEM165-CDG).

Recientemente, ha sido descrito un nuevo CDG, TMEM165-CDG (OMIM 614727), causado por defectos en el gen *TMEM165* (OMIM 614726), localizado en el cromosoma 4, región q12, compuesto por 6 exones y con una fase de lectura de 975 pb. Hasta el momento sólo se han descrito 5 pacientes, tres de ellos homocigotos para la mutación c.792+182G>A, que posiblemente afecta al proceso de *splicing*, otro paciente homocigoto para la mutación c.377G>A (p.R126H), y un compuesto heterocigoto para c.376C>T (p.R126C) y c.911G>A (p.G304R). TMEM165 es una proteína de 324 aminoácidos que presenta siete dominios transmembrana (o seis si se asume que se escinde el péptido señal), perteneciente a la familia *UPF0016* (*Uncharacterized Protein Family 0016*), familia muy conservada durante la evolución, pero de función desconocida (Foulquier *et al.*, 2012). Está localizada en el Trans-Golgi y en los lisosomas y se han descrito numerosas evidencias que apuntan a que TMEM165 es un canal de transporte antiporte de Ca²⁺/H⁺ implicado en el mantenimiento del pH y en la homeostasis del Golgi, cuya disfunción afectaría a la glicosilación, bien por acidificación del Golgi, por un impedimento en la salida de protones o por un defecto en la homeostasis del Ca²⁺ que puede afectar indirectamente a la homeostasis del Golgi (Demaegd *et al.*, 2014; Demaegd *et al.*, 2013; Foulquier *et al.*, 2012; Reinhardt *et al.*, 2014; Rosnoblet *et al.*, 2013).

Las mutaciones descritas en los pacientes causan acidificación de los lisosomas (Demaegd *et al.*, 2013) y/o deslocalización de la proteína en el caso de las mutaciones *missense*, e indican que el motivo YNRL tiene un papel crítico en la localización subcelular de la proteína (Rosnoblet *et al.*, 2013).

Se han descrito otras enfermedades asociadas a la disfunción de la homeostasis del Ca^{2+} , como la enfermedad de Hailey-Hailey (OMIM 169600), causada por mutaciones en el gen *SPCA1* (OMIM 604384), que codifica para la Ca^{2+} -ATPasa 1 de la ruta de secreción localizada en el Golgi (Behne *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2000) y otro CDG, ATP6V0A2-CDG (OMIM 219200), causada por defectos en el gen *ATP6V0A2* (OMIM 611716) que codifica para la subunidad $\alpha 2$ de la ATPasa de H^+ tipo V localizada en el Golgi y en los endosomas (Guillard *et al.*, 2009; Kornak *et al.*, 2008).

TMEM165-CDG sería uno de los CDGs que no encajan en la clasificación clásica, tipo I o tipo II, ya que está implicado en la homeostasis del aparato de Golgi y serían clasificados como “CDG *plus*” y como un defecto que afecta múltiples vías de glicosilación (apartado 1.3).

Estos cinco pacientes presentan una variabilidad fenotípica amplia, siendo los rasgos más característicos de los tres pacientes homocigotos para la mutación c.792+182G>A, retraso psicomotor severo, gran displasia esquelética y en los pacientes adultos enanismo pronunciado. Los pacientes portadores de las mutaciones *missense*, sin embargo, presentan una clínica leve sin fenotipo esquelético (Foulquier *et al.*, 2012; Zeevaert *et al.*, 2013), lo que se corresponde con los resultados obtenidos del estudio de la acidificación de los lisosomas de las células derivadas de pacientes, que muestran una menor disfunción en las células de estos dos portadores de las mutaciones *missense* (Demaegd *et al.*, 2013).

1.4. TERAPIAS ESPECÍFICAS DE MUTACIÓN

El estudio del efecto de las mutaciones causantes de enfermedad a nivel genético y proteico nos permite aumentar el conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes a la enfermedad, nos posibilita en algunos casos el establecimiento de una correlación genotipo-fenotipo y nos facilita el desarrollo de terapias específicas de mutación, ya sean genéticas o farmacológicas. Este estudio, también contribuye a ampliar los conocimientos básicos de la función de las proteínas y de sus motivos estructurales.

Los principales tipos de mutaciones atendiendo al cambio producido en el DNA son, anomalías cromosómicas o grandes reordenamientos genómicos, mutaciones puntuales, pequeñas y grandes inserciones y/o deleciones y expansión de repeticiones. Atendiendo a su efecto sobre la proteína, pueden ser clasificadas como silenciosas, neutras, *missense* o de cambio de sentido, *nonsense* o sin sentido y de cambio de pauta de lectura. Algunos cambios puntuales o pequeñas deleciones y/o inserciones, pueden tener un efecto sobre el procesamiento del mRNA, generando así las denominadas mutaciones de *splicing* (Desviat *et al.*, 2001).

Este trabajo se centra en el estudio funcional, por un lado, de mutaciones que afectan al proceso de *splicing* y por otro lado, de mutaciones *missense*, especialmente de aquellas que afectan a la estabilidad de la proteína, generadoras de los denominados mutantes de plegamiento, así como en el desarrollo de terapias específicas de mutación.

1.4.1. Terapia de recuperación de mutaciones de *splicing*

El 94% de los genes humanos son discontinuos, presentando exones e intrones, los cuales deben ser eliminados del mRNA para su correcta traducción a proteína, en un proceso muy preciso denominado *splicing*. Su regulación requiere de una serie de elementos en *cis* que contienen el “código” de *splicing* y en *trans*, los cuales se unen a los elementos en *cis*. Son necesarias las secuencias consenso localizadas en la unión intrón-exón 5' y 3', denominados sitios de *splicing*, así como la secuencia de ramificación situada 30-50 nucleótidos aguas arriba del sitio 3' de *splicing* y el tracto pirimidínico que le sigue. Estos elementos son reconocidos por un complejo ribonucleoproteico denominado “spliceosoma” compuesto por 5 ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP), U1, U2, U4, U5 y U6 y aproximadamente 150 proteínas auxiliares. El proceso se produce en diferentes pasos en los que los componentes del “spliceosoma” reconocen de manera secuencial las diferentes regiones conservadas, y tras dos reacciones de transesterificación se unen los dos exones (Singh y Cooper, 2012; Wahl *et al.*, 2009; Ward y Cooper, 2010). Además de estas secuencias conservadas, existen otros elementos reguladores en *cis* menos conservados que actúan como silenciadores o activadores del *splicing* que pueden estar situados tanto en exones como en intrones y son denominados ESS (*exonic splicing silencer*), ESE (*exonic splicing enhancer*), ISS (*intronic splicing silencer*) e ISE (*intronic splicing enhancer*). Los elementos activadores son reconocidos por proteínas ricas en serina y arginina (SR) y los silenciados por ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP). Estos elementos reguladores juegan un papel fundamental en el *splicing* alternativo que se produce de manera natural en el 95% de los genes multiexónicos y el cual es una de las fuentes principales de diversidad proteómica en eucariotas multicelulares (De Conti *et al.*, 2013; Nilsen y Graveley, 2010; Ozsolak y Milos, 2011).

El 9,1% de las mutaciones descritas son mutaciones que afectan al proceso de *splicing* (Stenson *et al.*, 2014) (HGMD® professional release 2014.3), pero se estima que podrían ser hasta un tercio de las mutaciones causantes de enfermedad sin tener en cuenta las mutaciones intrónicas internas (Lim *et al.*, 2011; Sterne-Weiler *et al.*, 2011). Estas mutaciones pueden estar situadas en los sitios conservados o reguladores del proceso de *splicing*, o pueden generar o activar sitios críticos de *splicing*, los cuales van a ser utilizados en ese caso, con prioridad a los naturales. El efecto de estas mutaciones en el transcrito puede ser, la exclusión de uno o varios exones o de parte de un exón, la inserción de una región intrónica (pseudoejón) o de la región adyacente al exón o una combinación de estos problemas. El resultado final de estas inserciones y/o deleciones suele ser

el cambio en la pauta de lectura y la generación de un codón de terminación prematuro que suele provocar la degradación del mRNA por el NMD (Maquat, 2004), o la generación de una proteína truncada probablemente no funcional. La inserción o deleción también se puede producir en fase, lo que generaría la inserción o deleción de determinados aminoácidos, los cuales pueden afectar la funcionalidad de la proteína (Havens *et al.*, 2013).

La manera más eficaz de detectar este tipo de mutaciones es el estudio del perfil transcripcional de células derivadas del paciente, pero las técnicas clásicas de detección de mutaciones suelen estar basadas en el análisis del gDNA. Además, en algunos casos el estudio del perfil transcripcional de un determinado gen no es posible, debido a la imposibilidad de acceder al órgano donde se expresa o a la rápida degradación del transcrito aberrante por el NMD. Todo esto dificulta su detección y evidencia su posible subestimación (Baralle *et al.*, 2009; Desviat *et al.*, 2012; Perez *et al.*, 2010).

Existen numerosas herramientas bioinformáticas para predecir el efecto de un cambio nucleotídico sobre el proceso de *splicing*, pero su verificación experimental es imprescindible. Para tal fin, se pueden utilizar minigenes, vectores para evaluar el proceso de *splicing* que permiten confirmar el efecto de una mutación sobre el mismo. Un minigen es un vector que contiene una versión simplificada de un gen, con dos regiones exónicas flanqueadas por un sitio 5' y 3' de *splicing* respectivamente, separadas por una secuencia intrónica donde se encuentra el sitio de policlonaaje para introducir la región a estudio. La comparación del perfil transcripcional de células transfectadas con el minigen WT y con el minigen portador de la mutación a estudio, nos permitirá elucidar su efecto sobre el proceso de *splicing* (Baralle y Baralle, 2005; Desviat *et al.*, 2012).

Una de las estrategias terapéuticas más prometedoras para la corrección de este tipo de mutaciones, es la basada en oligonucleótidos antisentido (AOs, *antisense oligonucleotides*) que modifican el *splicing* (SSOs, *splice switching oligonucleotides*). Los AOs funcionan a través de diferentes mecanismos y es necesario distinguir entre aquellos que actúan como silenciadores génicos, ya que se unen al RNA y promueven su degradación (generalmente mediante la acción de la RNasa H), y aquellos que actúan como moduladores, ya que se unen al RNA e interfieren en su función, pero no promueven su degradación. A esta última categoría pertenecen los SSOs, AOs de 15-25 nucleótidos que se unen específicamente al mRNA bloqueando estéricamente los sitios críticos de *splicing* activados o generados, impidiendo de esta manera la unión de la maquinaria de *splicing* (Bennett y Swayze, 2010; Kole *et al.*, 2012). Para la corrección del *splicing* mediante esta técnica es necesario que los sitios naturales de *splicing* permanezcan intactos y lo suficientemente alejados del sitio crítico a bloquear (Perez *et al.*, 2014). En general, el DNA o RNA sin modificar no puede ser utilizado terapéuticamente ya que son vulnerables a la degradación por nucleasas. Con el fin de mejorar esta estabilidad y protección frente a nucleasas, así como aumentar su fuerza de unión y evitar la degradación del transcrito una vez unido a él, se han desarrollado

numerosas modificaciones químicas que hacen a estos oligonucleótidos más apropiados para su uso terapéutico. Las principales modificaciones se han desarrollado en el esqueleto y en el azúcar del AO. Las modificaciones del esqueleto más usadas en los SSOs son, la unión fosforotioato (PS), los ácidos nucleicos peptídicos (PNA) y la unión fosforodiamidato y sustitución del azúcar por un anillo morfolino (PMO). Para el uso de AOs con esqueleto PS como SSOs, es necesaria la modificación del azúcar, ya que este esqueleto es susceptible de ser degradado por la RNAsa H tras su unión al mRNA. Las principales modificaciones del azúcar utilizadas son, 2'-O-metil (2'OMe), 2'-O-metoxietil (2'-O-MOE) y su ciclación en el *Locked nucleic acid* (LNA).

Desde la primera aplicación de un SSO descrita para el bloqueo de un sitio crítico de *splicing* en el gen de la β -globina causante de beta-talasemia (Dominski y Kole, 1993), hasta la fecha, este tipo de terapia se ha aplicado con éxito en células de pacientes y modelos animales portadores de mutaciones que activan o generan sitios críticos de *splicing* de diferentes enfermedades genéticas incluidas las enfermedades metabólicas (David *et al.*, 2010; Lentz *et al.*, 2013; Nakamura *et al.*, 2013; Osorio *et al.*, 2011; Perez *et al.*, 2010; Svasti *et al.*, 2009; Taniguchi-Ikeda *et al.*, 2011; Uchikawa *et al.*, 2007; Wheeler *et al.*, 2007).

La tecnología de los SSO también ha sido empleada para otros fines diferentes al bloqueo de sitios críticos. Se ha aplicado en pacientes con distrofia muscular de Duchenne (DMD), actualmente en ensayos clínicos, para la recuperación de la pauta de lectura y/o para evitar un exón mutado mediante su exclusión y así conseguir una proteína aberrante menos severa (Cirak *et al.*, 2012; Goemans *et al.*, 2011; Koo y Wood, 2013; Mendell *et al.*, 2013). Se ha empleado para la regulación de un *splicing* alternativo desregulado en múltiples cánceres, en Alzheimer y actualmente también en ensayos clínicos, en la atrofia muscular espinal (SMA, *Spinal Muscular Atrophy*) (Bauman *et al.*, 2010; Kalbfuss *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2013). Se ha utilizado para reducir la expresión de una isoforma perjudicial en múltiples cánceres, Alzheimer y enfermedades inflamatorias entre otras (Graziewicz *et al.*, 2008; Mowrer y Wolfe, 2008; Owen *et al.*, 2012), para la inhibición de la traducción en la enfermedad de Huntington (Gagnon *et al.*, 2010) y la enfermedad de Machado Joseph (Hu *et al.*, 2009) y para la disociación de uniones mRNA-proteínas provocadas por múltiples repeticiones en el mRNA en distrofia miotónica (Wheeler *et al.*, 2009). Otra de las aplicaciones de los SSO ha sido su uso para la generación de modelos animales de enfermedad, técnica empleada en ratón y principalmente en pez cebra (Bill *et al.*, 2009; Cline *et al.*, 2012; Chu *et al.*, 2013; Ferguson *et al.*, 2013; Gallego-Villar *et al.*, 2014; Nasevicius y Ekker, 2000).

Adicionalmente a la terapia con SSO, se han descrito otras aproximaciones terapéuticas para la corrección o modulación del *splicing*, como la modificación de factores de *splicing* (Schmid *et al.*, 2013), el sistema de *Trans-splicing* (Wally *et al.*, 2012) o el uso pequeños compuestos químicos (Arslan *et al.*, 2013), que también pueden ser aplicables a determinadas mutaciones.

1.4.2. Terapia de recuperación de mutantes de plegamiento

El 76,9% de las mutaciones descritas son mutaciones *missense* o pequeñas inserciones o deleciones (Stenson *et al.*, 2014) (HGMD® *professional release* 2014.3). Considerando las *missense* y las pequeñas inserciones o deleciones en fase, éstas pueden afectar a un dominio fundamental para la correcta función de la proteína, en el caso de las enzimas, por ejemplo, su centro catalítico, o como la mayoría, pueden afectar al plegamiento de la proteína provocando las denominadas enfermedades conformacionales (Gregersen *et al.*, 2000). La fisiopatología subyacente de las enfermedades conformacionales puede ser debida a una pérdida de función, causada por un plegamiento ineficiente con una disminución en la cantidad proteína debido a una degradación acelerada, mecanismo comúnmente observado en enfermedades hereditarias autosómicas recesivas, o por ganancia de función, debido a la formación de agregados tóxicos estables, mecanismo observado en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson o Huntington (Martinez *et al.*, 2008; Muntau *et al.*, 2014; Sloan *et al.*, 2009).

La mayoría de las proteínas para llegar a ser funcionales, deben plegarse en su estado nativo tridimensional. Este estado nativo es un equilibrio dinámico, comprometido entre la estabilidad termodinámica y la flexibilidad requerida para su función (Jahn y Radford, 2008; Kim *et al.*, 2013; Powers *et al.*, 2009). La secuencia lineal del polipéptido contiene toda la información necesaria para su correcto plegamiento (Anfinsen, 1973), pero éste no viene determinado por pasos específicos, sino que es un proceso estocástico en busca de las diferentes conformaciones posibles, guiadas por un diagrama de energía en forma de embudo, en el cual las posibles interacciones entre los diferentes residuos están sesgadas hacia aquellas que le confieran una mayor estabilidad (menor energía libre) y por lo tanto más cercanas al estado nativo de la proteína (Figura 5) (Dobson, 2001; Dobson, 2004). La introducción de una pequeña alteración en la cadena polipeptídica, como es el cambio de un aminoácido, puede cambiar el diagrama de energía en forma de embudo generando un nuevo punto mínimo de energía en el que la proteína mal plegada se puede quedar atrapada en una trampa cinética o incluso cambiar el punto mínimo global resultando así en una estructura estable diferente. Estas formas no nativas presentan tendencia a agregar o a ser degradadas (Gregersen *et al.*, 2006) (Figura 5).

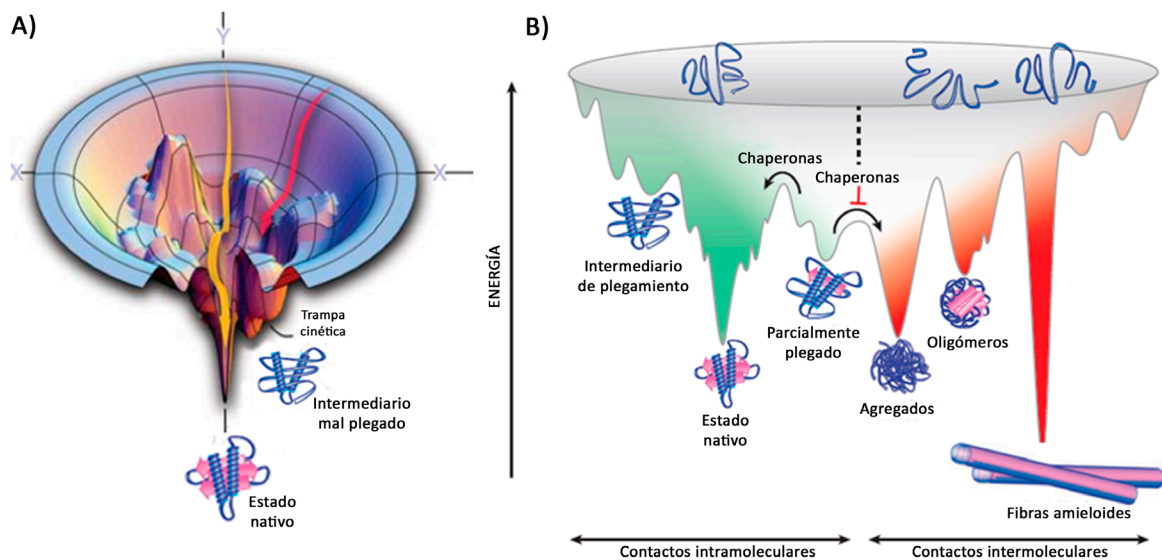


Figura 5. Diagramas de energía de plegamiento de proteínas (A) 3D y B) 2D. Los esquemas muestran la multitud de estados conformacionales que puede adoptar una cadena polipeptídica. Interacciones intramoleculares energéticamente favorables estabilizan y llevan a la adopción del estado nativo de la proteína (A) flecha amarilla; B) región verde). El plegamiento puede seguir varias vías y en ocasiones, interacciones intramoleculares energéticamente favorables pero no nativas, resultan en una proteína parcialmente plegada o mal plegada atrapada en una trampa cinética localizada en una zona de baja energía (A) flecha roja; B) límite entre región verde y roja). Además, estos intermediarios atrapados tienen mayor tendencia a establecer uniones intermoleculares (B) región roja) que resultan en agregación proteica (agregados amorfos, oligómeros ricos en láminas-β y fibras amiloides). B) Las chaperonas tanto moleculares como farmacológicas ayudan a estos intermediarios a superar las barreras de energía libre inhibiendo así su agregación y promoviendo su correcto plegamiento hacia el estado nativo. Modificado de Lindquist y Kelly, 2011 y Kim *et al.*, 2013.

La gran cantidad de macromoléculas presentes en el medio intracelular (Ellis y Minton, 2006) y la exposición inicial en el caso de proteínas de gran tamaño, de regiones hidrofóbicas, regiones que en su estado nativo están enterradas dentro de su estructura, hacen que estas proteínas necesiten asistencia para plegarse y conseguir adquirir el estado nativo. El correcto plegamiento de las proteínas, así como su correcta concentración, localización y función (proteostasis) necesarios para un adecuado funcionamiento celular, está estrechamente controlado por la red de proteostasis que integra diferentes vías encargadas del plegamiento, modificaciones postraduccionales y degradación de las proteínas (Powers *et al.*, 2009). En mamíferos, más de 1.300 proteínas conforman esta red (Kim *et al.*, 2013). Una parte importante de la misma es la encargada del plegamiento de las proteínas, de lo cual son responsables las chaperonas moleculares especializadas en cada compartimento celular. Éstas interactúan, estabilizan o ayudan a las proteínas en su plegamiento, suavizando el diagrama de energía de la proteína, además de intervenir en el ensamblaje de macrocomplejos proteicos, transporte, degradación, disociación de agregados, y replegamiento de proteínas desnaturalizadas bajo condiciones de estrés (Gregersen *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2013; Powers *et al.*, 2009; Vabulas *et al.*, 2010).

Las diferentes vías interconectadas que conforman la red de proteostasis son altamente adaptables y responden a formas específicas de estrés celular incluyendo, la *Unfolded Protein Response* (UPR) en el RE, la *Heat Shock Response* (HSR) en el citoplasma y la UPR mitocondrial.

Además, están implicadas otras vías relacionadas con la respuesta inflamatoria, el estrés oxidativo, la restricción calórica y el envejecimiento, durante el cual la capacidad de mantener la homeostasis proteica disminuye (Kim *et al.*, 2013; Lindquist y Kelly, 2011; Powers *et al.*, 2009).

Una de las estrategias terapéuticas actualmente más estudiadas para el tratamiento de enfermedades conformacionales con fenotipo de pérdida de función es el uso de compuestos de bajo peso molecular que de manera directa o indirecta, consigan recuperar el correcto plegamiento y función de la proteína inestable. Uno de los principales requisitos para su uso es que los mutantes retengan actividad residual y que un leve incremento en la cantidad y actividad de la proteína consiga generar un gran beneficio terapéutico (Muntau *et al.*, 2014). Estos compuestos pueden ser clasificados en tres categorías diferentes dependiendo de su modo de acción, chaperonas químicas, chaperonas farmacológicas y reguladores de la proteostasis.

Las chaperonas químicas pertenecen a la primera categoría y estabilizan las proteínas mediante uniones inespecíficas o por modificación de la densidad y/o las condiciones del solvente por medio del llamado efecto de hidratación que lleva al aumento de la inestabilidad de los estados mal plegados. Éstas son inespecíficas y en general, es necesario que estén a concentraciones elevadas y tóxicas para ejercer su función, por lo que probablemente nunca sean usadas en clínica (Arakawa *et al.*, 2006; Leandro y Gomes, 2008; Martinez *et al.*, 2008; Underhaug *et al.*, 2012).

La segunda categoría son las chaperonas farmacológicas (*pharmacological chaperones*, PCs) que se unen específica y reversiblemente a las proteínas mal plegadas promoviendo su correcto plegamiento y evitando así su degradación o agregación prematura. Son específicas y suelen ser eficaces a bajas concentraciones. Muchos ligandos naturales, como cofactores o sustratos, que se unen a la proteína, en particular a las enzimas, pueden actuar como PCs (Bernier *et al.*, 2004; Leandro y Gomes, 2008; Martinez *et al.*, 2008; Underhaug *et al.*, 2012), y en concreto, se ha descrito que algunas de las más efectivas son inhibidores que se unen al centro activo (Fan, 2008). El trabajo pionero en el campo de las PCs fue en 1999, para la enfermedad de Fabry (Fan *et al.*, 1999). Actualmente, existen dos PCs aprobadas para su uso clínico, diclorhidrato de sapropterina (Kuvan®) para el tratamiento de la fenilcetonuria (Lee *et al.*, 2008; Levy *et al.*, 2007; Trefz *et al.*, 2009) y Tafamidis (Vindaquel®; Fx-1006A) para el tratamiento de la amiloidosis hereditaria de tipo transtiretina (Bulawa *et al.*, 2012) y existen numerosas en ensayos preclínicos o clínicos, para enfermedades metabólicas (Fargue *et al.*, 2013; Giugliani *et al.*, 2013; Jorge-Finnigan *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2010; Muntau *et al.*, 2014; Porto *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2012) y otras enfermedades genéticas (Gavrin *et al.*, 2012; Misawa *et al.*, 2012). Se han descrito dos aproximaciones para la identificación de PCs, mediante estrategias dirigidas, o mediante el rastreo de librerías de miles de compuestos químicos o drogas aprobadas para su uso clínico. Las estrategias dirigidas pueden estar basadas o bien en el rastreo de compuestos similares a ligandos naturales de la proteína (Santos-Sierra *et al.*,

2012) o mediante la búsqueda *in silico* de cavidades alternativas al sitio de unión del sustrato en la estructura tridimensional de la proteína como posibles sitios de unión de la PC con actividad no inhibitoria (Aymami *et al.*, 2014). El rastreo de librerías de miles de compuestos es una forma rápida de identificar PCs de estructuras químicas a menudo inesperadas y diferentes, con la posibilidad de poder encontrar compuestos que se unen a diferentes regiones de la proteína (Muntau *et al.*, 2014; Underhaug *et al.*, 2012). Esta estrategia se ha llevado a cabo monitorizando la estabilidad térmica de la proteína mediante *differential scanning fluorimetry* (DSF) (Pey *et al.*, 2008), utilizando células derivadas de pacientes (Tropak y Mahuran, 2007) o mediante métodos *in silico* (Noorwez *et al.*, 2008).

La tercera categoría son los reguladores de la proteostasis (*proteostasis regulators*, PRs) cuyo mecanismo de acción es modular la capacidad de la red de proteostasis, principalmente afectando a la síntesis, plegamiento, transporte o degradación de las proteínas (Kim *et al.*, 2013; Powers *et al.*, 2009). Se han descrito numerosos compuestos que pueden modular esta red, bien modulando la HSR, principalmente mediante la inducción del principal regulador de esta vía, HSF1 (*Heat shock transcription factor 1*), modulando la vía UPR o la *Endoplasmic Reticulum Associated Protein Degradation* (ERAD), modulando la autofagia o la degradación mediada por el proteasoma, modulando la señal intracelular de Ca²⁺ o modulando histonas deacetilasas (Calamini y Morimoto, 2012; Calamini *et al.*, 2012; Powers *et al.*, 2009; Sloan *et al.*, 2009). Estos compuestos permiten una aproximación terapéutica más amplia y muchos de ellos han sido estudiados para el tratamiento de diferentes enfermedades como el cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades de ganancia de función, como las enfermedades neurodegenerativas, y de pérdida de función, como las enfermedades metabólicas, entre las cuales se encuentran la fibrosis quística, enfermedades lisosomales y la homocistinuria (Balch *et al.*, 2008; Calamini *et al.*, 2012; Hammarstrom *et al.*, 2003; Hoeller y Dikic, 2009; Hutt y Balch, 2013; Li *et al.*, 2013; Lindquist y Kelly, 2011; Mu *et al.*, 2008b; Muntau *et al.*, 2014; Nagai *et al.*, 2010; Powers *et al.*, 2009; Rowe y Verkman, 2013; Song *et al.*, 2013; Wang y Segatori, 2013).

2. Objetivos

El **objetivo principal** de este trabajo ha sido la búsqueda de terapias específicas de mutación tanto genéticas como farmacológicas basadas en los mecanismos de acción de mutaciones en enfermedades metabólicas hereditarias (EMH).

Para ello se establecieron los siguiente **objetivos específicos**:

1. Caracterización funcional de mutaciones que afectan al proceso de *splicing* en PDE y TMEM165-CDG.
2. Desarrollo de una terapia específica con oligonucleótidos antisentido aplicable a la recuperación de mutaciones tanto exónicas como intrónicas que afectan al proceso de *splicing*, en PDE y TMEM165-CDG.
3. Caracterización funcional de mutaciones *missense* detectadas en el gen *PMM2* causantes de PMM2-CDG.
4. Desarrollo de terapias basadas en la estabilización de mutantes de plegamiento descritos en PMM2-CDG: terapia con chaperonas farmacológicas y reguladores de la proteostasis.

3. Materiales y métodos

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Cultivos primarios

En este estudio se utilizaron tres líneas celulares de fibroblastos derivados de biopsias de piel de pacientes diagnosticados como TMEM165-CDG. La línea de fibroblastos control empleada, CC02509, fue obtenida de la casa comercial Lonza.

3.1.2. Líneas establecidas

El estudio del perfil transcripcional del paciente diagnosticado con PDE, se realizó con linfoblastos procedentes de muestras de sangre del paciente, así como con linfoblastos procedentes de un control, ambas líneas inmortalizados con el virus Epstein-Barr.

Las líneas establecidas utilizadas para el estudio con minigenes fueron, COS-7, derivadas de riñón de mono verde y Hep3B, procedente de hepatoma humano. La línea establecida para la generación de los lentivirus portadores del vector de expresión en eucariotas de *PMM2*, fueron las células embrionarias de riñón humano, HEK-293T.

Para la infección con lentivirus portadores del cDNA de *PMM2* y el posterior estudio funcional de las mutaciones, se utilizaron cinco líneas de fibroblastos establecidas, una línea derivada de un control, GM08680, obtenida del Instituto Coriell para la investigación biomédica y cuatro líneas derivadas de biopsias de piel de pacientes diagnosticados como *PMM2*-CDG: P1 (p.R141H/p.R162W), P2 (c.640-9T>G,p.T237M), P3 (p.Q33*/p.V44A) y P4 (p.R141H/p.D65Y), inmortalizados con el vector pBABE-puro conteniendo el cDNA de *SV40 LT* (Cortesía del Dr. J. A. Enríquez; CNIC; Madrid).

Todo el material genético de pacientes y controles fue obtenido con el consentimiento informado autorizado por los padres y por el hospital que remitió las muestras. Toda la investigación llevada a cabo con este material está autorizada por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid, respetando los principios fundamentales de la declaración de Helsinki, del Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina y de la declaración Universal de la UNESCO sobre el Genoma Humano y los derechos humanos.

3.1.3. Cepas bacterianas

Las cepas de *E. coli* utilizadas en este estudio fueron las siguientes:

- *XL1-Blue* (Stratagene): *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA46*, *thi*, *relA1*, *lac-*, F'[*proAB+ lacIq lacZΔM15Tn10(tetr)*].

- *TOPO One Shot Mach[®]1T1R* (Invitrogen): *lacZΔM15, hsdR, lacX74, recA, endA, tonA*.
- *BL21 Star[™]DE3 One Shot[®]* (Invitrogen): F- *ompT hsdSB (rB-mB-) gal, dcm, rne131(ΔE3)*.

3.1.4. Vectores

Los vectores empleados en este estudio fueron:

- *TOPO TA cloning PCR 2.1-Topo Vector* (Invitrogen).
- pSPL3 de Life Technologies cedido por el Dr. B. Andresen.
- pDEST17-D18 en el que se encuentra incluido el cDNA de *PMM2* junto con una secuencia codificante de 6 histidinas en la región N-terminal (Source BioScience).
- pReceiver-B01 en el que se encuentra incluido el cDNA de *Pmm2* de ratón, junto con una secuencia codificante de 6 histidinas en la región N-terminal (GeneCopeia).
- pReceiver-Lv101 en el que se encuentra incluido el cDNA de *PMM2* junto con una secuencia codificante de la etiqueta FLAG en la región N-terminal (GeneCopeia).
- pCMv-dR8.74 en el que se encuentran incluido el cDNA de las proteínas empaquetadoras del lentivirus (Addgene).
- pMD2.G en el que se encuentran incluido el cDNA de las proteínas de la cubierta del lentivirus (Addgene).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Aislamiento de ácidos nucleicos

La extracción de DNA genómico a partir de fibroblastos de piel cultivados o de linfoblastos se realizó con el extractor automático *MagnaPure Compact* con el kit *MagnaPure RNA Isolation kit* (Roche).

Para la extracción de DNA plasmídico a partir de cultivos bacterianos líquidos, se utilizó el kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), para extracciones a pequeña escala, y el kit *QIAGEN Plasmid Maxi* (Qiagen), para extracciones a gran escala.

En el caso de la extracción de RNA a partir de fibroblastos, linfoblastos o líneas inmortalizadas,

se utilizó el reactivo *Tripure Isolation Reagent* (Invitrogen) o bien el kit *MagNA Pure Compact RNA Isolation* (Roche) en el aparato *MagNA Pure Compact* (Roche).

3.2.2. Amplificación de DNA

3.2.2.1. Amplificación de DNA genómico (gDNA)

Se amplificaron 250-500 ng de gDNA mediante la polimerasa *Fast Start* (Roche), siguiendo las indicaciones del proveedor y oligonucleótidos específicos para el segmento en cuestión (Tabla 1), en un termociclador Veriti (Applied Biosystems).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de gDNA

Gen	Nombre Oligo	Secuencia (5'-3')
ALDH7A1	<i>ALDH7A1</i> Ex1 Sall Minigen A	CATGTCGACGCAAAGACCAGCAAGCTCTC
ALDH7A1	<i>ALDH7A1</i> Ex1 Minigen B	CTGGATGCGGTAGTAGCATG
TMEM165	<i>TMEM165</i> Ex4 Minigen A	GCAGGAACTGTATTTTATAATTTTACC
TMEM165	<i>TMEM165</i> Ex4 Minigen B	CTCAACCTCCCAGGCTCA

Tras la amplificación, los fragmentos obtenidos se visualizaron mediante un gel de agarosa (Conda), 4% (v/v) Bromuro de Etidio.

3.2.2.2. Amplificación de DNA codificante (cDNA)

3.2.2.2.1 RT-PCR

El cDNA se obtuvo a través de la retrotranscripción de 1,5µg de RNA total extraído mediante el kit *SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen), utilizando OligodT u oligonucleótidos específicos y siguiendo las instrucción de la casa comercial. Posteriormente se procedió a amplificar el cDNA obtenido mediante PCR con oligonucleótidos específicos (Tabla 2) y la polimerasa *Fast Start* (Roche) siguiendo las instrucción del proveedor. Los fragmentos obtenidos se visualizaron mediante un gel de agarosa.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cDNA

Gen	Nombre Oligo	Fragmento	Secuencia (5'-3')
Minigen	SD6	Producto Minigen	TCTGAGTCACCTGGACAACC
Minigen	SA2	Producto Minigen	ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC
Minigen	<i>ALDH7A1</i> Minigen A	ProductoMinigen <i>ALDH7A1</i>	CGACCCAGCAGCTCTCTTGG
ALDH7A1	cDNA <i>ALDH7A1</i> A	Ex1-5	GCAAAGACCAGCAAGCTCTC
ALDH7A1	cDNA <i>ALDH7A1</i> Ex5-6 B	Ex1-5	GGCCAGATCTTTCAGAAGGC
TMEM165	cDNA <i>TMEM165</i> Ex2 A	Ex2-5	GCTTGCCTGGGACTAATGA
TMEM165	cDNA <i>TMEM165</i> Ex6 B	Ex2-5	AAGGGGTCAGTGCTGAAAGA
TMEM165	cDNA <i>TMEM165</i> Ex4-5 A	Ex5	AGCTAGAGAGGACCCCTATG

En el caso de una posterior PCR a tiempo real (qPCR), la retrotranscripción se realizó con el *High capacity RNA to cDNA kit* (Applied Biosystems), siguiendo las indicaciones del proveedor.

3.2.2.2. qRT-PCR

La qPCR se llevó a cabo con *SYBR Master Mix* (Applied Biosystems) y oligonucleótidos específicos (Tabla 2). La amplificación y el análisis se realizó en un *LightCycler 480* de Roche y los datos fueron normalizados utilizando el gen de expresión constitutiva *GAPDH*. La obtención de resultados, del parámetro *Relative Quantity (RQ)*, que nos permite comparar la cantidad de mRNA en los distintos extractos, se llevó a cabo mediante el análisis matemático de los datos obtenidos, *crossing point (Cp)* o *cycle threshold (Ct)*, de la siguiente manera:

$$\Delta Ct = (Ct \text{ del gen de estudio} - Ct \text{ del gen constitutivo [GAPDH]})$$

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ de una muestra} - \Delta Ct \text{ de la muestra de referencia})$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

3.2.3. Purificación de fragmentos de DNA

Los fragmentos de DNA obtenidos tras la amplificación fueron purificados con el *SpinClean PCR Purification kit* (MBiotech), para una posterior secuenciación. En el caso de la purificación de fragmentos de DNA a partir de un gel de agarosa se utilizó el *QIAEX II Gel Extraction Kit* (Qiagen).

3.2.4. Secuenciación de DNA

La secuenciación de los fragmentos purificados de DNA o de DNA plasmídico, se llevó a cabo empleando el método enzimático de terminación de cadena de DNA por incorporación de dioxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) descrito por (Sanger *et al.*, 1977). Se empleó el *Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems) con la posterior resolución en un secuenciador automático *ABI Prism 3730* (Applied Biosystems).

3.2.5. Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida mediante el proceso de PCR se realizó con el *Quickchange Site Directed Mutagenesis kit* (Stratagene), siguiendo las indicaciones del proveedor y con oligonucleótidos específicos (Tabla 3).

Para la obtención de las diferentes variantes alélicas del gen *PMM2* se usó el plásmido de expresión procariota pDEST17-D18 portador de la secuencia codificante de la proteína *PMM2* con

cola de histidinas (apartado 3.1.4). En el caso de las mutaciones de ratón estudiadas, el plásmido que se usó como molde fue pReceiver-B01 en el que se encuentra incluido el cDNA de *Pmm2* con cola de histidinas (apartado 3.1.4).

Para la generación de los mutantes de los estudios en un sistema eucariota, el plásmido molde empleado fue el vector pReceiver-Lv101 en el que se encuentra incluido el cDNA de *PMM2* junto con la secuencia codificante de la etiqueta FLAG en la región N-terminal (apartado 3.1.4).

Para la obtención de la secuencia WT del minigen construido para el estudio de la mutación c.792+182G>A en *TMEM165*, se llevó a cabo una mutagénesis dirigida con oligonucleótidos específicos (Tabla 3), usando como molde la construcción obtenida de la ampliación del gDNA del paciente.

Tabla 3. Oligonucleótidos específicos empleados en la mutagénesis dirigida. El nucleótido subrayado representa la localización de la mutación.

Gen	Cambio nucleotídico (Cambio aminoácido)	Nombre Oligo	Secuencia (5'-3')
<i>TMEM165</i>	NP	<i>TMEM165</i> Mutag Minigen A	GCTACCTGCAGGT <u>G</u> AAATTCCTGTAAC
<i>TMEM165</i>	NP	<i>TMEM165</i> Mutag Minigen B	GTTACAAGAATTT <u>C</u> ACCTGCAGGTAGC
<i>PMM2</i>	c.131T>C (p.V44A)	PMM2 V44A A	CAAAATCGGAGTGG <u>C</u> AGGCGGATCG
<i>PMM2</i>	c.131T>C (p.V44A)	PMM2 V44A B	CGATCCGCTG <u>C</u> CACTCCGATTTTG
<i>PMM2</i>	c.193G>T (p.D65Y)	PMM2 D65Y A	GTGGTTGAAAAATAC <u>I</u> ATTATGTGTTCCAG
<i>PMM2</i>	c.193G>T (p.D65Y)	PMM2 D65Y B	CTGGAAACACATAAT <u>A</u> GTATTTTCAACCAC
<i>PMM2</i>	c.338C>T (p.P113L)	PMM2 P113L A	CGAAAATTA <u>A</u> ACTCC <u>I</u> GAAGAAGAGGGG
<i>PMM2</i>	c.338C>T (p.P113L)	PMM2 P113L B	CCCCTCTTCT <u>C</u> AGGAGTTTAATTTTCG
<i>PMM2</i>	c.368G>A (p.R123Q)	PMM2 R123Q A	GGGGTACTTTTATTGAATTC <u>A</u> AAATGGGATGTTAAACGTGTCC
<i>PMM2</i>	c.368G>A (p.R123Q)	PMM2 R123Q B	GGACACGTTTAAACATCCCATTT <u>I</u> GGAATTCATGAAAGTACCCC
<i>PMM2</i>	c.422G>A (p.R141H)	PMM2 R141H A	CCAAGAAGAAC <u>A</u> CATTGAGTTCTACGAAC
<i>PMM2</i>	c.422G>A (p.R141H)	PMM2 R141H B	GTTCTAGAACTCAATG <u>I</u> GTTCTTCTTGG
<i>PMM2</i>	c.484C>T (p.R162W)	PMM2 R162W A	GTTTGTAGCAGATCTA <u>T</u> GGAAGAGTTTGCTGG
<i>PMM2</i>	c.484C>T (p.R162W)	PMM2 R162W B	CCAGCAAACCTTTCC <u>A</u> TAGATCTGCTACAAAC
<i>PMM2</i>	c.620T>C (p.F207S)	PMM2 F207S A	CGGTTATAAGACCATTTATTTCT <u>T</u> GAGACAAAACATGCCAGG
<i>PMM2</i>	c.620T>C (p.F207S)	PMM2 F207S B	CCTGGCATAGTTTTGTCTC <u>A</u> GAGAAATAATGGTCTTATAACCG
<i>PMM2</i>	c.710C>T (p.T237M)	PMM2 T237M A	GCCTGAGGACA <u>I</u> GCAGGATCTG
<i>PMM2</i>	c.710C>T (p.T237M)	PMM2 T237M B	CAGATCCTGC <u>G</u> ATGCTCTCAGGC
<i>PMM2</i>	c.722G>C (p.C241S)	PMM2 C241S A	GACACGCGCAGGATCT <u>T</u> GAACTGCTGTTCTCC
<i>PMM2</i>	c.722G>C (p.C241S)	PMM2 C241S B	GGAGAACAGCAGTTCA <u>G</u> AGATCCTGCGCGTGTC
<i>Pmm2</i>	c.354C>G (p.F118L)	Pmm2 F118L A	GGGGAACTTTATTGAAT <u>T</u> GCAATGGCATGTTGAATG
<i>Pmm2</i>	c.354C>G (p.F118L)	Pmm2 F118L B	CATTCAACATGCCATTT <u>C</u> GAAATTCATGAAAGTTCCCC
<i>Pmm2</i>	c.310_311delinAC (p.R137H)	Pmm2 R137H A	GCAGCCAAGAAGAAC <u>A</u> CATTGAATTCTACG
<i>Pmm2</i>	c.310_311delinAC (p.R137H)	Pmm2 R137H B	CGTAGAATTCAT <u>T</u> GTTCTTCTGGCTGC

TMEM165 NM_000303.2; *PMM2* NM_018475.4; *Pmm2* NM_016881.2

NP: No procede

3.2.6. Clonaje y transformación bacteriana

Las secuencias de interés a clonar en el vector pSPL3 se amplificaron con oligonucleótidos específicos (Tabla 1) a partir de gDNA de un control y del paciente en el caso de la construcción del gen *ALDH7A1* y sólo del paciente en el caso de la construcción del gen *TMEM165*, el cual se sometió posteriormente a una mutagénesis dirigida para obtener la construcción WT. Los productos de estas amplificaciones se clonaron en el vector *TOPO TA v.2.1* (Invitrogen), se transformaron en bacterias *TOPO One Shot Mach®1T1R* (Invitrogen) mediante choque térmico (30 minutos a 4°C, 45 segundos a 42°C y 2 minutos a 4°C) y posterior siembra en LB-agar con el antibiótico adecuado y se seleccionaron los clones positivos mediante su escisión con enzimas de restricción y secuenciación.

Debido a la naturaleza del vector pSPL3, el fragmento a estudio clonado debe presentar, al menos, un sitio aceptor y otro donador de *splicing* (Figura 6), por lo que en el caso de la construcción del gen *ALDH7A1*, era necesaria la clonación de otra región exónica con un sitio aceptor de *splicing* que precediera al exón 1 a estudio. Para ello, se utilizó una construcción ya generada en el laboratorio con el fragmento exón2-exón1 del gen de la sepiapterina reductasa (*SPR*) introducido en el vector *TOPO TA v.2.1* (Invitrogen). En la amplificación del exón 1 del gen *ALDH7A1* se introdujo, en el extremo 5' del fragmento mediante un oligonucleótido específico (Tabla 1), la diana de restricción de la enzima *Sall*, para poder clonar este fragmento en la construcción mencionada anteriormente.

Una vez seleccionados los clones en el vector *TOPO TA v.2.1* (Invitrogen), se procedió a la escisión de los fragmentos con la enzima de restricción *EcoRI*, en el caso del minigen de *TMEM165* y con *BamHI* y *EcoRV* en el caso del minigen de *ALDH7A1*. Una vez liberados y purificados los fragmentos con el *QIAEX II Gel Extraction kit* (Qiagen), se subclonaron en el vector pSPL3 debidamente digeridos con las enzimas de restricción correspondientes en cada caso (Figura 6) y defosforilado con el kit *TSAP (Thermostable Alkaline Phosphatase)* (Promega) en el caso de la digestión con la enzima de restricción *EcoRI*, para evitar su religamiento. Los clones positivos se seleccionaron mediante escisión con enzimas de restricción y secuenciación.

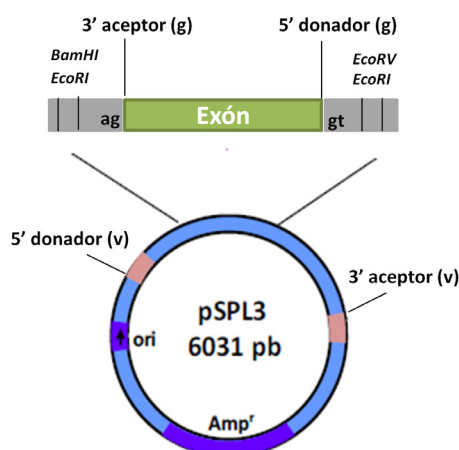


Figura 6. Esquema del vector pSPL3. Se muestran las dianas de las enzimas de restricción empleadas en el clonaje, así como los sitios 3' aceptor y 5' donador de *splicing* de la secuencia genómica (g) a estudio y del vector (v). *Amp^r*: Gen de resistencia a ampicilina. Ori: Origen de replicación.

3.2.7. Cultivo celular

Los cultivos primarios de fibroblastos derivados de biopsias de piel, tanto de individuos control como de pacientes, así como las líneas establecidas, se cultivaron en medio mínimo esencial (MEM, Eagle), suplementado con 1% glutamina 200 mM (GibcoBRL), suero fetal bovino (FBS, Sigma) al 10% (v/v), penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 µg/mL (Antibióticos S.A.) a 37°C y 5% CO₂. En el caso de las líneas establecidas de fibroblastos de pacientes fueron mantenidas con 0,5 µg/mL de puomicina, así como las líneas transfectadas de manera estable con el vector lentiviral de *PMM2* con 250 µg/mL de geneticina.

Los linfoblastos derivados de muestras de sangre fueron cultivados en suspensión en medio *Roswell Park Memorial Institute (RPMI)* suplementado como se ha descrito anteriormente.

Las células crecidas de manera adherente fueron recogidas con una solución de tripsina 0,25% y EDTA 0,02% (Difco Laboratorios), y sedimentadas mediante centrifugación, mientras que las células crecidas en suspensión, fueron simplemente sedimentadas mediante centrifugación.

3.2.8. Infección con lentivirus

Para la producción de lentivirus portadores del vector de expresión de *PMM2*, se sembraron $4,5 \times 10^6$ células HEK-293T en una p100, se transfectaron con OPTIMEM utilizando 36 µl de *Lipofectamina*, 24 µl de *Plus reagent* (Life Technologies), 10 µg del vector pReceiver-Lv101 portador del cDNA de *PMM2*, 5 µg del vector pCMv-dR8.74 (empaquetador) y 5 µg del vector pMD2.G (proteínas de la cubierta). A las 48 horas, el medio conteniendo los virus fue recogido y filtrado (0,45 µm) para eliminar posibles restos celulares. Este medio se utilizó para la posterior infección de los fibroblastos derivados de pacientes con 4 µg/mL de polibreno. Las células infectadas fueron seleccionadas con geneticina 500 µg/mL.

3.2.9. Transfección

Para el estudio de expresión de minigenes, se sembraron 7×10^5 células COS-7 en una botella T25, se transfectaron con MEM completo utilizando 10 µl de *Jetpei* (Polyplus Transfection) y 3,5 µg de vector en el caso de la construcción del gen *ALDH7A1*. Para la construcción del gen *TMEM165*, se sembraron $3,5 \times 10^5$ células Hep3B en placa P6, se transfectaron con MEM completo utilizando 3 µl de *Jetpei* y 1,5 µg de la construcción. Tras 24 horas, las células fueron recogidas y se llevó a cabo el estudio del perfil transcripcional con oligonucleótidos específicos del vector, SD6 y SA2, o con uno específico de la construcción y el SA2 en el caso de la construcción del gen *ALDH7A1* (Tabla 2).

Para el estudio del efecto de los oligonucleótidos antisentido tipo morfolino (PMOs) (Gene

Tools), se sembraron células derivadas del paciente en placas P6, P12 o P24, dependiendo del experimento. A las 24h se añadió el PMO específico diseñado por la casa comercial Gene Tools que hibrida con el nuevo sitio críptico de *splicing* generado o activado, utilizando *Endo-porter* (Gene Tools) como agente de transfección. En el caso de los linfoblastos derivados de pacientes con PDE, las células se sembraron sin suero y a las 4 horas de añadir el PMO se añadió suero para una concentración final del 5%. Como control, se utilizó un PMO de secuencia aleatoria (Tabla 4).

Tabla 4. PMOs utilizados en el tratamiento de células derivadas de pacientes. El nucleótido subrayado representa la localización de la mutación.

Oligonucleótido antisentido	Secuencia (5'-3')
PMO <i>ALDH7A1</i>	CCCAGCTTCCATTATACACA <u>CC</u> CTC
PMO <i>TMEM165</i>	GCTTGGTTACAAGAATTT <u>AC</u> CTGC
PMO Control	CCTCTTACCTCAGTTACAATTATA

3.2.10. Medida de citotoxicidad

La cuantificación de la citotoxicidad de los compuestos se llevó a cabo sembrando 10^4 fibroblastos control en placa p96. A las 24 horas se añadieron los compuestos y se incubaron durante 48 horas. La medida de viabilidad celular se realizó con el kit *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega) siguiendo las instrucciones del proveedor. La medida de la absorbancia a 490 nm se realizó en un lector *FLUOstar OPTIMA* (BMG LABTECH).

3.2.11. Cuantificación de la cantidad de proteína

En el caso de los extractos totales y el extracto de mitocondrias, la cuantificación de proteínas se llevo a cabo mediante el método de *Bradford* (Protein Assay, BioRad) siguiendo las instrucciones de la casa comercial y usando como patrón la albúmina de suero bovino (BSA).

En el caso de la proteína purificada, se cuantificó con el aparato Nanodrop (ThermoScientific) gracias a su absorbancia intrínseca a 280 nm y se calculó su concentración mediante la ley de Lambert-Beer y el coeficiente de extinción molar de la proteína unida a histidinas tanto humana como de ratón ($23755 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) obtenido mediante la herramienta disponible en www.expasy.ch/tools/protparam.html.

3.2.12. Separación electroforética de proteínas en geles SDS-PAGE

Los extractos de proteína total procedentes de fibroblastos y linfoblastos fueron obtenidos mediante choque térmico, 3 ciclos $37^\circ\text{C}-\text{N}_2$ líquido, en tampón fosfato e inhibidor de proteasas *Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (Roche). En algunos casos se procedió a lisar las células con tampón de lisis, tritón 1%, glicerol 10%, NaCl 150 mM, Tris HCl 10 mM, pH 7,5 e

inhibidor de proteasa *Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (Roche), agitando durante 20 minutos a 4°C y centrifugando posteriormente.

Las muestras anteriores, así como las procedentes de lisados bacterianos, de extracción de mitocondrias y del sistema de transcripción y traducción *in vitro*, fueron preparadas añadiendo 1µl de DTT 1 mM, el correspondiente tampón de carga *NuPAGE LDS Sample Buffer 4x* (Invitrogen) y siendo hervidas durante 5 minutos.

Estas muestras se separaron electroforéticamente en condiciones reductoras en geles de acrilamida/bis-acrilamida (Serva) al 12% o 15%, empleando una solución Tris 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,1% (p/v). En algunos casos se utilizaron geles NuPAGE Bis-Tris al 10% (Invitrogen) con tampón de electroforesis *MES (2-(Nmorpholino) ethanesulfonic acid)* 1x (Invitrogen).

Para la determinación de los pesos moleculares de las proteínas se utilizó el marcador de peso molecula *Prosieve Color Protein Marker* (Lonza).

3.2.13. Tinción de geles SDS-PAGE con azul de Coomassie

Se empleó una disolución de azul de Coomassie R-250 al 2% para teñir los geles SDS-PAGE, durante 20 minutos y se destiñeron con una disolución 2:2:0,5 metanol: agua: ácido acético.

3.2.14. Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas

Tras la electroforesis, los geles SDS-PAGE se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (Whatman) con el equipo *Mini Protean III* (BioRad) durante 1 hora a 100 V o con el *iBlot System*, con *iBlot Gel TranferStacks Nitrocellulose Regular* (Invitrogen) durante 7 minutos a 20 V. Las membranas se bloquearon con solución de bloqueo, leche 5%, PBS Tween 0,05%, durante 1 hora y posteriormente se incubaron en solución de bloqueo con el anticuerpo primario correspondiente:

- ANTIQUITINA: Anticuerpo monoclonal anti-Antiquitina (Epitomics) diluido 1:5.000.
- TMEM165: Anticuerpo policlonal anti-TMEM165 (Sigma) diluido 1:1.000.
- PMM2: Anticuerpo policlonal anti-PMM2 (Abnova) diluido 1:1.000.
- TUBULINA: Anticuerpo monoclonal anti-Tubulina (Sigma) diluido 1:5.000.
- HSP70Mit: Anticuerpo monoclonal anti-HSP70Mit (Thermo Scientific) diluido 1:5.000.

- HISTIDINAS: Anticuerpo monoclonal anti-polihistidinas (Sigma) diluido 1:3.000.

Tras la incubación con el anticuerpo primario se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS *Tween* 0,05% y se incubó en solución de bloqueo con el correspondiente anticuerpo secundario unido a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology). Tras la incubación con el anticuerpo secundario se procedió a lavar de nuevo la membrana y por último se realizó la detección mediante quimioluminiscencia utilizando ECL (GE Healthcare) y películas de rayos X *RP2 PLUS* (AFGA).

En algunos casos, para poder realizar una segunda detección, las membranas fueron sometidas a deshibridación de los anticuerpos con glicina 0,2 M en PBS *Tween* 0,05% a 80°C durante 20 minutos. A continuación, se bloquearon de nuevo y se continuó con el proceso de inmunodetección como se ha descrito.

Para escanear las películas y densitometrar las bandas obtenidas se utilizó el escáner Bio-Rad G-8000 y el *software Quantity One* (BioRad).

3.2.15. Aislamiento de mitocondrias

La extracción de mitocondrias de linfoblastos derivados de paciente se realizó por homogenización y centrifugación diferencial a 4°C en una solución sacarosa 25 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 2 mM, pH 7,4 e inhibidor de proteasas *Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (Roche), siguiendo el protocolo descrito por Old y De Vivo, 1989 y posteriormente, resuspendidas en 40µl de una solución sacarosa 25 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 2 mM, pH 7,4.

3.2.16. Inmunofluorescencia

Para la inmunodetección de las proteínas TMEM165 y GM130, se sembraron 8×10^4 fibroblastos por pocillo en placa p24 sobre un cubreobjetos de 15 mm de diámetro (Thermo Scientific). Las células se fijaron durante 20 minutos con Formalina 10% y se trataron con glicina 0,1 M en PBS durante 15 minutos. Posteriormente, se incubaron durante 30 minutos con solución de bloqueo, Tritón 0,1%, BSA 1%, FBS 20% y seguidamente con la mezcla de los anticuerpos primarios TMEM165 (Sigma) y GM130 (BD Biosciences) diluidos 1:300 en solución de bloqueo durante 1 hora. Después de lavarlos 3 veces con PBS, se incubaron durante 1 hora con la mezcla de los correspondientes anticuerpos secundarios unidos cada uno a un fluoróforo diferente, *anti-Rabbit Alexa 488* (Invitrogen) y *anti-Mouse Alexa 594* (Invitrogen), diluidos 1:500 en solución de bloqueo. Tras esta incubación, se lavaron con PBS y se procedió a la tinción de los núcleos celulares con DAPI (Merk) diluido 1:2.500 en PBS durante 5 minutos. Finalmente, se deshidrataron con etanol y se montaron con el medio de montaje *Prolong Gold Antifade* (Invitrogen).

Las muestras fueron visualizadas mediante un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) y las fotos fueron tomadas con una cámara digital C9100-02 (Hamamatsu).

El análisis posterior de las imágenes, así como su cuantificación se realizó con el *software Fiji* (<http://fiji.sc/Fiji>).

3.2.17. Expresión de la proteína PMM2 en un sistema procariota

Las proteínas PMM2 humana y de ratón se expresaron en *E.coli* (BL21 Star™DE3 One Shot® de Invitrogen). Las bacterias fueron transformadas con el plásmido correspondiente (apartado 3.1.4), tanto WT como los portadores de las distintas mutaciones y se indujo su expresión mediante el medio TYM (modificado del método de autoinducción de Studier, 2005, sustituyendo N-Z-amina por triptona) durante toda la noche. Las bacterias fueron recolectadas mediante centrifugación, resuspendidas en Hepes 20 mM, KCl 25 mM, DTT 1 mM e inhibidor de proteasas 1X *Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (Roche), sonicadas y finalmente centrifugadas.

3.2.18. Purificación de la proteína PMM2

La purificación de la proteína se llevó a cabo usando un sistema ÄKTA prime (GE Healthcare) a 4°C. El extracto proteico soluble obtenido por centrifugación (apartado 3.2.17), se pasó por una columna de afinidad HisTrap™ High Performance (GE Healthcare) equilibrada con Imidazol 10 mM, NaCl 0,5 M, tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,4 y la proteína fue eluida con un gradiente de imidazol de 10mM a 1M. Posteriormente, para obtener la forma dimérica, la proteína obtenida de la cromatografía de afinidad, fue entonces cargada en una columna de exclusión molecular Superdex 200 HiLoad 16/60 (GE Healthcare) utilizando un tampón Hepes 20 mM, NaCl 0,2 M pH 7,5. El pico eluido correspondiente a la forma dimérica de PMM2 fue recogido y guardado a -70°C para futuros experimentos. Esta columna fue previamente calibrada con el *kit for Molecular Weights 12,000-200,000 for gel filtration chromatography* (Sigma). Para corroborar la presencia de la proteína pura en las diferentes fracciones eluidas, se llevó a cabo una separación electroforética en geles SDS-PAGE seguida de una tinción del gel con azul de Coomassie o seguida de una electrotransferencia e inmunodetección de la proteína purificada, como se ha descrito anteriormente (apartado 3.2.12, 3.2.13 y 3.2.14).

3.2.19. Medida de la actividad de PMM2

El método espectrofotométrico utilizado está basado en la medida de NADPH a 340 nm producida por la reacción en cadena de varias enzimas acopladas y la final reducción del NADP por la actividad de la Glucosa-6P-deshidrogenasa (de Koning *et al.*, 1998; Van Schaftingen y Jaeken, 1995).

Se incubó la reacción de actividad, doblando los reactivos descritos en de Koning *et al.*, 1998, durante 30 minutos a 37°C, conteniendo 300ng de proteína obtenida de los extractos bacterianos de la manera descrita anteriormente (apartado 3.2.17) o bien 50ng de la proteína purificada. La lectura a 340 nm se realizó en un lector *FLUOstar OPTIMA* (BMG LABTECH).

Debido a la baja expresión de la proteína PMM2 endógena en fibroblastos y a la baja reproducibilidad del método de actividad, decidimos introducir una serie de cambios en el método clásico en el caso de la medida a partir de extracto soluble de fibroblastos, con la finalidad de aumentar su reproducibilidad y sensibilidad. Estos cambios fueron, por un lado el uso de un tampón de lisis comercial y por otro lado la amplificación de la señal del producto generado en la reacción enzimática, el NADPH. Se sembraron 15.000 fibroblastos derivados de pacientes sobreexpresando la proteína en placa p96. Las células fueron lisadas directamente sobre la placa con el tampón *Complete Lysis M* (Roche). La mezcla de reacción descrita para la actividad de extracto bacteriano y proteína pura fue añadida directamente a la placa p96 y se incubó a 37°C durante 45 minutos, menos en el caso del P3 y P4 en el estudio de la recuperación de la actividad en condiciones permisivas, que las placas se incubaron 4 horas para poder detectar la recuperación. Tras la incubación, la reacción fue detenida como se describe en el método clásico y la detección del NADPH generado durante la reacción fue amplificada gracias al *Amplite Fluorimetric NADPH assay Kit Red Fluorescence* (AAT Bioquest). La lectura se realizó a 540 nm/590 nm en un lector de placas *FLUOstar OPTIMA* (BMG LABTECH). En el caso de la medición de la actividad en condiciones permisivas de plegamiento en un sistema eucariota, esta actividad se normalizó con la cantidad de proteína cuantificada mediante método de *Bradford* (Protein Assay, BioRad).

3.3.20. Differential scanning fluorimetry (DSF)

La estabilidad de los mutantes de PMM2, así como su estabilización inducida por la unión de potenciales PCs fue analizada por *differential scanning fluorimetry* (DSF) (Niesen *et al.*, 2007). Mediante este método, se monitoriza la desnaturalización térmica de la proteína gracias al fluoróforo *SYPRO Orange* (Sigma). Este fluoróforo emite fluorescencia al unirse a las regiones hidrofóbicas de la proteína que se van exponiendo progresivamente debido a su desnaturalización térmica (Figura 7). Estos cambios de fluorescencia fueron detectados a 610 nm mediante el equipo *LightCycler A480* (Roche). Se dispensaron 50µl de volumen final conteniendo 0,075 mg/ml de proteína PMM2 pura en Hepes 20 mM, NaCl 200 mM y *SYPRO Orange 5X*, en una placa *LightCycler Multiwell Plate 96* (Roche) y posteriormente se analizaron en el equipo.

En el caso del rastreo de compuestos procedentes de la *MyriaScreen Diversity Collection Library* (Sigma-Aldrich), el volumen final de reacción fue de 25µl, conteniendo además 0,08 mg/ml del compuesto y 4% DMSO (disolvente de los compuestos). En el caso de la validación de estos

compuestos el volumen final fue de 50 μl conteniendo 1 μl de la correspondiente concentración de compuesto y 2% DMSO (disolvente de los compuestos).

Las curvas de desnaturalización fueron registradas de 20°C a 85°C a una tasa de incremento de 2°C/minuto. Las curvas de fluorescencia que se obtuvieron se ajustaron a una curva sigmoideal con un parámetro de asimetría, se normalizaron y analizaron con un programa casero desarrollado para tal fin. El valor de la temperatura de *melting* (T_m), se calculó como la temperatura a la cual el 50% de las moléculas de proteína se encuentran en estado desnaturalizado.

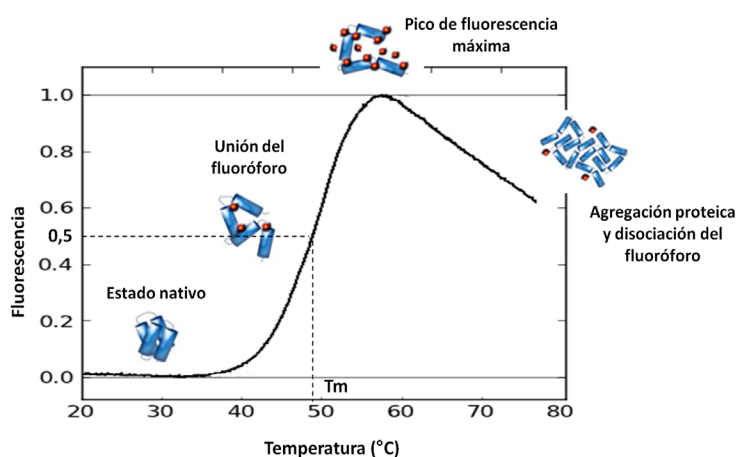


Figura 7.- Base teórica del método *Differential scanning fluorimetry* (DSF). Representación esquemática de la desnaturalización proteica y unión del fluoróforo a las regiones hidrofóbicas de la misma debido al incremento progresivo de la temperatura junto con la curva obtenida del registro de fluorescencia.

3.2.21. Síntesis *in vitro* de la proteína PMM2 y estudio del perfil de degradación

La síntesis de la proteína PMM2 humana y de ratón para el estudio de su perfil de degradación se llevó a cabo mediante el sistema de transcripción y traducción *in vitro*, *Transcription-Translation System RTS 100 E.coli HY kit* (5 PRIME), siguiendo las indicaciones del proveedor. A la mezcla se le añadió 500ng del vector correspondiente y tras 30 minutos de incubación a 30°C en el caso de la proteína PMM2 humana, y 60 minutos en el caso de la Pmm2 de ratón, la reacción fue parada con 1 μl de DNasa y 1 μl de RNasa (1 mg/mL). Esta reacción se incubó a 37°C y se fueron recogiendo muestras de 1,5 μl a diferentes tiempos. Estas muestras fueron separadas posteriormente mediante electroforesis en geles SDS-PAGE y la proteína PMM2 inmunodetectada como se ha descrito anteriormente (apartado 3.2.12 y 3.2.14).

En el caso del estudio de la estabilización de la proteína por parte de los compuestos seleccionados, se añadió a la mezcla de reacción antes de la síntesis proteica, 1 μl de compuesto a la concentración correspondiente para dejarlo a la concentración final deseada. También se realizaron los correspondientes controles con 1 μl de DMSO (disolvente de los compuestos).

3.2.22. Soporte informático y análisis *in silico*

Las secuencias tanto de los cDNAs como de los gDNAs de los genes *PMM2*, *Pmm2*, *ALDH7A1* y *TMEM165* fueron obtenidas mediante búsqueda informática en las bases de datos públicas Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) y GenBank de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las mutaciones reportadas en cada gen se consultaron en la base de datos HGMD (Stenson *et al.*, 2014) (*Human Gene Mutation Database® Professional release 2014.3*, www.hgmd.cf.ac.uk) y para su nomenclatura se han seguido las recomendaciones del HGVS (*Human Genome Variation Society*, <http://www.hgvs.org>). La numeración nucleotídica está basada en la secuencia de referencia del cDNA de la base de datos de *GenBank* con los números de acceso NM_001182.2 (*ALDH7A1*), NM_018475.4 (*TMEM165*), NM_000303.2 (*PMM2*) y NM_016881.2 (*Pmm2*).

El procesamiento y análisis de secuencias de DNA se llevó a cabo con el programa *Chromas 1.45* (*Griffith University*, Australia).

La identificación de los posibles sitios aceptores y donadores de *splicing* en una determinada secuencia se realizó mediante los programas informáticos, *Splice Site Prediction* de BDGP (*Berkeley Drosophila Genome Project*, http://www.fruitfly.org/seq_tools/other.html), HSFinder v2.4 (<http://www.umd.be/HSF/>) (Desmet *et al.*, 2009) y el programa AST (*Analyzer Splice Tool*, <http://ibis.tau.ac.il/ssat/SpliceSiteFrame.htm>).

La visualización de la estructura tridimensional de la proteína *PMM2* así como la localización de los aminoácidos mutados se realizó con el software *pymol v 1.7* (<http://www.pymol.org/>).

Los coeficientes de extinción molar, así como los pesos moleculares de las proteínas *PMM2* humana y de ratón con cola de histidinas expresadas en un sistema procariota, fueron calculados mediante la herramienta *protparam* del servidor *ExPASyTools* (<http://web.expasy.org/protparam/>). Ambos datos son necesarios para el cálculo de la concentración de la proteína purificada.

Para el estudio *in silico* del efecto de las mutaciones sobre la proteína *PMM2* se utilizó el software *FoldX v.3.0* (<http://foldx.crg.es>) y el archivo PDB 2AMY (monómero *PMM2*) obtenido de la *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). *FoldX* es un algoritmo computacional que genera una estimación cuantitativa de la importancia de las interacciones que contribuyen a la estabilidad de la proteína y de los complejos proteicos. Usa una descripción atómica de la estructura de las proteínas. Los términos energéticos que tiene en cuenta el programa han sido calculados usando datos empíricos de experimentos de ingeniería de proteínas. Para una descripción más detallada consultar Schymkowitz *et al.*, 2005a; Schymkowitz *et al.*, 2005b y <http://foldx.crg.es>. El archivo PDB utilizado fue previamente reparado usando el comando *RepairPDB*. El efecto de la

mutación es calculado mediante la sustracción de la energía libre de la proteína WT a la mutante, por lo tanto números positivos significan una menor estabilidad. La diferencia de energía libre entre el mutante y la proteína WT es obtenida en kilocalorías por mol.

El análisis de las imágenes obtenidas mediante microscopía óptica, así como su cuantificación se realizó con el *software Fiji* (<http://fiji.sc/Fiji>).

Para la cuantificación de las bandas obtenidas mediante la inmunodetección de las proteínas tras su separación electroforética en geles SDS-PAGE, se utilizó el *software Quantity One* (BioRad).

El análisis estadístico se realizó mediante el programa *IBM SPSS Statistics 21*, efectuando un análisis de varianza (ANOVA) de un factor con la corrección *post-hoc* de Bonferroni.

4. Resultados

4.1. CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES DE *SPLICING*

En esta primera parte del trabajo se describe el estudio funcional de dos mutaciones, una exónica y otra intrónica interna, las cuales afectan al proceso de *splicing*, en dos genes cuyo defecto es causante de enfermedad, *ALDH7A1* causante de PDE y *TMEM165* causante de TMEM165-CDG.

4.1.1. Estudio funcional de una mutación exónica detectada en el gen *ALDH7A1*

El análisis del perfil transcripcional estudiado mediante RT-PCR de linfoblastos de un paciente con sospecha de epilepsia dependiente de piridoxina (PDE), reveló la delección de 35 pb del exón 1 en el mRNA del paciente (Figura 8A y 8B). Mediante secuenciación directa del gDNA, se detectó una mutación “silenciosa” en el exón 1 en homocigosis, c.75C>T (Figura 8C). Se observó que este cambio provocaba la aparición de un nuevo GT, por lo que se llevó a cabo el análisis bioinformático del posible nuevo sitio críptico donador de *splicing*. Los resultados del análisis indicaron un alto valor de *splicing* para este nuevo GT, 0,77 sobre 1 con el programa informático BDGP, 84,23 sobre 100 con HSFinder y 75,65 sobre 100 con el programa AST.

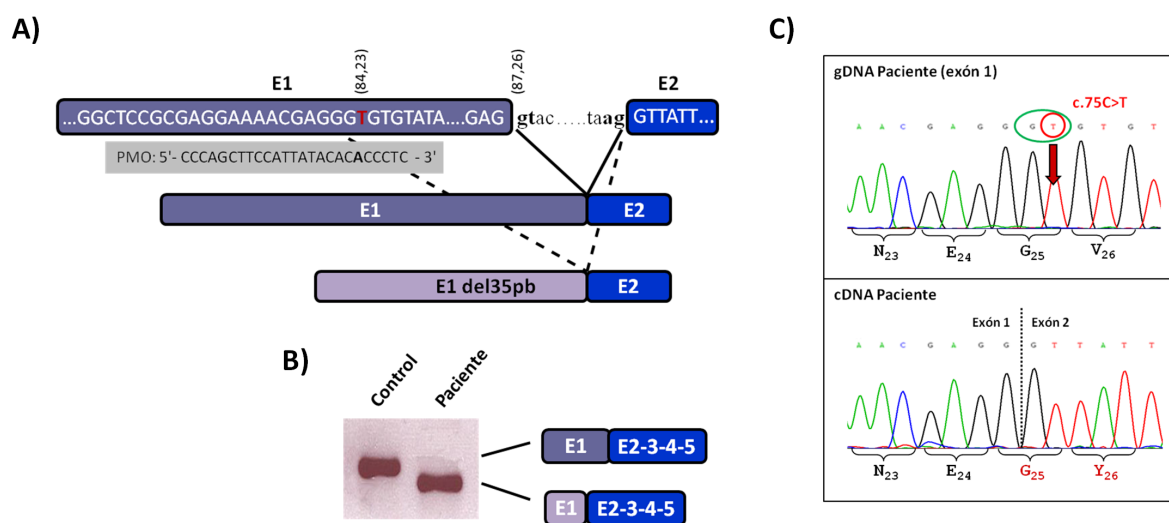


Figura 8. Análisis del perfil transcripcional del paciente con PDE portador de la mutación c.75C>T en homocigosis identificada en el gen *ALDH7A1*. **A)** Esquema de la región que contiene el cambio y representación del transcrito normal y aberrante. La secuencia del PMO empleado los experimentos descritos en el apartado 4.2.1 está representada. El valor de los sitios de *splicing* fueron estimados usando el programa HSFinder. **B)** Análisis del perfil transcripcional mediante RT-PCR de linfoblastos derivados de un control y de linfoblastos derivados del paciente portador de la mutación c.75C>T en homocigosis. **C)** Secuencia del gDNA (panel de arriba) y secuencia del cDNA (panel de abajo) del paciente. Resaltado en rojo el cambio detectado y en verde el nuevo sitio donador de *splicing* generado.

Los resultados del análisis del perfil transcripcional junto con el análisis *in silico* nos llevó a pensar que la mutación c.75C>T, que en principio parecía silenciosa, era la causante de la delección de 35pb en el mRNA del paciente. Para confirmar nuestra sospecha, se llevó a cabo el estudio funcional de la mutación en un sistema *ex vivo* de minigenes con el vector pSPL3. Para la introducción de un

sitio aceptor de *splicing* en el exón 1 a estudio, tuvimos que generar una construcción fusionando parte del exón 2 del gen *SPR* (sitio aceptor), construcción previamente creada en el laboratorio (Arrabal *et al.*, 2011), con la región del exón 1 del gen *ALDH7A1* a estudio (sitio donador) (Figura 9A).

Para el estudio del perfil transcripcional de las células transfectadas con los minigenes no se utilizaron, como usualmente, los dos oligonucleótidos situados en el vector debido a la gran variedad de transcritos obtenidos con los mismos (Resultados no mostrados). A causa de la artificialidad del sistema, la maquinaria de *splicing* era capaz de reconocer otros sitios aceptores de *splicing* en el exón 2 del gen *SPR*, por lo que se utilizó un oligonucleótido directo situado en la unión vector-exón 2 del gen *SPR* y el oligonucleótido reverso situado en el vector. Los resultados del estudio del perfil transcripcional del minigen control y del minigen portador de la mutación, transfectados en células COS-7, reveló en el caso del minigen portador de la mutación, la delección de 35pb (Figura 9B), al igual que en el perfil transcripcional del paciente (Figura 8B), confirmando así, que la mutación c.75C>T es la causante de este fenómeno y probablemente causante de enfermedad, ya que esta delección en el mRNA, si éste escapa de la degradación por parte del NMD, provoca un cambio en la pauta de lectura, que se traduce en una proteína truncada de 32 aminoácidos, p.Val26Tyrfs*8, posiblemente no funcional.

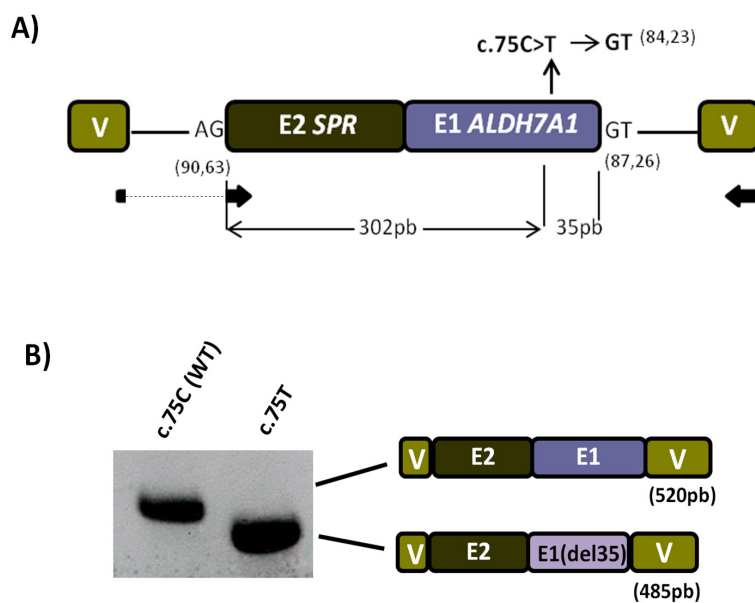


Figura 9. Estudio funcional de la mutación c.75C>T identificada en el gen *ALDH7A1* en un sistema *ex vivo* de minigenes. **A)** Representación de la construcción con la fusión de parte del exón 2 de *SPR* con la parte del exón 1 de *ALDH7A1* a estudio, y representación de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación (flechas negras). El valor de los sitios de *splicing* fueron estimados usando el programa HSFinder. **B)** Perfil transcripcional de células transfectadas con el minigen WT (c.75C) y con el minigen incluyendo el cambio (c.75T). V: Secuencias del vector.

4.1.2. Estudio funcional de una mutación intrónica interna detectada en el gen *TMEM165*

Recientemente, se ha descrito un nuevo CDG tipo II, *TMEM165*-CDG (Foulquier *et al.*, 2012). Tres de los cinco pacientes descritos, pertenecientes a dos familias diferentes, son homocigotos para la mutación intrónica interna c.792+182G>A en el gen *TMEM165*. En esta primera parte del trabajo se llevó a cabo el estudio funcional de dicha mutación.

El análisis del perfil transcripcional realizado mediante RT-PCR de fibroblastos de uno de los pacientes homocigotos para la mutación c.792+182G>A, reveló la presencia de dos transcritos de menor tamaño que el normal. En ambos se producía la inserción de 117pb del intrón 4 y la delección del exón 4 o la delección del exón 3 y 4 (Figura 10A y 10B). El análisis bioinformático reveló que el cambio c.792+182G>A provoca el aumento del valor de *splicing* del GT adyacente, de 0,5 a 0,94 con el programa informático BDGP, de 84,34 a 85,5 con HSFinder y de 77,91 a 82,88 con el programa AST.

A pesar de no detectarse transcritos normales en los fibroblastos del paciente quisimos hacer un análisis más profundo. Diseñamos un oligonucleótido específico en la unión del exón 4 y 5, de manera que solo se amplificarían los transcritos normales. El resultado mostró una presencia basal de transcritos normales en los fibroblastos del paciente (Figura 10B).

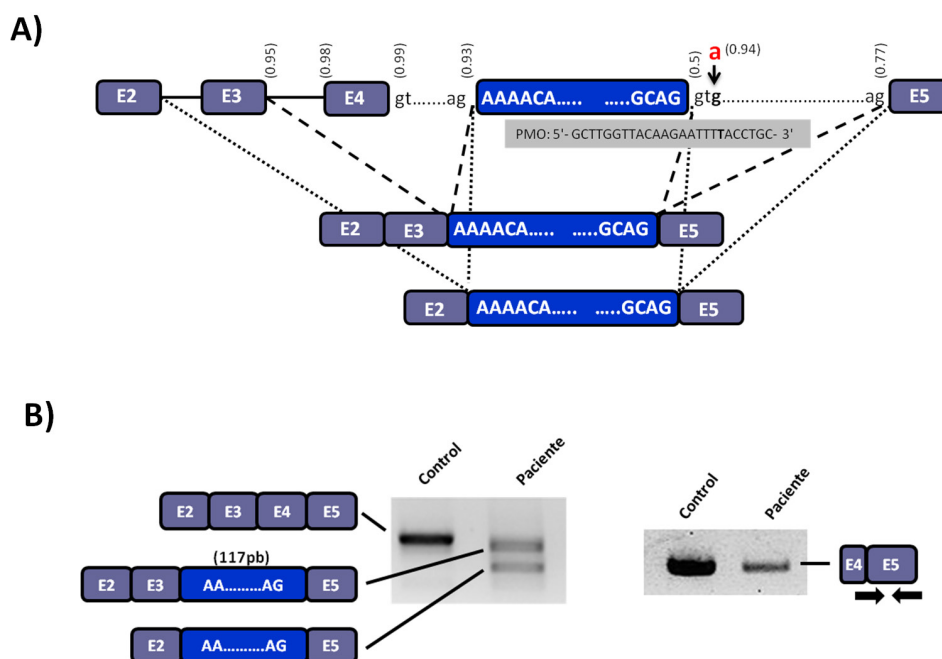


Figura 10. Análisis del perfil transcripcional del paciente con *TMEM165*-CDG portador de la mutación c.792+182G>A en homocigosis identificada en el gen *TMEM165*. A) Esquema de la región que contiene el cambio y representación de los transcritos aberrantes obtenidos en fibroblastos del paciente mediante RT-PCR. La secuencia del PMO empleado los experimentos descritos en el apartado 4.2.2 está representada. El valor de los sitios de *splicing* fueron estimados usando el programa BDGP. B) Análisis del perfil transcripcional de fibroblastos control y de fibroblastos del paciente portador de la mutación c.792+182G>A en homocigosis. Se muestra la amplificación de transcritos normales (panel de la derecha) con los oligonucleótidos específicos (fechas negras).

A continuación, se llevó a cabo el análisis funcional del cambio mediante un sistema *ex vivo* utilizando minigenes, de nuevo, con el vector pSPL3. En este vector se incluyó parte del intrón 3, el exón 4 y la parte del intrón 4 a estudio (Figura 11A). El análisis del perfil transcripcional de las células transfectadas con el minigen control y con el minigen portador del cambio, realizado con oligonucleótidos específicos del vector, mostró un perfil similar al encontrado en los fibroblastos del paciente. El cambio provocó la inserción de 117pb procedentes del intrón 4, así como la delección del exón 4 (Figura 11B). También se observó otro transcrito en el que se había producido la inserción de las 117pb y la delección parcial del exón 4 debido al reconocimiento, por parte de la maquinaria de *splicing*, de un sitio donador de *splicing* alternativo situado en el exón 4 (Figura 11B). Ésto, probablemente sea debido a la artificialidad del sistema. Estos resultados confirmaron que el cambio c.792+182G>A es el responsable de la inserción de 117pb del intrón 4, lo que se denomina pseudoexón, y la delección de al menos el exón 4 detectado en el mRNA del paciente (Figura 10B). La inserción del pseudoexón junto con la delección del exón 4 o de los exones 3 y 4 provoca, en el caso de que el transcrito escape del NMD, proteínas truncadas probablemente no funcionales.

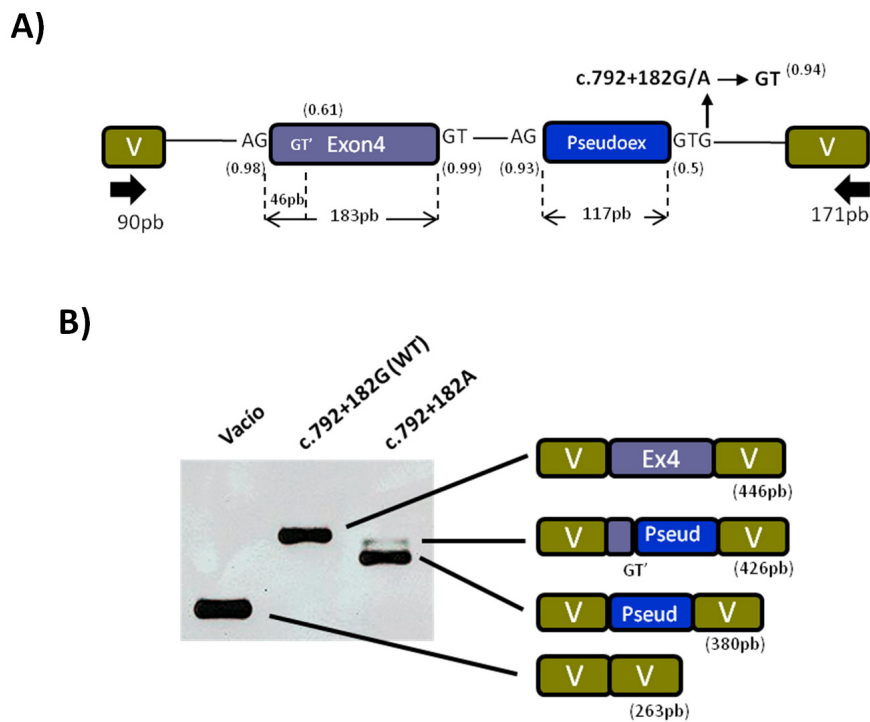


Figura 11. Estudio funcional de la mutación c.792+182G>A identificada en el gen *TMEM165* en un sistema *ex vivo* de minigenes. A) Representación de la construcción incluyendo parte del intrón 3, el exón 4 y la parte del intrón 4 a estudio del gen *TMEM165* y representación de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación (flechas negras). El valor de los sitios de *splicing* fueron estimados usando el programa BDGP. **B)** Perfil transcripcional de células transfectadas con el minigen WT (c.792+182G) y con el minigen incluyendo el cambio (c.792+182A). V: Secuencias del vector.

4.2. APROXIMACIÓN TERAPÉUTICA PARA MUTACIONES DE *SPLICING*. APLICACIÓN DE UNA TERAPIA ESPECÍFICA CON OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO

Tras el análisis funcional de dos mutaciones que afectan al proceso de *splicing*, aplicamos sobre ellas una terapia específica con oligonucleótidos antisentido que modifican el *splicing* tipo morfolino (PMO), con el fin de bloquear el nuevo sitio críptico de *splicing* generado o activado, impidiendo así la unión de la maquinaria de *splicing* y forzándola a unirse al sitio de *splicing* natural que permanece intacto.

4.2.1. Aplicación de una terapia antisentido sobre una mutación exónica detectada en el gen *ALDH7A1*

En el caso de la mutación c.75C>T detectada en el gen *ALDH7A1* causante de la delección de 35pb del exón 1, se empleó un PMO de secuencia 5' CCCAGCTTCCATTATACACACCCTC 3', dirigido específicamente contra la mutación (marcada en negrita) para bloquear el nuevo sitio donador de *splicing* generado (Figura 8A). Se probaron dos concentraciones, 30 μ M y 50 μ M además de un PMO de secuencia aleatoria como control negativo (PMO C), sobre los linfoblastos del paciente. Posteriormente se llevó a cabo el estudio del perfil transcripcional y de la proteína mediante *Western blot*.

Los resultados del estudio del perfil transcripcional tras el tratamiento con el PMO durante 24 horas mostraron una recuperación secuencia y dosis específica, pudiéndose observar una recuperación prácticamente total a 50 μ M (Figura 12A). El estudio de la antiqitina (ATQ), proteína codificada por el gen *ALDH7A1*, mediante *Western blot*, mostró la falta total de proteína en los linfoblastos del paciente y la recuperación de la misma tras el tratamiento con el PMO durante 48 horas, tanto en el extracto celular total, como en el citoplasma y en la mitocondria aislada (Figura 12B), localización de la proteína sugerida por otros autores (Wong *et al.*, 2010).

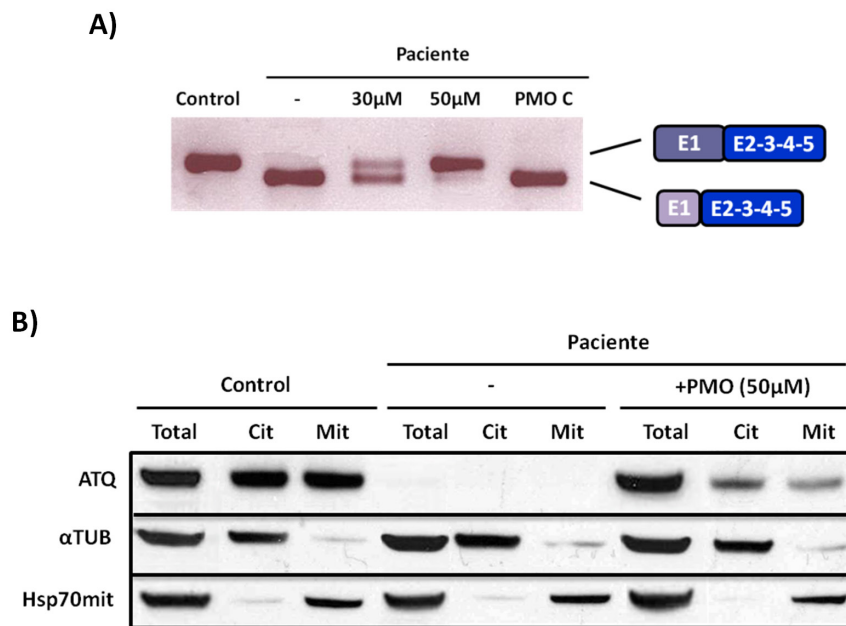


Figura 12. Terapia antisentido en linfoblastos derivados del paciente portador de la mutación c.75C>T en homocigosis identificada en el gen *ALDH7A1*. **A)** Análisis del perfil transcripcional de linfoblastos de un control y linfoblastos del paciente tratados con el PMO a 30 μM y 50 μM y con un PMO de secuencia aleatoria como control negativo (PMO C) durante 24 horas. **B)** Análisis mediante *Western blot* de la ATQ en extracto celular total, en citoplasma y en mitocondria aislada de linfoblastos control y linfoblastos del paciente sin tratar y tratados con el PMO a 50 μM durante 48 horas. La α-Tubulina (α-TUB) fue utilizada como control de carga en el caso del extracto de citoplasma y Hsp70 mitocondrial (Hsp70mit) como control de carga de las mitocondrias aisladas.

4.2.2. Aplicación de una terapia antisentido sobre una mutación intrónica interna detectada en el gen *TMEM165*

En el caso de la mutación c.792+182G>A detectada en el gen *TMEM165* causante de la inserción de 117pb del intrón 4 y la delección del exón 4 o de los exones 3 y 4, se empleó un PMO de secuencia 5' GCTTGTTACAAGAATTTACCTGC 3' dirigido contra la mutación (marcado en negrita) (Figura 10A). Se transfectaron dos concentraciones del PMO, 20 μM y 30 μM, además de un PMO de secuencia aleatoria como control negativo (PMO C) en fibroblastos del paciente y tras 24 horas de incubación, se procedió a estudiar el perfil transcripcional. Los resultados de la RT-PCR mostraron una recuperación secuencia específica y total a 20 μM y a 30 μM (Figura 13A). Para profundizar un poco más en esta recuperación, se realizó una qRT-PCR de los fibroblastos del paciente transfectados con 20 μM del PMO, con el oligonucleótido específico diseñado para amplificar exclusivamente los transcritos normales, situado en la unión del exón 4 y 5. El resultado mostró la presencia de transcritos normales en los fibroblastos del paciente, como ya habíamos detectado mediante RT-PCR, pero solo de un 2% comparado con el control. El tratamiento con el PMO mostró una recuperación significativa de 10 veces comparada con su expresión basal llegando a alcanzar el 20% comparado con el control (Figura 13B).

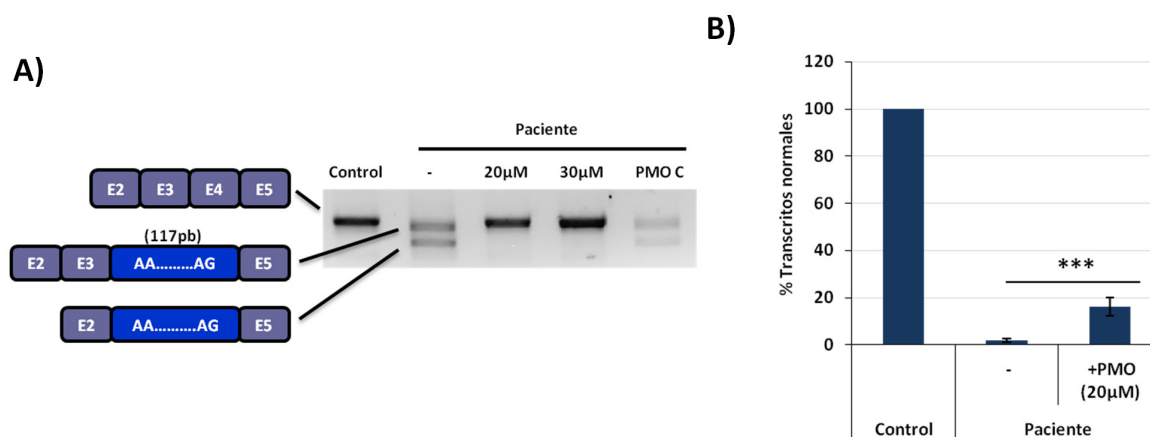


Figura 13. Análisis del perfil transcripcional tras una terapia antisense en fibroblastos derivados del paciente portador de la mutación c.792+182G>A en homocigosis identificada en el gen *TMEM165*. **A)** Análisis del perfil transcripcional mediante RT-PCR de fibroblastos de un control y fibroblastos del paciente tratados con el PMO a 20 μM y 30 μM y con un PMO de secuencia aleatoria como control negativo (PMO C) durante 24 horas. **B)** Análisis de la expresión de transcritos normales mediante qRT-PCR de fibroblastos de un control y fibroblastos del paciente tratados con el PMO (20 μM) durante 24 horas. ***p<0,001.

Para determinar si la recuperación del perfil transcripcional por parte de PMO, se traducía en un recuperación de la proteína *TMEM165*, se llevó a cabo su detección mediante *Western blot* en los fibroblastos del paciente tratados con el PMO a 20 μM durante 48 horas. Los resultados mostraron una leve presencia de la proteína en fibroblastos del paciente y una recuperación de alrededor 3 veces respecto a su expresión basal tras el tratamiento con el PMO, alcanzando cerca de un 60% comparado con el control (Figura 14A).

Por último, para cuantificar esta recuperación y determinar la localización de la proteína recuperada, se llevó a cabo una inmunofluorescencia de *TMEM165*, así como del marcador de Golgi *GM130*, lugar donde se localiza la proteína a estudio (Demaegd *et al.*, 2013; Rosnoble *et al.*, 2013). En este ensayo se incluyeron dos líneas derivadas de dos pacientes *TMEM165*-CDG, uno homocigoto y otro heterocigoto compuesto para mutaciones *missense*, P2 y P3 (genotipos en abla de la Figura 14B). Los resultados mostraron la expresión basal de la proteína localizada en Golgi en las células del paciente, alrededor de un 20% comparado con el control, y una recuperación significativa de tres veces comparado con su basal y alcanzando un 60% comparado con el control, tras el tratamiento con el PMO a 20 μM durante 48 horas, resultados similares a los obtenidos mediante *Western blot*. Además se observó la correcta localización de la proteína *TMEM165* recuperada en aparato de Golgi (Figura 14B). Por otra parte, no se detectó ninguna recuperación tras el tratamiento con el PMO en las células de los pacientes portadores de mutaciones *missense*, confirmando así que la recuperación de la proteína es secuencia específica (Figura 14B).

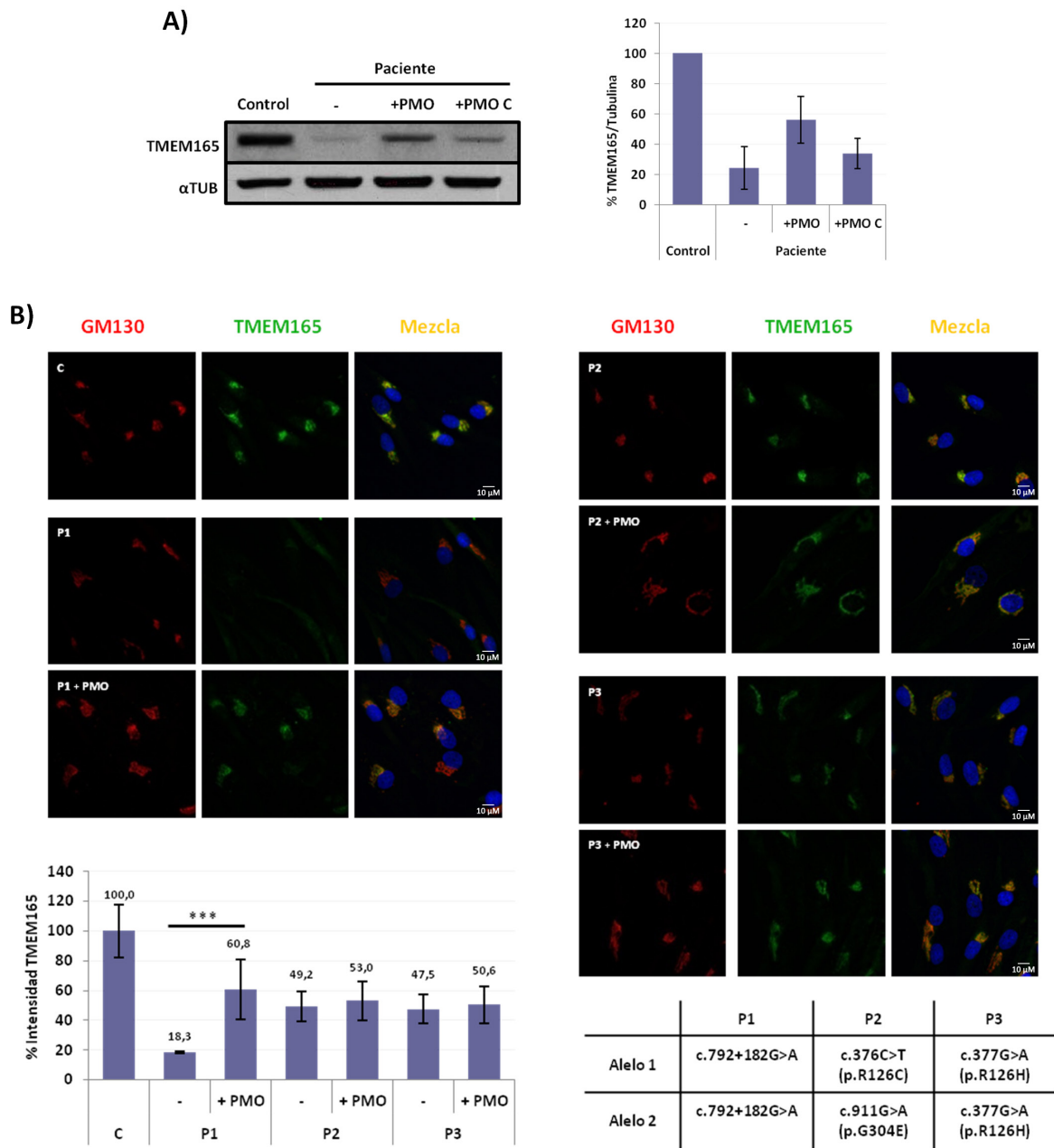


Figura 14. Estudio de la expresión proteica de TMEM165 tras la aplicación de una terapia antisentido en fibroblastos derivados de pacientes TMEM165-CDG. A) Análisis mediante *Western blot* de TMEM165 en extracto total de fibroblastos control y fibroblastos del paciente portador de la mutación c.792+182G>A en homocigosis, sin tratar, tratados con el PMO (20 μ M) y tratados con un PMO de secuencia aleatoria (PMO C) durante 48 horas. Cada muestra fue normalizada respecto a su control de carga (α -Tubulina). **B)** Inmunofluorescencia indirecta doble de fibroblastos control sin tratar y fibroblastos de pacientes, P1, P2 y P3 (genotipos indicados en la tabla) sin tratar y tratados con el PMO (20 μ M) durante 48 horas. Se realizó un marcaje doble de las células con el anticuerpo anti-TMEM165 (verde) y el anticuerpo del marcador de Golgi anti-GM130 (rojo). La gráfica muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia obtenida del marcaje de TMEM165 de al menos 60 fotos de dos experimentos independientes. *** p <0,001.

4.3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MUTACIONES *MISSENSE* DETECTADAS EN EL GEN *PMM2* CAUSANTES DE *PMM2*-CDG

Con el fin de profundizar en los mecanismos moleculares subyacentes a mutaciones descritas en pacientes *PMM2*-CDG, decidimos estudiar 9 mutaciones *missense*, p.V44A (c.131 T>C), p.D65Y (c.193 G>T), p.P113L (c.338 C>T), p. R123Q (c.368 G>A), p.R141H (c.422 G>A), p. R162W (c.484 C>T), p.F207S (c.620 T>C), p.T237M (c.710 C>T) y p. C241S (c.722 G>C), las cuales son prevalentes en la población española (Perez *et al.*, 2011) y que, en general, han sido reportadas en combinación con la mutación p.R141H, a excepción de ella misma, que no ha sido descrita en homocigosis (Matthijs *et al.*, 1998; Schollen *et al.*, 2000). El estudio funcional se realizó en un sistema procariota de expresión, sobreexpresando la proteína de fusión His₆*PMM2*, a la cual nos referiremos de aquí en adelante simplemente como *PMM2*. Se estudió el perfil de oligomerización, la actividad enzimática, y la estabilidad, mediante *differential scanning fluorimetry* (DSF) y mediante el estudio del perfil de degradación de la proteína WT y de los mutantes mencionados.

A este estudio funcional se añadieron dos mutantes de *Pmm2*, p.F118L (c.354C>G) y p.R137H (c.310_311delinsAC), descritos en un ratón modelo de enfermedad *PMM2*-CDG (Schneider *et al.*, 2012). Esta última mutación es análoga a la mutación descrita en humanos, p.R141H, también incluida en este estudio. El objetivo de incluir estos dos mutantes de *Pmm2* fue indagar en los mecanismos moleculares subyacentes al éxito del tratamiento con manosa aplicado a este ratón y su posible uso como modelo animal para el testaje de posibles terapias específicas de mutación.

Adicionalmente, se realizó el estudio de la actividad y cantidad de proteína de los mutantes p.V44A, p.D65Y, p.R162W y p.T237M en un sistema eucariota en condiciones permisivas de plegamiento (28°C).

4.3.1. Análisis funcional de mutantes de *PMM2* en un sistema procariota

4.3.1.1. Estudio del perfil de oligomerización de los mutantes de *PMM2*

Los diferentes estados de oligomerización de los mutantes fueron analizados mediante cromatografía de exclusión molecular. Tanto la proteína WT como los mutantes, fueron purificados, primero mediante cromatografía de afinidad gracias a su fusión con la etiqueta de 6 Histidinas y posteriormente mediante cromatografía de exclusión molecular, obteniendo así el perfil de oligomerización y la proteína purificada en forma de homodímero. Cabe destacar, que la cantidad de proteína pura obtenida de todos los mutantes de *PMM2* humanos partiendo la misma cantidad de extracto bacteriano fue de menos del 35% comparada con la proteína WT (Figura 15B y Tabla 5).

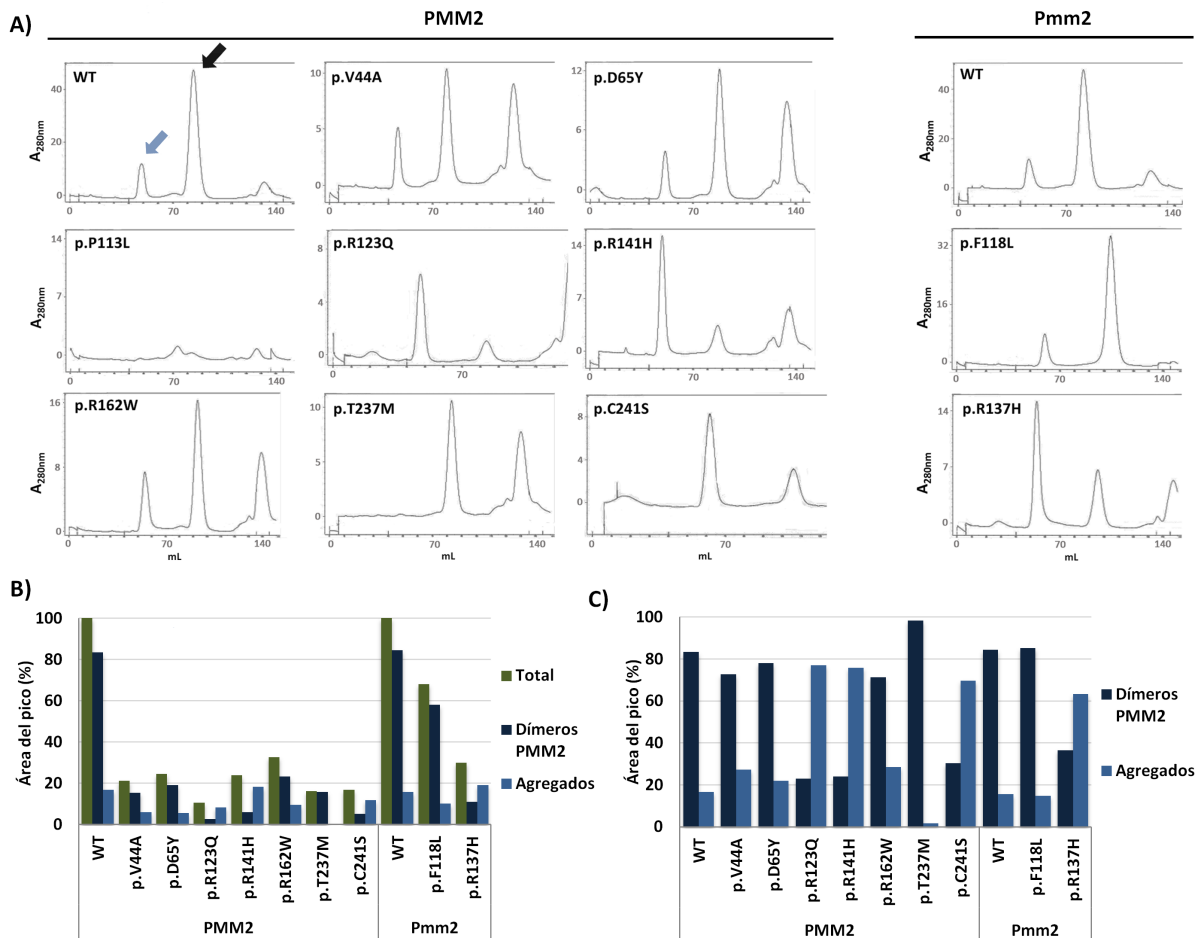


Figura 15. Perfil de oligomerización de los mutantes de PMM2 de humano y Pmm2 de ratón. A) Resultados obtenidos de la cromatografía de exclusión molecular. La flecha azul señala el pico de agregados y la flecha oscura señala el pico de PMM2 dimérica. **B)** Representación de la cantidad total de proteína purificada, homodímeros y agregados, partiendo de la misma cantidad de extracto bacteriano medida a partir del área del pico obtenido (mAu*min). La cantidad total obtenida de proteína WT ha sido considerada 100%. **C)** Porcentaje de agregados y homodímeros obtenidos. La cantidad total de proteína purificada en cada caso fue considerada 100%. No se han representado ni el mutante p.F207S por su falta de expresión en la fracción soluble del extracto bacteriano ni el mutante p.P113L por no presentar ningún estado oligomérico. Ambas proteínas, PMM2 humana y Pmm2 de ratón están representadas en cada una de los gráficas.

Tras la cromatografía de exclusión molecular, pudimos detectar 3 perfiles de oligomerización diferentes. Aquellos mutantes con comportamiento similar al WT, de los que se obtuvo mayor cantidad de dímeros que de agregados, como fueron el p.V44A, p.D65Y, p.R162W y p.T237M, aquellos con más agregados que dímeros, p.R123Q, p.R141H y p.C241S y el mutante p.P113L del que no se pudo obtener ningún perfil de oligomerización (Figura 15A y 15C y Tabla 5). Algunos de los mutantes purificados presentaron gran tendencia a agregar, como el p.R123Q, p.R141H y p.C241S de los cuales la forma dimérica activa obtenida es menos de la mitad de la proteína total purificada (Figura 15C y Tabla 5). Por otra parte, el mutante p.F207S no se pudo purificar debido a su gran agregación y/o degradación, ya que no se llegó a detectar en la fracción soluble del extracto bacteriano, pero sí en la insoluble (resultados no mostrados).

Cabe destacar que en ninguno de los perfiles de oligomerización estudiados se detectó pico

de monómeros (Figura 15A).

Respecto a los mutantes de Pmm2 de ratón, p.F118L pudo ser clasificada en la misma categoría que la proteína WT, presentando más dímeros que agregados (Figura 15A y 15C y Tabla 5). Además, la reducción de la cantidad de proteína obtenida tras su purificación, fue mucho menos acusada que en el caso de los mutantes de PMM2 humana, obteniéndose alrededor de un 70% comparado con la proteína Pmm2 WT (Figura 15B y Tabla 5). El mutante p.R137H de Pmm2, se comportó de manera similar a su análogo humano, mostrando abundancia de agregados (Figura 15A, 15B y 15C y Tabla 5).

4.3.1.2. Estudio del efecto de las mutaciones sobre la actividad de PMM2

Se estudió la actividad catalítica de la proteína WT y de los mutantes de PMM2 en la fracción soluble del extracto bacteriano (Figura 16A) y del homodímero purificado (Figura 16B). En ambos casos se observó una acusada y estadísticamente significativa disminución de la actividad de todos los mutantes comparada con la proteína WT, siguiendo un patrón similar en ambos sistemas.

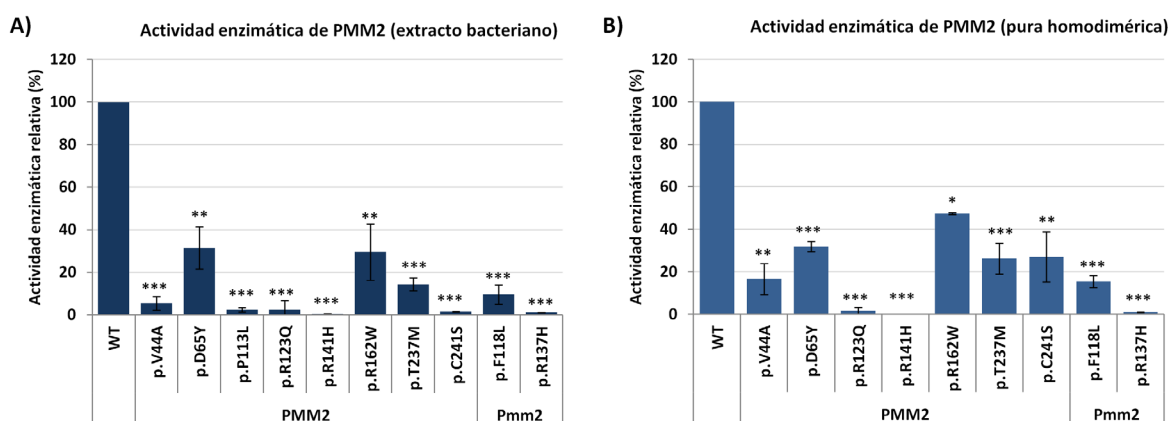


Figura 16. Actividad de PMM2 WT y mutantes humanos y Pmm2 WT y mutantes de ratón. A) Actividad de la proteína WT y mutantes de extracto bacteriano. B) Actividad de la proteína WT y mutantes purificados. No fue posible determinar la actividad del mutante p.P113L puro ya que no fue posible su purificación. La actividad de la proteína WT en mU/mg de proteína fue considerada 100% en cada caso. Ambas proteínas, la humana y la de ratón, están representadas en los gráficos. Los resultados reflejan la media de al menos 3 experimentos independientes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). No fue posible determinar la actividad del mutante p.F207S ya que no se detectó proteína soluble en los extractos bacterianos.

Los resultados de la actividad de los mutantes de PMM2 humana de los extractos bacterianos mostraron una gran reducción de entre un 70% y cerca de un 100% comparados con la proteína WT, siendo p.D65Y el mutante con mayor actividad, un 31,5% y el mutante p.R141H el mutante con menor actividad, cercana a 0% (Figura 16A y Tabla 5). La actividad del mutante p.F207S no pudo ser determinada ya que no se detectó proteína en la fracción soluble.

Los resultados obtenidos del ensayo de actividad de la proteína pura dimérica PMM2 humana, nos permitieron clasificar a los mutantes en dos categorías, mutantes con actividad residual, oscilando entre 47% para el mutante p.R162W y 16% para el mutante p.V44A y mutantes con actividad nula como p.R123Q y p.R141H. En la categoría de mutantes con actividad residual también se encuentran el p.D65Y con un 32% de actividad y los mutantes p.T237M y p.C241S con una actividad de aproximadamente el 25% (Figura 16B y Tabla 5). Debido a la imposibilidad de obtener homodímeros puros de los mutantes p.P113L y p.F207S su actividad como proteínas puras no pudo ser determinada.

Respecto a la actividad de los mutantes de Pmm2 de ratón, p.F118L presentó una actividad de un 10% en extracto bacteriano y alrededor de un 15% como proteína pura respecto a la proteína WT, mientras que la actividad del mutante p.R137H en los dos sistemas fue similar a su análogo humano, p.R141H, presentando actividad nula (Figura 16A y 16B y Tabla 5).

4.3.1.3. Estudio de la estabilidad térmica de los mutantes de PMM2 mediante *differential scanning fluorimetry* (DSF)

Se estudió la estabilidad térmica de los mutantes mediante DSF, un ensayo de desnaturalización térmica basado en la unión de un fluoróforo a las regiones hidrofóbicas expuestas de la proteína (Niesen *et al.*, 2007). Las diferencias en la temperatura de *melting* (ΔT_m), temperatura a la cual el 50% de las proteínas están en un estado desnaturalizado cuando la temperatura se incrementa de manera progresiva, entre el mutante y la proteína WT nos indican la estabilidad de los mutantes. Para este estudio se utilizó la proteína pura funcional en forma de homodímero. La T_m obtenida de la proteína humana WT fue de 50,5°C. Las ΔT_m de los mutantes comparados con la proteína WT fue negativa y estadísticamente significativa en todos los casos, variando entre 0,7 y 10°C, revelando una inestabilidad intrínseca de los mutantes (Figura 17A y Tabla 5). El mutante p.R123Q fue el más resistente a la desnaturalización térmica, cuyo desplazamiento respecto a la proteína WT fue de 0,7°C mientras que el mutante p.D65Y fue el más inestable, ya que su T_m respecto a la WT estaba desplazada 10°C (Tabla 5). La T_m de los mutantes p.P113L y p.F207S no fue determinada debido a que no fue posible su purificación como homodímero.

Respecto a los mutante de Pmm2 de ratón, p.R137H se comportó, una vez más, de manera similar a su análogo humano, p.R141H, desplazando la curva aproximadamente 4°C, mientras que en el caso del mutante p.F118L la curva no se desplazó, apuntando a que esta mutación no está afectando a la estabilidad de la proteína Pmm2 (Figura 17B y Tabla 5).

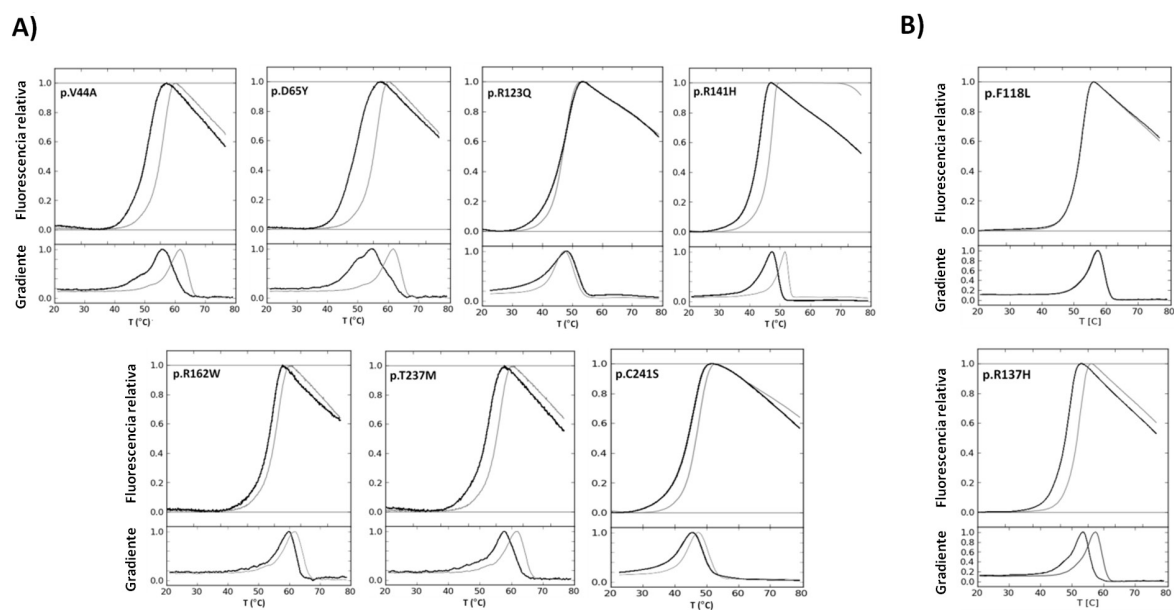


Figura 17. Gráficas de DSF de mutantes de PMM2 humana y Pmm2 de ratón. A) Gráficas de DSF de mutantes de PMM2 humana. **B)** Gráficas DSF de mutantes de Pmm2 de ratón. Perfiles de desnaturación termal representativos de cada mutante (línea negra) comparado con la proteína WT (línea gris). Las curvas fueron suavizadas, normalizadas y analizadas con un programa casero desarrollado para tal fin (Laboratorio Dra. Aurora Martínez; Universidad de Bergen, Noruega). En cada figura se representa también la curva sin escalar (panel inferior). T (°C): Temperatura en °C.

4.3.1.4. Estudio del perfil de degradación de los mutantes de PMM2

Para profundizar en el estudio de la estabilidad de los mutantes, se llevó a cabo el análisis de su perfil de degradación utilizando un sistema acoplado de transcripción y traducción *in vitro* de expresión procariota (TNTs). La proteína fue sintetizada mediante este sistema a 30°C y posteriormente fue incubada a 37°C para estudiar su perfil de degradación mediante la “caza” de la proteína de la fracción soluble a diferentes tiempos. La proteína fue posteriormente inmunodetectada mediante *Western blot* y las bandas fueron cuantificadas por densitometría para la determinación de la vida media relativa.

Además de la proteína PMM2, se detectó en casi todos los perfiles de degradación, una banda de menor peso molecular que aumentaba a medida que disminuía la banda de PMM2. Esta banda podría ser un producto de degradación de la proteína por la zona N-terminal ya que no se detectó cuando se utilizó un anticuerpo anti-Histidinas (resultados no mostrados).

Se obtuvo una vida media relativa de la PMM2 WT humana de aproximadamente 30 minutos. Todos los mutantes de PMM2 presentaron una vida media relativa significativamente disminuida entre un 30 y un 80% con respecto a la proteína WT, siendo p.F207S el mutante con menor vida media, 20% respecto al WT y p.R141H el mutante con mayor vida media, 70% respecto al WT. Estos resultados sugieren una vez más, la inestabilidad de todos los mutantes expresados (Figura 18A y 18B y Tabla 5).

La vida media relativa obtenida de la proteína Pmm2 WT de ratón fue de 5,4 horas. Respecto a la vida media relativa del mutante de Pmm2 p.F118L, fue similar a la del WT, lo que añade más evidencias a los resultados anteriores que sugieren que esta mutación no afecta a la estabilidad de la proteína (Figura 18A y 18B y Tabla 5).

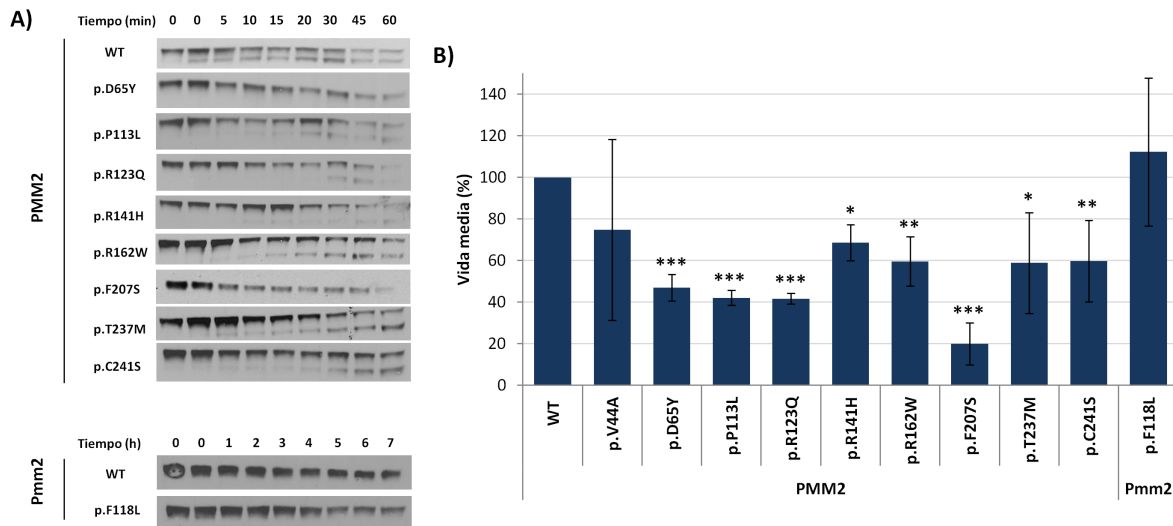


Figura 18. Perfil de degradación de los mutantes de PMM2 humana y de Pmm2 de ratón expresados mediante un sistema acoplado de transcripción y traducción *in vitro* de expresión procarionta. A) *Western blots* representativos de PMM2 WT y de los mutantes incubados a 37°C durante 60 minutos (min) (PMM2) o durante 7 horas (h) (Pmm2). La misma cantidad de volumen de cada muestra fue cargada en el gel de electroforesis. El tiempo 0 se ha realizado por duplicado. La vida media relativa del mutante p.V44A no está representada debido a la falta de reproducibilidad de sus resultados. B) Representación de las vidas medias relativas de cada mutante comparado con el WT, el cual es considerado 100%. Ambas proteínas, la humana y la de ratón, están representadas en cada gráfico. Los resultados reflejan la media de al menos tres experimentos independientes (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

4.3.2. Estudio de la actividad y la cantidad de proteína de mutantes de PMM2 en un modelo celular de enfermedad en condiciones permisivas de plegamiento

Debido a la baja expresión de la proteína PMM2 en fibroblastos y a que no es buen modelo para el estudio de CDGs (Cline *et al.*, 2012; Foulquier *et al.*, 2012; Grunewald *et al.*, 2001), generamos un modelo celular en el que líneas celulares de fibroblastos derivadas de pacientes diagnosticados como PMM2-CDG, fueron transfectadas de manera estable con su propia mutación de plegamiento a estudio, p.V44A, p.D65Y, p.R162W y p.T237M (Tabla de la Figura 19). Estas líneas, sobreexpresando las mutaciones, fueron incubadas en condiciones permisivas de plegamiento, a 28°C, durante 48 horas y a continuación se realizó el ensayo de actividad y *Western blot* para la determinación de la cantidad de proteína de la fracción soluble de los extractos celulares. Los resultados mostraron un aumento significativo de actividad enzimática y un aumento en la cantidad de proteína en condiciones permisivas de plegamiento de todos los mutantes estudiados, p.V44A, p.D65Y, p.R162W y p.T237M (Figura 19), añadiendo más evidencias al probable efecto que tienen estas mutaciones sobre la estabilidad de la proteína PMM2 y demostrando su posible recuperación funcional en condiciones

permisivas de plegamiento.

Cabe destacar que no fue posible detectar aumento de actividad de los mutantes p.V44A y p.D65Y incubados en condiciones permisivas, mediante las condiciones estándar del ensayo de actividad, por lo que procedimos a incrementar el tiempo de incubación del ensayo de actividad con estos mutantes y poder así detectar el aumento (Figura 19A).

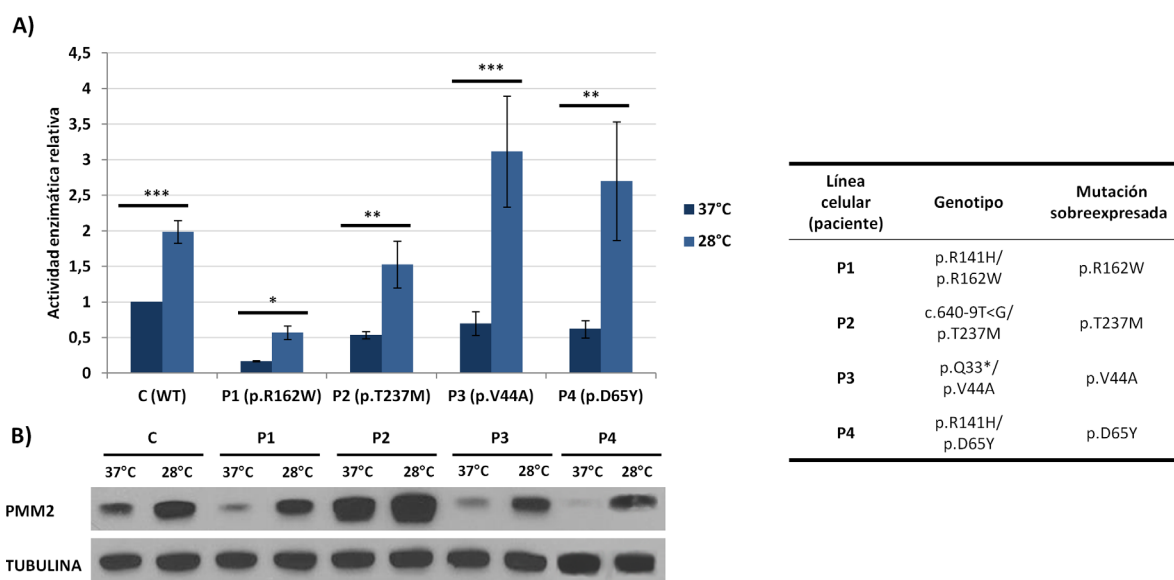


Figura 19. Actividad de PMM2 y cantidad de proteína en condiciones permisivas de plegamiento (28°C) en un modelo celular de enfermedad. A) Representación de la actividad de PMM2 del extracto celular de fibroblastos derivados de pacientes transfectados de manera estable con la mutación a estudio, incubados a 37°C y a 28°C. La actividad en mU/mg de proteína de la línea control (C) transfectada de manera estable con la proteína WT fue considerada 1. Los resultados reflejan la media de al menos tres experimentos independientes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). **B)** *Western blot* representativo de la fracción soluble de los extractos celulares. La α -Tubulina fue utilizada como control de carga. Los genotipos de cada línea de fibroblastos derivados de pacientes utilizada, además del mutante sobreexpresado, están representados en la tabla.

4.3.3. Estudio *in silico* de mutaciones *missense* detectadas en PMM2

4.3.3.1. Predicción del efecto de las mutaciones *missense* sobre la estabilidad de PMM2 mediante el algoritmo computacional FoldX

Con la finalidad de obtener datos adicionales del efecto de las mutaciones *missense* estudiadas sobre la estabilidad de la proteína PMM2, se realizó un estudio *in silico* de las mismas, utilizando el algoritmo computacional FoldX con la estructura cristalográfica de la proteína PMM2 disponible en la base de datos pública *Protein Data Bank* (www.pdb.org) con número de acceso 2AMY. Este algoritmo genera una estimación rápida y cuantitativa de las interacciones que contribuyen a la estabilidad de las proteínas (Schymkowitz *et al.*, 2005a; Schymkowitz *et al.*, 2005b). El efecto de la mutación es calculado mediante la sustracción de la energía libre de la proteína WT a la mutante,

por lo tanto, números positivos significan una menor estabilidad. Los resultados mostraron que todas las mutaciones, a excepción de la p.R162W, parecían ser más inestables que la proteína WT. La diferencia de energía libre de los mutantes respecto al WT osciló entre 6,52 y 0,22 Kcal/mol, siendo p.F207S el mutante más inestable (Tabla 5). El resultado obtenido del mutante p.R162W mostró una mayor estabilidad que la proteína WT (Tabla 5), contrario a lo observado experimentalmente.

Debido a la falta de la proteína Pmm2 de ratón cristalizada, se realizó la predicción del mutante p.F118L de ratón con su ortólogo humano, p.F122L. Los resultados mostraron una diferencia de energía libre de 0,81Kcal/mol respecto al WT (Tabla 5), indicando cierta inestabilidad, contradiciendo lo detectado experimentalmente.

4.3.3.2. Análisis estructural de las mutaciones *missense* detectadas en *PMM2*

Para evaluar el efecto de los mutantes se procedió a su análisis estructural. Se localizaron las mutaciones p.V44A, p.D65Y, p.P113L, p.F122L (análoga a p.F118L de Pmm2 de ratón), p.R123Q, p.R141H, p.R162W, p.F207S, p.T237M y p.C241S en la estructura cristalográfica de PMM2 (código de acceso PDB 2AMY) (Figura 20).

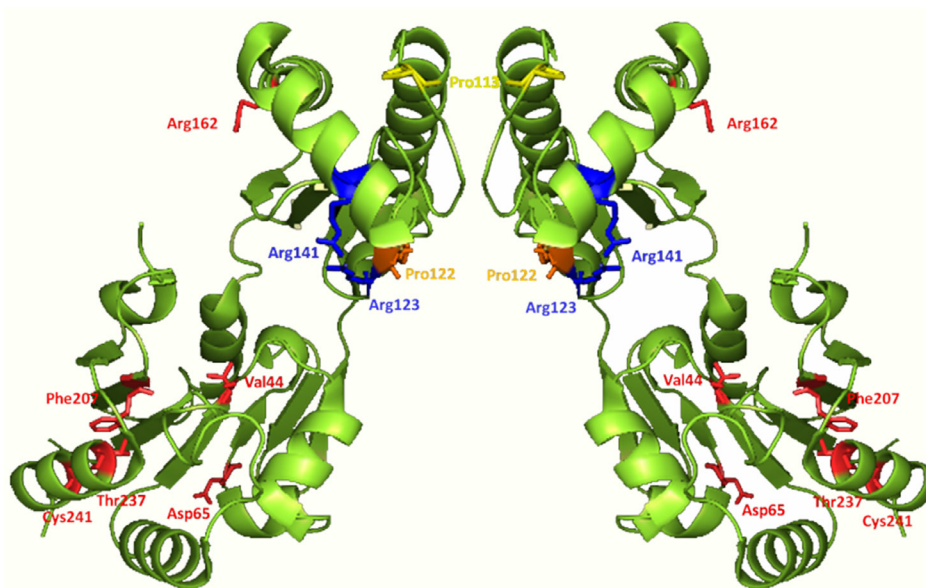


Figura 20. Análisis estructural de las mutaciones *missense* detectadas en *PMM2*. Los aminoácidos, Val44, Asp65, Pro113, Pro122, Arg123, Arg141, Arg162, Phe207, Thr237 y Cys241, afectados por mutaciones *missense* han sido localizados en la estructura tridimensional de la PMM2 humana (código de acceso PDB, 2AMY) en forma de homodímero. Los residuos que afectan a la estabilidad de la proteína están coloreados en rojo, el residuo que afecta la dimerización está coloreado en amarillo y los residuos afectan a la actividad enzimática están marcados en azul y en naranja. Éste último, Pro122, es el residuo análogo al Pro118 de Pmm2 de ratón.

El análisis estructural de las mutaciones estudiadas en este trabajo ya había sido descrito anteriormente (Silvaggi *et al.*, 2006; Vega *et al.*, 2011), a excepción de las mutaciones p.R162W y p.F122L, por lo que me voy a centrar sólo en la descripción de estas últimas. El residuo Arg162 está situado en la hélice α_6 perteneciente al *cap*. Este aminoácido parece no estar implicado ni en la dimerización de la proteína, ni en la catálisis (Silvaggi *et al.*, 2006) por lo que probablemente, el cambio de esta arginina (R) por un aminoácido aromático como el triptófano (W) tenga un papel desestabilizador.

De nuevo, debido a la falta de la proteína Pmm2 cristalizada se ha realizado el análisis estructural de la mutación p.F118L de Pmm2 de ratón, con su análogo, p.F122L, en la proteína humana cristalizada. El residuo Phe122 está situado en uno de los extremos de la lámina β_6 que forma parte del *cap*. Este residuo parece contribuir al mantenimiento de un core hidrofóbico en la interfaz de dimerización necesario para la misma (Silvaggi *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos del estudio funcional de mutaciones *missense* humanas detectadas en *PMM2* en un sistema procariota y en un sistema eucariota, así como su estudio *in silico* incluyendo su localización en la estructura de la proteína cristalizada, pudimos clasificar los mutantes estudiados en tres categorías. 1) mutantes de plegamiento, como p.V44A, p.D65Y, p.R162W, p.F207S, p.T237M y p.C241S, 2) mutantes de plegamiento y catalíticos como p.R123Q y p.R141H y 3) mutantes de dimerización como p.P113L (Tabla 5).

Respecto a los mutantes estudiados de Pmm2 de ratón, p.R137H se comporta de manera similar a su análogo humano, pudiendo ser clasificado en la categoría de mutantes tanto de plegamiento como catalíticos, mientras que p.F118L no parece tener afectada la estabilidad pero sí la catálisis, siendo así clasificado como mutante catalítico (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados del estudio funcional de los mutantes estudiados de pMm2 humana y Pmm2 de ratón y su clasificación.

Mutación	Cantidad de proteína pura obtenida y estado oligomérico (proporción)			Actividad enzimática		DSF		Perfil de degradación	FoldX	Análisis estructural	Clasificación
	Total (Área MAU*min)	% Agregados	% Dímeros	Extractos bacterianos (%)	Proteína pura (%)	Tm (°C)	ΔTm (°C)				
PMM2											
WT	391,7 (100%)	16,7	83,3	100	100	50,5±0,2	-	100	-		
p.V44A	82,1 (20,9%)	27,3	72,7	5,5±3,2***	16,6±7,2***	42,1	-7,9±0,15***	n.d.	3,19	Dominio Core ^b	Plegamiento
p.D65Y	95,3 (24,3%)	21,9	78,1	31,5±9,9**	31,9±3,3***	40	-10±0,5***	46,9±6,4***	1,01	Dominio Core ^b	Plegamiento
p.P113L	n.d.	n.d.	n.d.	2,4±1***	n.d.	n.d.	n.d.	42,1±3,6***	0,99	Dominio dimerización ^b	Oligomerización
p.R123Q	40,8 (10,4%)	77,1	22,9	2,4±4,2***	1,7±1,5***	49,3	-0,7±0,18**	41,7±2,6***	0,22	Dominio bisagra ^b	Plegamiento/ Catalítica
p.R141H	93 (23,7%)	75,9	24,1	0,4±0,3***	0,05±0,1***	44,4	-5,6±0,12***	68,7±8,6*	3,42	Unión sustrato ^b	Plegamiento/ Catalítica
p.R162W	127,2 (32,5%)	28,6	71,4	29,5±13,3**	47,3±0,4*	45,6	-4,4±0,21***	59,6±11,8**	-0,62	Dominio Cap	Plegamiento
p.F207S	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	20±10***	6,51	Dominio Core ^c	Plegamiento
p.T237M	62,6 (16%)	1,7	98,3	14,4±2,9***	26,2±7,35***	46,1	-3,9±0,2***	58,8±24,2*	1,74	Dominio Core ^c	Plegamiento
p.C241S	65,3 (16,7%)	69,7	30,3	1,5±0,1***	27±11,8**	47,4	-2,6±0,14***	59,8±19,5**	0,87	Dominio Core ^c	Plegamiento
Pmm2											
WT	335,2 (100%)	15,6	84,4	100	100	55,8±0,44	-	100	-		
p.F118L	230,2 (68,7%)	14,7	85,3	9,7±4,51***	15,4±2,7***	55,8	0,04±0,14	112±35,6	0,81 ^a		Catalítica
p.R137H	43,3 (12,9%)	63,4	36,6	1,1±0,1***	1±0,1***	51,9	-3,9±0,29***	n.d.	n.d.		Plegamiento/ Catalítica

^a Predicción realizada con su análogo humano, p.F122L.^b (Silvaggi *et al.*, 2006; Vega *et al.*, 2011).^c (Vega *et al.*, 2011).

n.d., No determinada.

***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05.

4.4. APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS EN PMM2-CDG ENFOCADAS A LA ESTABILIZACIÓN DE MUTANTES

Los resultados descritos el apartado anterior, los cuales evidencian que los mutantes estudiados presentan afectada la estabilidad, junto con lo descrito anteriormente (Andreotti *et al.*, 2013; Kjaergaard *et al.*, 1999; Le Bizec *et al.*, 2005; Silvaggi *et al.*, 2006; Vega *et al.*, 2011; Vuillaumier-Barrot *et al.*, 2000), sugieren que PMM2-CDG podría ser considerada una enfermedad conformacional. Una de las estrategias terapéuticas más exploradas actualmente para el tratamiento de este tipo de enfermedades es el uso de pequeños compuestos que estabilicen a la proteína mal plegada de manera directa, como las chaperonas farmacológicas (PCs), o de manera indirecta, como los reguladores de la proteostasis (PRs). De esta manera, pensamos que la búsqueda y evaluación de este tipo de compuestos que estabilicen a los mutantes de PMM2 podría ser una aproximación terapéutica nueva y prometedora para pacientes PMM2-CDG, ya que la mayoría son portadores de una mutación que afecta al plegamiento de la proteína (Perez *et al.*, 2011; Vega *et al.*, 2011).

4.4.1. Búsqueda de chaperonas farmacológicas (PCs) para PMM2-CDG y evaluación de su efecto.

La primera aproximación terapéutica desarrollada en este trabajo enfocada a la estabilización de mutantes, ha sido la búsqueda de PCs que estabilicen específicamente a los mutantes de plegamiento identificados en pacientes PMM2-CDG mediante la estrategia del rastreo de una librería comercial de compuestos químicos.

4.4.1.1. Rastreo de una librería de chaperonas farmacológicas

Esta parte de trabajo fue realizada por el grupo *Biorecognition* de la Dra. Aurora Martínez, en la Universidad de Bergen, Noruega. Se analizaron 10.000 compuestos de la librería comercial *MyriaScreen Diversity Collection* mediante DSF con la proteína PMM2 WT homodimérica pura. A partir de las curvas obtenidas se determinó el ΔT_m , diferencia entre la T_m de la PMM2 en presencia de cada compuesto a una concentración final de 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (320 μM - 170 μM) y la T_m de la proteína en presencia de DMSO (disolvente de los compuestos). De esta manera se identificaron quince compuestos capaces de estabilizar específicamente la PMM2 WT (Figura 21 y Tabla 6). Previamente, algunos de los compuestos positivos fueron descartados debido a que estabilizaban una variedad de proteínas y por lo tanto podían considerarse chaperonas químicas (datos del laboratorio de la Dra. Aurora Martínez). Estos quince compuestos seleccionados fueron nombrados como C1-15 y serán referidos como tal de aquí en adelante. No se muestra ninguna de las estructuras químicas debido a que algunos de ellos están pendientes de patente en colaboración con la empresa farmacéutica Minoryx therapeutics.

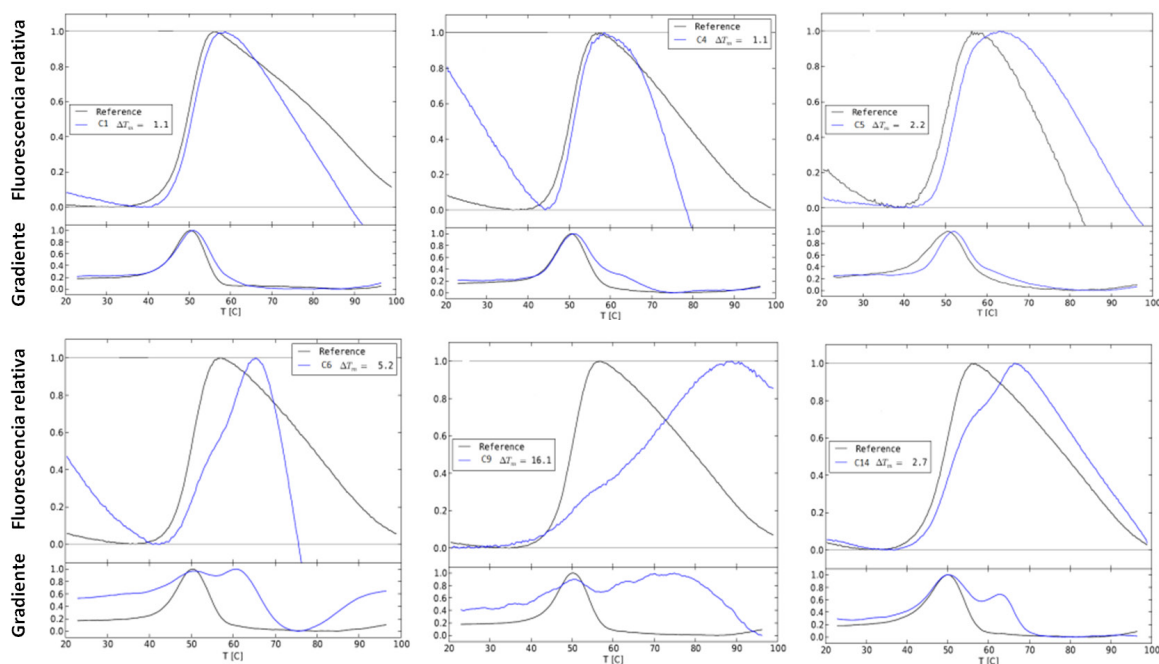


Figura 21. Gráficas de DSF de seis de los compuestos seleccionados mediante el rastreo de chaperonas farmacológicas. Perfiles de desnaturalización térmica representativos de la proteína PMM2 WT homodimérica incubada con DMSO (línea gris) comparada con la proteína incubada con cada uno de los compuestos (línea azul). Las curvas fueron suavizadas, normalizadas y analizadas con un programa casero desarrollado para tal fin (Laboratorio Dra. Aurora Martínez; Universidad de Bergen, Noruega). La ΔT_m es la diferencia entre la T_m de la PMM2 en presencia de cada compuesto y la T_m de la proteína en presencia de DMSO (disolvente de los compuestos). En la parte inferior de cada figura también se representa la curva sin escalar. T[C]: Temperatura en °C.

4.4.1.2. Análisis del efecto de los compuestos seleccionados sobre la estabilidad y actividad de PMM2 en un sistema procarionta

El primer paso para la validación de los compuestos seleccionados como potenciales PCs, fue testarlos en un sistema procarionta. Se realizó el análisis del efecto de los compuestos sobre la actividad de la PMM2 WT purificada y la proteína de extracto bacteriano y sobre la estabilidad de la PMM2 WT y de los mutantes mediante DSF y mediante el análisis del perfil de degradación.

4.4.1.2.1. Efecto de los compuestos sobre la actividad de la PMM2 WT

En primer lugar, se testaron los quince compuestos analizando su efecto sobre la actividad de la proteína dimérica pura WT. Ésta se incubó con los compuestos a cinco concentraciones finales diferentes, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, junto con 0,5% de BSA durante 10 minutos a 30°C y posteriormente se analizó su actividad enzimática.

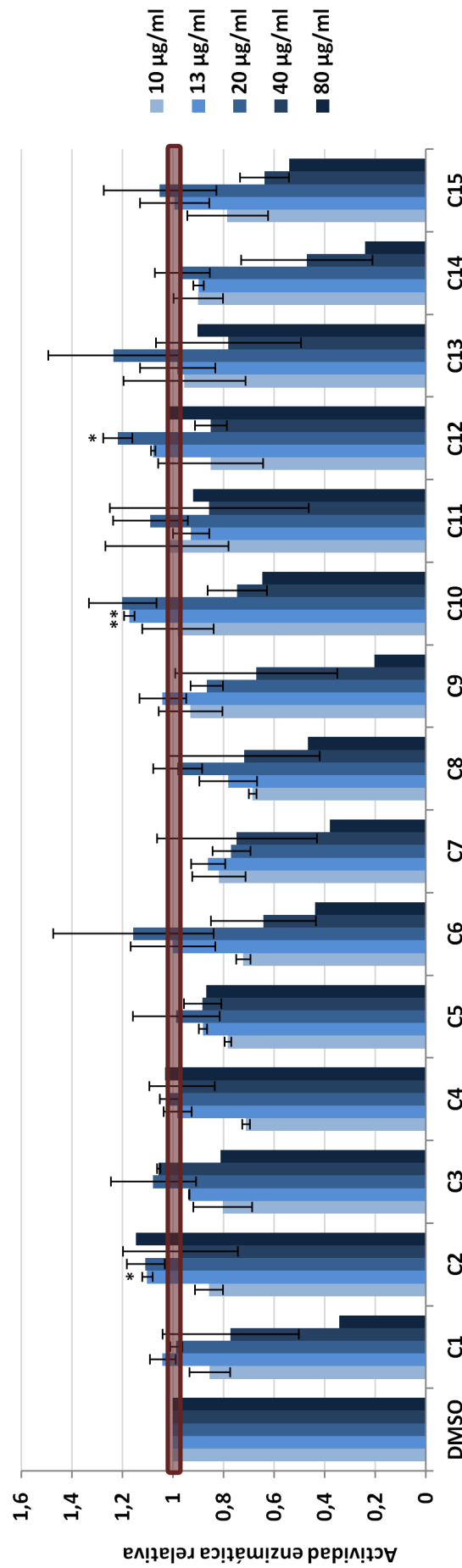


Figura 22. Efecto de los quince compuestos seleccionados sobre la actividad de la PMM2 WT pura dimérica. La actividad de PMM2 WT incubada con DMSO en mU/mg de proteína fue considerada 1 (resaltado con línea granate). Los resultados reflejan la media de al menos dos experimentos independientes a excepción del experimento a 80 µg/mL del cual sólo se representa una repetición (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Sólo indicado en el caso de ser significativo cuando el valor refleja un incremento respecto a la referencia).

Los resultados mostraron sólo un leve incremento significativo de la actividad de PMM2 WT incubada con C2, C12 y C10 a 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ los dos primeros y a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el último. A rasgos generales, las concentraciones testadas más elevadas, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (concentración a la que se realizó el rastreo de compuestos) y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y la menor concentración, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, no ejercen ningún efecto sobre la actividad de la proteína, o incluso en algunos casos, parecen tener un pequeño efecto inhibitorio. Este efecto inhibitorio es más acusado a concentraciones elevadas (Figura 22 y Tabla 6). Estos resultados nos llevaron a continuar con la validación de los compuestos a las concentraciones testadas no inhibitorias de 40 μM y 80 μM (rango de molaridad aproximado de los compuestos a 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Debido a que no se observó prácticamente ningún efecto de los compuestos sobre la actividad de la proteína PMM2 WT purificada y por lo tanto, previamente plegada, se decidió estudiar su efecto sobre la proteína durante su proceso de plegamiento. De esta manera, se incubaron bacterias sobreexpresando la PMM2 WT con los compuestos a 40 μM (~13 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y a 80 μM (~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), durante su crecimiento y posteriormente se analizó la actividad enzimática.

No se observó ningún incremento de la actividad enzimática en los extractos solubles procedentes de las bacterias incubadas con los compuestos a 80 μM . Sin embargo, sí pudo observarse un incremento significativo en el caso de C1, C3, C8, C9, C12, C13, C14 y C15 a 40 μM (Figura 23 y Tabla 6).

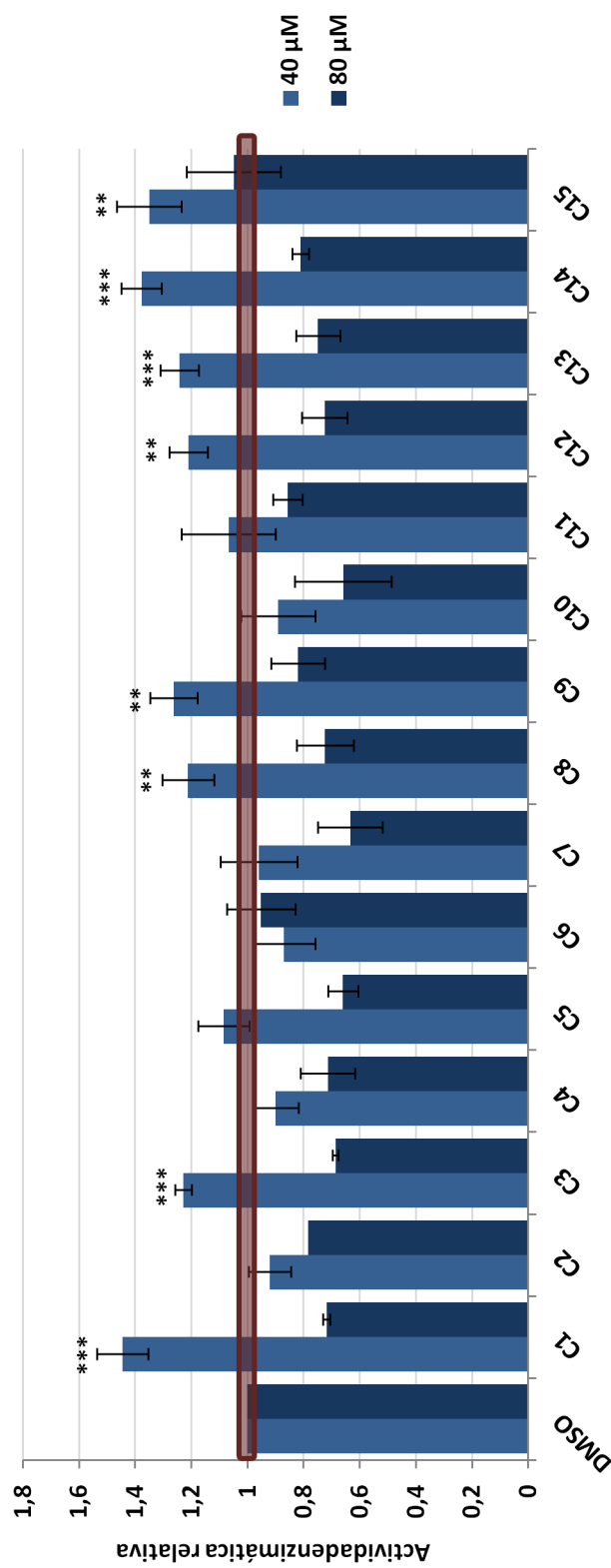


Figura 23. Efecto de los quince compuestos seleccionados sobre la actividad de la PMM2 WT de extracto bacteriano. La actividad de PMM2 WT de extracto soluble de bacterias incubadas con DMSO en mU/mg de proteína fue considerada 1 (resaltado con línea granate). Los resultados reflejan la media de al menos tres experimentos independientes (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Sólo indicado en el caso de ser significativo cuando el valor refleja un incremento respecto a la referencia).

4.4.1.2.2. Efecto de los compuestos sobre la estabilidad de PMM2 WT mediante DSF.

Debido a la observación del efecto inhibitorio sobre la actividad de PMM2 WT pura de alguno de los compuestos a la concentración a la que se realizó el rastreo de PCs, 80 $\mu\text{g/mL}$ (rango de molaridad de entre 320 μM y 170 μM), se procedió a realizar de nuevo el estudio de estabilidad térmica mediante DSF con la proteína WT a las concentraciones no inhibitorias descritas en el apartado anterior, 40 μM (~13 $\mu\text{g/mL}$) y a 80 μM (~20 $\mu\text{g/mL}$).

Los resultados mostraron que a estas concentraciones, no todos los compuestos seleccionados en el rastreo estabilizaban a PMM2 WT. Se observó una estabilización significativa a ambas concentraciones, 40 μM y 80 μM , con los compuestos C1, C4, C8, C9, C10, C12, C13 y C15, siendo el efecto similar que en el rastreo con C1, un efecto menor con C8, C10, C12 y C13 e incluso un efecto mayor con C4, C9 y C15. Por otro lado, se pudo observar un leve incremento significativo, pero mucho menor que en el rastreo, con C2 sólo a 40 μM , al igual que con C7 y C14 sólo a 80 μM (Tabla 6). Los resultados con C6 no se pudieron determinar debido a imposibilidad de obtener curvas interpretables debido, probablemente, a la fluorescencia intrínseca del compuesto que pudo estar interfiriendo con los resultados y con su interpretación.

Considerando todos los resultados obtenidos del estudio del efecto de los quince compuestos seleccionados sobre la actividad y la estabilidad de PMM2 WT, se seleccionaron siete de ellos, C1, C4, C8, C9, C12, C14 y C15 (Tabla 6), para seguir con su validación, estudiando su efecto sobre la estabilidad de los mutantes de PMM2 en el mismo sistema de expresión procariota.

Tabla 6. Resultados de la validación de los quince compuestos seleccionados en el rastreo con la proteína PMM2 WT. DSF y actividad enzimática de la proteína pura dimérica y actividad enzimática del extracto soluble bacteriano.

Compuesto	<i>Differential Scanning fluorimetry</i> (DSF) (ΔT_m , °C)				Actividad PMM2 pura dimérica					Actividad extracto bacterias	
	Rastreo (320-170 μ M)	40 μ M	80 μ M	80 μ M	10 μ g/mL (40-20 μ M)	13 μ g/mL (50-30 μ M)	20 μ g/mL (80-40 μ M)	40 μ g/mL (160-85 μ M)	80 μ g/mL (320-170 μ M)	40 μ M	80 μ M
DMSO	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1
C1	1,1	1,1±0,09***	1,4±0,09***	1,4±0,09***	0,85±0,1	1,04±0,05	0,99±0,02	0,77±0,3	0,34	1,45±0,1***	0,72±0,01
C2	1,8	0,13±0,05**	0,07±0,07	1,1±0,02*	0,86±0,1	1,1±0,01	1,11±0,1	0,97±0,2	1,15	0,92±0,1	0,78±0
C3	0,8	-0,7±0,04	-0,6±0,06	-0,6±0,06	0,8±0,1	0,94±0	1,08±0,2	1,06±0,01	0,81	1,23±0,03***	0,69±0,01
C4	1,1	1,5±0,1***	2±0,3***	2±0,3***	0,7±0,02	0,98±0,1	1,02±0,04	0,96±0,1	1,03	0,9±0,1	0,71±0,1
C5	2,2	-0,25±0,05	-0,2±0,04	-0,2±0,04	0,78±0,01	0,88±0,02	0,99±0,2	0,88±0,1	0,87	1,09±0,1	0,66±0,05
C6	5,2	n.d.	n.d.	n.d.	0,72±0,03	1±0,2	1,16±0,3	0,64±0,2	0,44	0,87±0,1	0,95±0,1
C7	2,9	0,1±0,09	0,6±0,2***	0,6±0,2***	0,82±0,1	0,86±0,1	0,77±0,1	0,75±0,3	0,38	0,96±0,1	0,63±0,1
C8	2,7	1,2±0,04***	1,7±0,4***	1,7±0,4***	0,69±0,02	0,78±0,1	0,98±0,1	0,72±0,3	0,47	1,21±0,1**	0,72±0,1
C9	16,1	25,4±0,6***	29,1±0,6***	29,1±0,6***	0,93±0,13	1,04±0,1	0,87±0,1	0,67±0,3	0,20	1,26±0,1**	0,82±0,1
C10	2	0,5±0,06***	1±0***	1±0***	0,98±0,1	1,17±0,02**	1,2±0,1	0,75±0,1	0,65	0,89±0,1	0,66±0,2
C11	1,1	-0,2±0,1	-0,2±0,07	-0,2±0,07	1,02±0,2	0,93±0,1	1,09±0,1	0,86±0,4	0,92	1,07±0,2	0,86±0,05
C12	2	0,7±0,05***	0,6±0,08***	0,6±0,08***	0,85±0,2	1,08±0,01	1,22±0,1*	0,85±0,1	1,01	1,21±0,1**	0,72±0,1
C13	0,9	0,4±0,09**	0,6±0,1***	0,6±0,1***	0,95±0,2	0,98±0,1	1,23±0,3	0,78±0,3	0,90	1,24±0,1***	0,75±0,1
C14	2,7	-0,9±0,2	0,45±0,15***	0,45±0,15***	0,9±0,1	0,9±0,02	0,96±0,1	0,47±0,3	0,24	1,38±0,1***	0,81±0,03
C15	1,1	2,7±0,1***	3,35±0,35***	3,35±0,35***	0,78±0,2	0,99±0,1	1,05±0,2	0,64±0,1	0,54	1,35±0,1**	1,05±0,2

Se muestra la representación de los datos de manera relativa (DMSO).

n.d., no determinada.

***, p<0,001; **, p<0,01; *, p<0,05 (sólo indicado en el caso de ser significativo cuando el valor refleja un incremento respecto a su referencia).

Resultado en negrita los resultados significativos representados.

Recuadrados en rojo los compuestos seleccionados para continuar con su validación.

4.4.1.2.3. Estudio del efecto de los compuestos sobre la estabilidad de mutantes de PMM2 mediante DSF

Una vez seleccionados los compuestos para continuar con su validación, se procedió al estudio de su efecto sobre la estabilidad de algunos de los mutantes de plegamiento, p.V44A, p.D65Y, p.R162W, p.T237M y p.C241S y mutantes de plegamiento y catalíticos, p.R123Q y p.R141H, estudiados en el apartado 4.3.. Se analizó el efecto de los compuestos seleccionados, C1, C4, C8, C9, C12, C14 y C15 a 40 μM y a 80 μM sobre la estabilidad térmica de estos mutantes purificados en su forma homodimérica mediante DSF.

En este caso, la ΔT_m fue calculada como la diferencia entre la T_m del mutante con el compuesto y la T_m del mutante con DMSO (disolvente del compuesto). Los resultados obtenidos mostraron una ΔT_m positiva y estadísticamente significativa, de entre 0,7°C y 45,1°C, de todos los mutantes de plegamiento con todos los compuestos a 40 μM y a 80 μM (Tabla 7). Estos resultados nos indican que su efecto estabilizador no parece ser específico de mutante. La T_m de algunos mutantes con C12, C14 y C15 no pudieron determinarse, así como ninguna de las T_m s con C8, ya que las curvas no pudieron ser interpretadas debido, probablemente, a que algunos de los compuestos emiten fluorescencia a la longitud de onda a la que se mide el ensayo, interfiriendo con los resultados y con su interpretación.

Algunos de los compuestos fueron capaces de incrementar la T_m de algunos mutantes hasta alcanzar valores similares a la T_m de PMM2 WT, o incluso superarla. Éste fue el caso tanto de C1 como de C14, con los cuales se llegaron a alcanzar valores similares al WT con el mutante p.R123Q a ambas concentraciones y con p.T237M a 80 μM , y en el caso de C4 con el mutante p.R123Q a ambas concentraciones y con p.D65Y y p.T237M a 80 μM (Figura 24). Respecto a C9, el incremento de T_m de todos los mutantes con este compuesto fue muy elevado, variando la ΔT_m , entre 25,7°C y 45,1°C (Tabla 7), superando en todos los casos la T_m de PMM2 WT, al igual que pasó con los datos interpretables de C15 (Figura 24).

Basándonos en estos resultados, se realizó una segunda selección de compuestos, centrando la validación de aquí en adelante en C1, C4, C9 y C15. Los tres primeros compuestos son aquellos con los que se pudieron interpretar los resultados de DSF de todos los mutantes y C15 fue seleccionado por el gran incremento de T_m observado en aquellos mutantes con los que se pudieron interpretar las curvas. Hemos continuado también con la validación de C8, C12 y C14, pero estudiando su efecto sólo sobre la proteína WT y sobre un mutante de plegamiento representativo, p.D65Y.

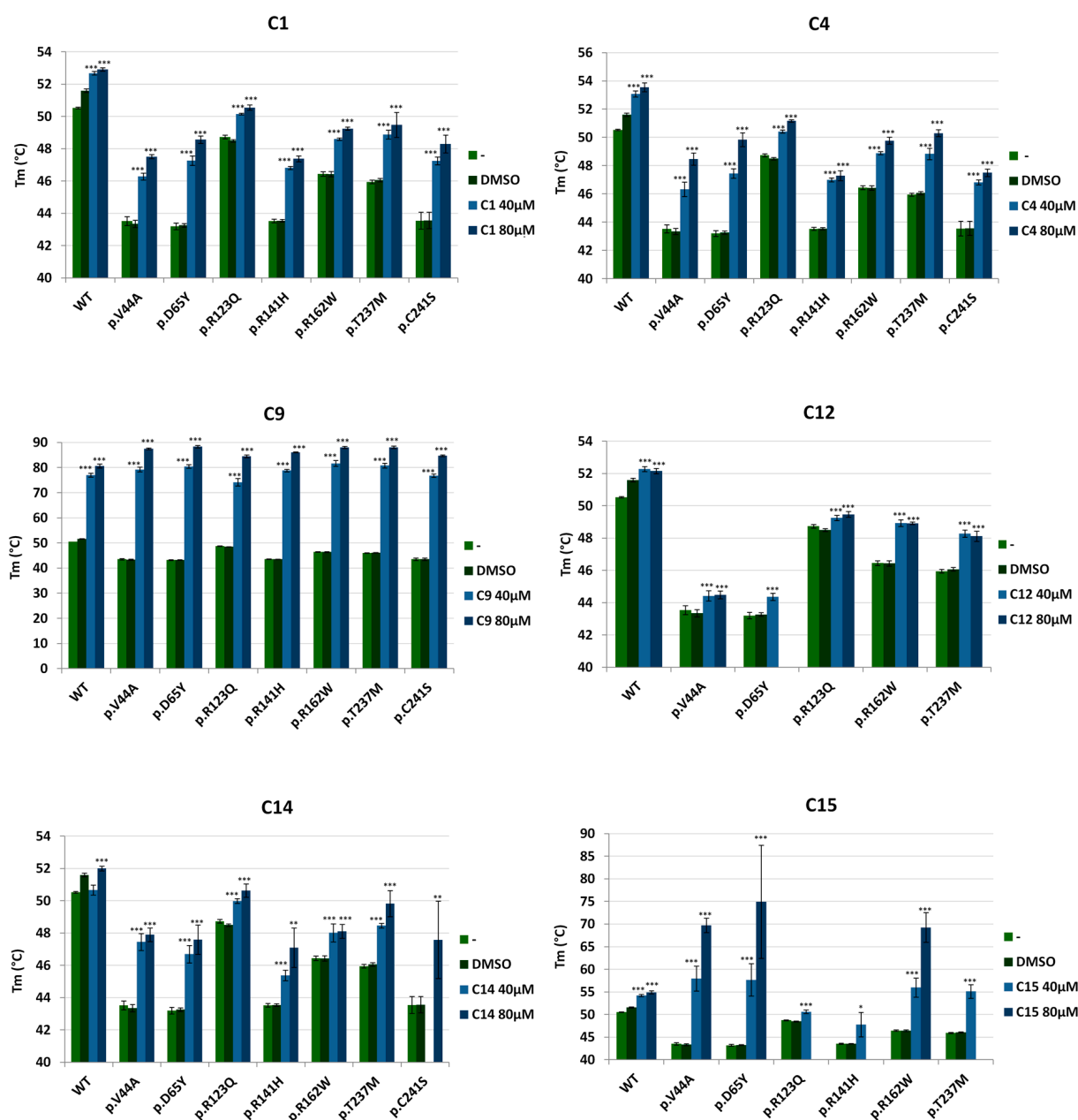


Figura 24. Efecto de los compuestos C1, C4, C9, C12, C14 y C15 sobre la estabilidad termal del WT y de los mutantes p.V44A, p.D65Y, p.R123Q, p.R141H, p.R162W, p.T237M y p.C241S y la proteína WT, estudiado mediante DSF. Representación de las T_ms obtenidas de la interpretación de las curvas generadas mediante DSF de los mutantes incubados con los compuestos a 40 μM y 80 μM. Los resultados reflejan la media de al menos tres experimentos independientes. Significatividad estadística representada de cada mutante respecto a sí mismo incubado con DMSO (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). Algunos de los datos no están representados debido a la imposibilidad de interpretar las curvas obtenidas.

Tabla 7. Efecto de los compuestos sobre la estabilidad termal de mutantes de PMM2 estudiado mediante DSF. Representación de la ΔT_m ($^{\circ}C$), diferencia entre la T_m de cada mutante en presencia del compuesto y la T_m de cada mutante en presencia de DMSO.

		p.V44A	p.D65Y	p.R123Q	p.R141H	p.R162W	p.T237M	p.C241S
DMSO		-	-	-	-	-	-	-
C1	40 μ M	2,9 \pm 0,2***	4 \pm 0,3***	1,6 \pm 0,05***	3,3 \pm 0,1***	2,2 \pm 0,1***	2,8 \pm 0,3***	3,7 \pm 0,2***
	80 μ M	4,2 \pm 0,1***	5,3 \pm 0,2***	2 \pm 0,2***	3,8 \pm 0,2***	2,8 \pm 0,1***	3,4 \pm 0,8***	4,7 \pm 0,5***
C4	40 μ M	3,1 \pm 0,6***	4,1 \pm 0,4***	2,1 \pm 0,1***	3,4 \pm 0,2***	2,4 \pm 0,1***	2,7 \pm 0,4***	3,2 \pm 0,2***
	80 μ M	5,3 \pm 0,5***	6,5 \pm 0,6***	2,8 \pm 0,1***	3,7 \pm 0,4***	3,3 \pm 0,2***	4,1 \pm 0,2***	3,9 \pm 0,2***
C9	40 μ M	35,9 \pm 0,9***	37,2 \pm 0,8***	25,7 \pm 1,5***	35,3 \pm 0,5***	35,3 \pm 1,2***	34,8 \pm 0,9***	33,2 \pm 0,6***
	80 μ M	44,1 \pm 0,4***	45,1 \pm 0,5***	36 \pm 0,5***	42,5 \pm 0,2***	41,6 \pm 0,4***	42 \pm 0,5***	41,2 \pm 0,3***
C12	40 μ M	1,1 \pm 0,3***	1,1 \pm 0,2***	0,7 \pm 0,2***	n.d.	2,5 \pm 0,2***	2,2 \pm 0,2***	n.d.
	80 μ M	1,1 \pm 0,2***	n.d.	0,97 \pm 0,2***	n.d.	2,5 \pm 0,1***	2 \pm 0,3***	n.d.
C14	40 μ M	4,1 \pm 0,5***	3,4 \pm 0,5***	1,5 \pm 0,1***	1,8 \pm 0,3***	1,6 \pm 0,5***	2,4 \pm 0,1***	n.d.
	80 μ M	4,5 \pm 0,4***	4,3 \pm 0,9***	2,1 \pm 0,4***	3,5 \pm 1,2**	1,7 \pm 0,4***	3,8 \pm 0,8***	4 \pm 2,4**
C15	40 μ M	14,6 \pm 2,7***	14,4 \pm 3,6***	2,1 \pm 0,4***	4,2 \pm 2,7*	9,5 \pm 2,14***	9 \pm 1,5***	n.d.
	80 μ M	26,3 \pm 1,6***	31,7 \pm 12,5***	n.d.	n.d.	22,8 \pm 3,3***	n.d.	n.d.

n.d., no determinada.

***p<0,001; **p<0,01; *p<0,5.

Recuadrados en rojo los compuestos seleccionados para continuar con su validación.

4.4.1.2.4. Estudio del efecto de los compuestos sobre la estabilidad de PMM2 WT y mutantes mediante el análisis de su perfil de degradación

Para profundizar más en el efecto de los cuatro compuestos seleccionados, C1, C4, C9 y C15, sobre la estabilidad de PMM2, se analizó el perfil de degradación de la proteína WT y de los mutantes de plegamiento p.D65Y, p.R162W y p.T237M en presencia de estos compuestos. Hemos excluido al mutante p.V44A debido a los resultados poco reproducibles obtenidos en el estudio de su perfil de degradación (apartado 4.3.1.4). Por otro lado, hemos incluido al mutante de dimerización p.P113L con el fin de estudiar el efecto de los compuestos sobre un mutante de esta naturaleza.

El análisis del perfil de degradación se realizó con el mismo método descrito en el apartado 4.3.1.4., la síntesis de la proteína mediante un sistema acoplado de transcripción y traducción *in vitro* de expresión procariota (TNTs), su posterior incubación a 37°C y su detección mediante *Western blot* (Figura 25). Los compuestos fueron añadidos a una concentración final de 40 µM y a 80 µM en el momento de la síntesis proteica, y por lo tanto estuvieron presentes en el momento de su plegamiento.

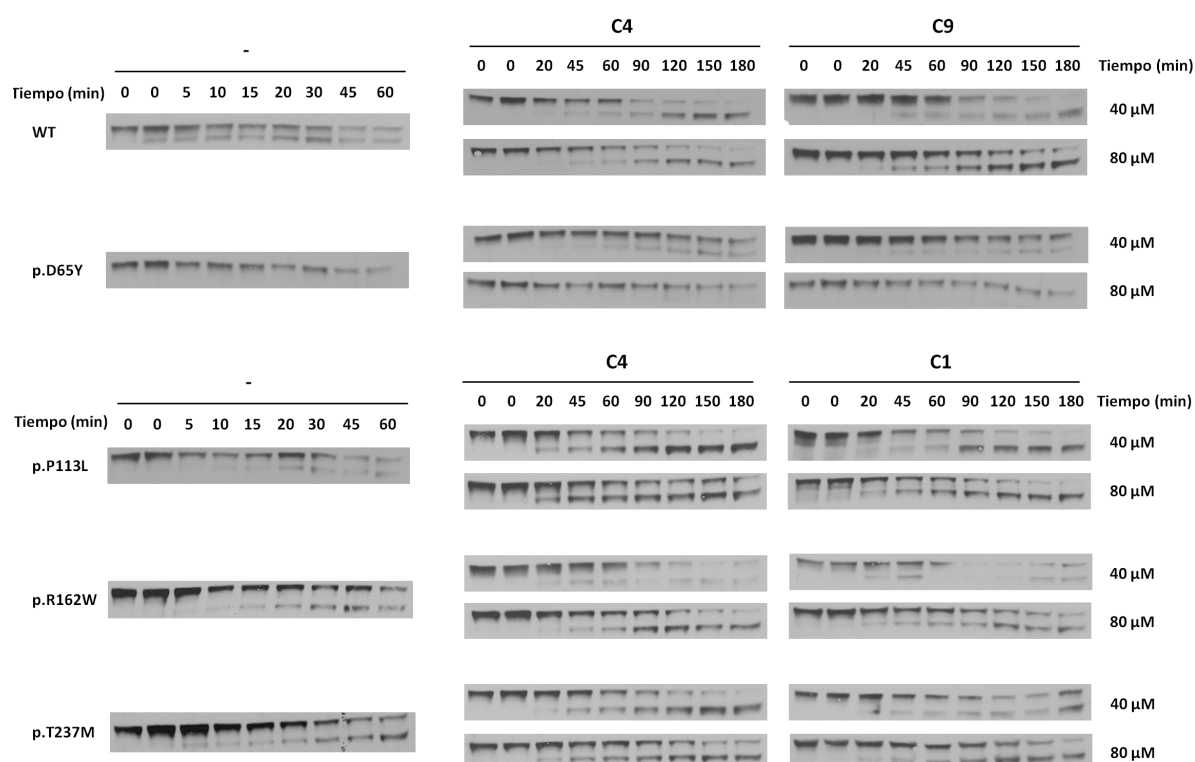


Figura 25. Perfiles de degradación representativos de PMM2 WT y de los mutantes, p.D65Y, p.P113L, p.R162W y p.T237M expresados con un sistema de TNTs, incubados con algunos de los compuestos seleccionados a 40 µM y 80 µM. *Western blots* representativos del WT y de los mutantes con algunos de los compuestos, C1, C4 y C9. La misma cantidad de volumen de cada muestra fue cargada en el gel de electroforesis. El tiempo 0 fue realizado por duplicado.

Los resultados mostraron un aumento significativo de la vida media relativa de PMM2 WT y de los cuatro mutantes con C1, C4, C9 y C15 respecto a su vida media relativa basal (con DMSO), a al menos una de las concentraciones testadas, a excepción de la proteína WT y p.R162W incubadas con C15, con los que no se observó ningún incremento (Figura 26 y Tabla 8). El rango de incremento fue desde 1,5 a 5,4 veces respecto a su vida media relativa basal (con DMSO) (Tabla 8), siendo la combinación del mutante p.D65Y con C9 a 80 μ M con la que se detectó un mayor incremento (Figura 26 y Tabla 8).

Adicionalmente, se estudió el efecto de los compuestos C8, C12 y C14 a 40 μ M y a 80 μ M sobre PMM2 WT y un mutante de plegamiento representativo, p.D65Y. Estos tres compuestos aumentaron de manera significativa la vida media de la proteína WT y del mutante p.D65Y a al menos una de las concentraciones testadas, a excepción de PMM2 WT incubada con C12, con el que no se observó ningún incremento (Figura 26 y Tabla 8). El rango de aumento fue desde aproximadamente 1,5 a 5 veces respecto a su vida media relativa basal (con DMSO) (Tabla 8), siendo la combinación del mutante p.D65Y y el compuesto C14 a 80 μ M con la que se detectó un mayor incremento (Figura 26 y Tabla 8).

Cabe destacar, que todos los aumentos significativos de vida media relativa de los mutantes con los compuestos llegaron a alcanzar valores similares a la vida media basal de la proteína WT y en la mayoría de los casos la superaron (Figura 26).

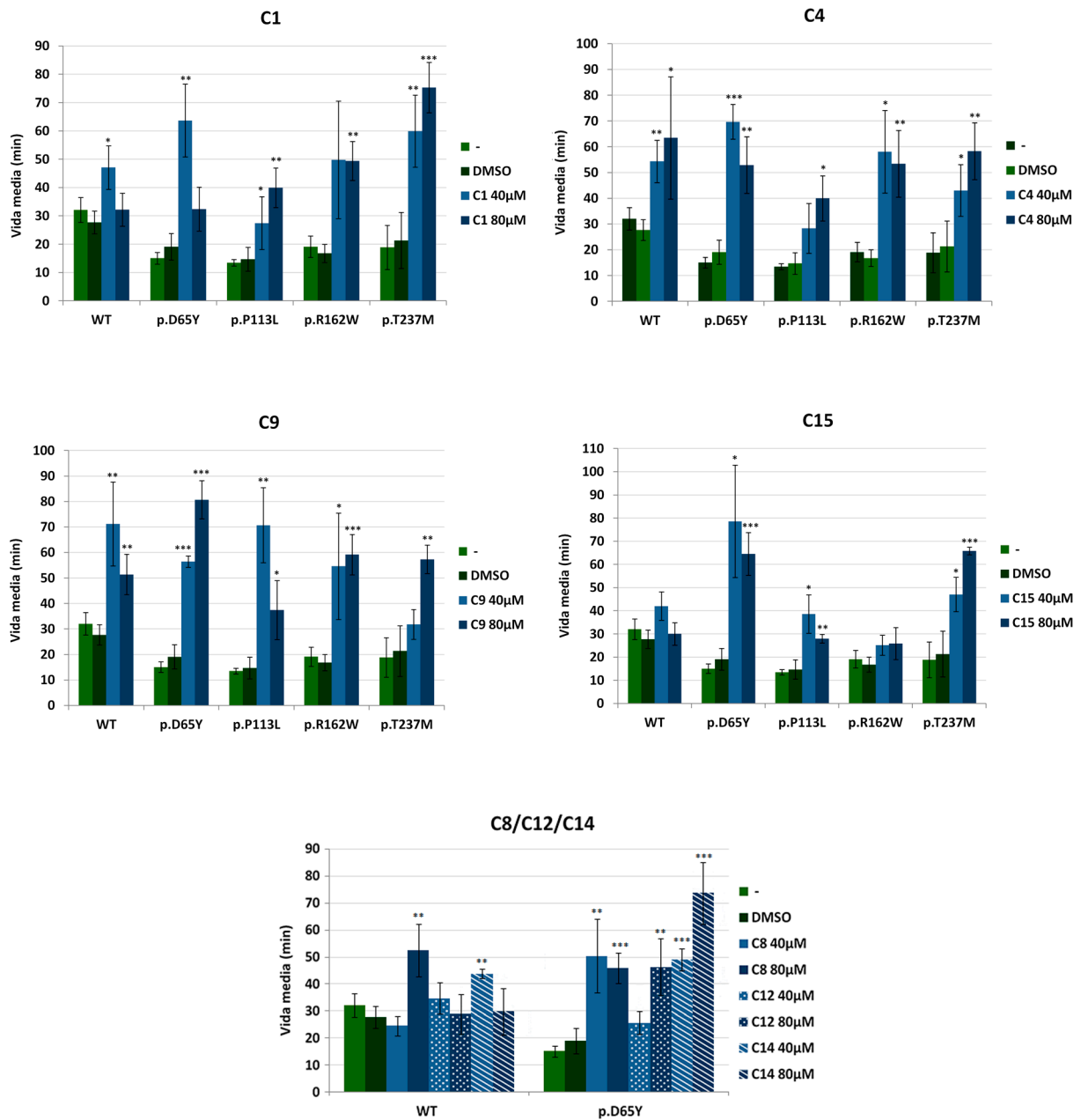


Figura 26. Efecto de los compuestos C1, C4, C8, C9, C12, C14 y C15 sobre la estabilidad de PMM2 WT y de los mutantes p.D65Y, p.P113L, p.R162W y p.T237M estudiado mediante el análisis del perfil de degradación. Representación de la vida media relativa en minutos (min) de la proteína WT y de los mutantes obtenida con un sistema de transcripción y traducción *in vitro* e incubados con los compuestos a 40 μ M y 80 μ M. Los resultados reflejan la media de al menos tres experimentos independientes. Significatividad estadística representada de cada mutante respecto a su vida media relativa basal (con DMSO) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Tabla 8. Efecto de los compuestos sobre la estabilidad de PMM2 WT y de los mutantes estudiado mediante el análisis del perfil de degradación. Representación de la vida media relativa respecto a su vida media relativa basal (con DMSO).

		WT	p.D65Y	p.P113L ^a	p.R162W	p.T237M
DMSO		1	1	1	1	1
C1	40µM	1,47±0,24*	4,23±0,86**	2,04±0,69*	2,61±1,09	3,18±0,67**
	80µM	1,00±1,18	2,16±0,52	2,96±0,52**	2,58±0,36**	3,99±0,47***
C4	40µM	1,69±0,26**	4,63±0,45***	2,10±0,72	3,04±0,84*	2,28±0,53*
	80µM	1,98±0,74*	3,52±0,73**	2,96±0,65*	2,79±0,68**	3,09±0,59**
C9	40µM	2,22±0,52**	3,75±0,15***	5,24±1,09**	2,86±1,09*	1,69±0,31
	80µM	1,60±0,25**	5,37±0,5***	2,77±0,86*	3,10±0,41***	3,04±0,29**
C15	40µM	1,31±0,19	5,23±1,61*	2,87±0,61*	1,32±0,23	2,49±0,39*
	80µM	0,94±0,15	4,29±0,61***	2,07±0,14**	1,35±0,36	3,49±0,09***
C8	40µM	0,76±0,12	3,35±0,91**	n.d.	n.d.	n.d.
	80µM	1,64±0,3**	3,06±0,37***	n.d.	n.d.	n.d.
C12	40µM	1,09±0,18	1,7±0,29	n.d.	n.d.	n.d.
	80µM	0,90±0,23	3,08±0,7**	n.d.	n.d.	n.d.
C14	40µM	1,37±0,06**	3,27±0,27***	n.d.	n.d.	n.d.
	80µM	0,93±0,27	4,9±0,76***	n.d.	n.d.	n.d.

^a Mutante de dimerización.

n.d., no determinada.

***p<0,001; **p<0,01; *p<0,5.

Resultado en negrita aparecen los resultados positivos estadísticamente significativos.

4.4.1.3. Análisis del efecto de los compuestos seleccionados sobre la actividad de PMM2 WT y mutantes en un modelo celular de enfermedad.

El siguiente paso para la validación de los compuestos seleccionados como potenciales PCs de PMM2, fue el análisis de su efecto en un sistema eucariota. Estos ensayos se realizaron con el modelo celular descrito anteriormente (apartado 4.3.2), utilizando las líneas P1 y P2 (hemicigoto funcional), las cuales sobreexpresan los mutantes de plegamiento p.R162W y p.T237M respectivamente, además de una línea control sobreexpresando la proteína WT.

Previamente a los ensayos de actividad, se realizó un estudio de citotoxicidad con estos cuatro compuestos con la finalidad de determinar el rango de concentración óptimo para cada uno de ellos (resultados no mostrados).

Estas líneas celulares fueron incubadas con los compuestos, C1, C4, C9 y C15 durante 48 horas y transcurrido ese tiempo, se realizó el ensayo de actividad. Los resultados obtenidos mostraron un incremento significativo de la actividad en ambas líneas celulares portadoras de los mutantes

p.R162W y p.T237M respectivamente, a al menos alguna de las concentraciones testadas con cada compuesto, variando este incremento entre 1,2 y 1,6 veces respecto a su actividad basal (Figura 27A). La mayor recuperación de actividad en ambas líneas celulares fue con el compuesto C4 a 10 μ M. En el caso de la sobreexpresión del mutante p.R162W, se observó un incremento de actividad partiendo de un 13% de actividad basal respecto al WT, a alrededor de un 20%, y en el caso del mutante p.T237M partiendo de un 50% de actividad basal, a un 80% (Figura 27B).

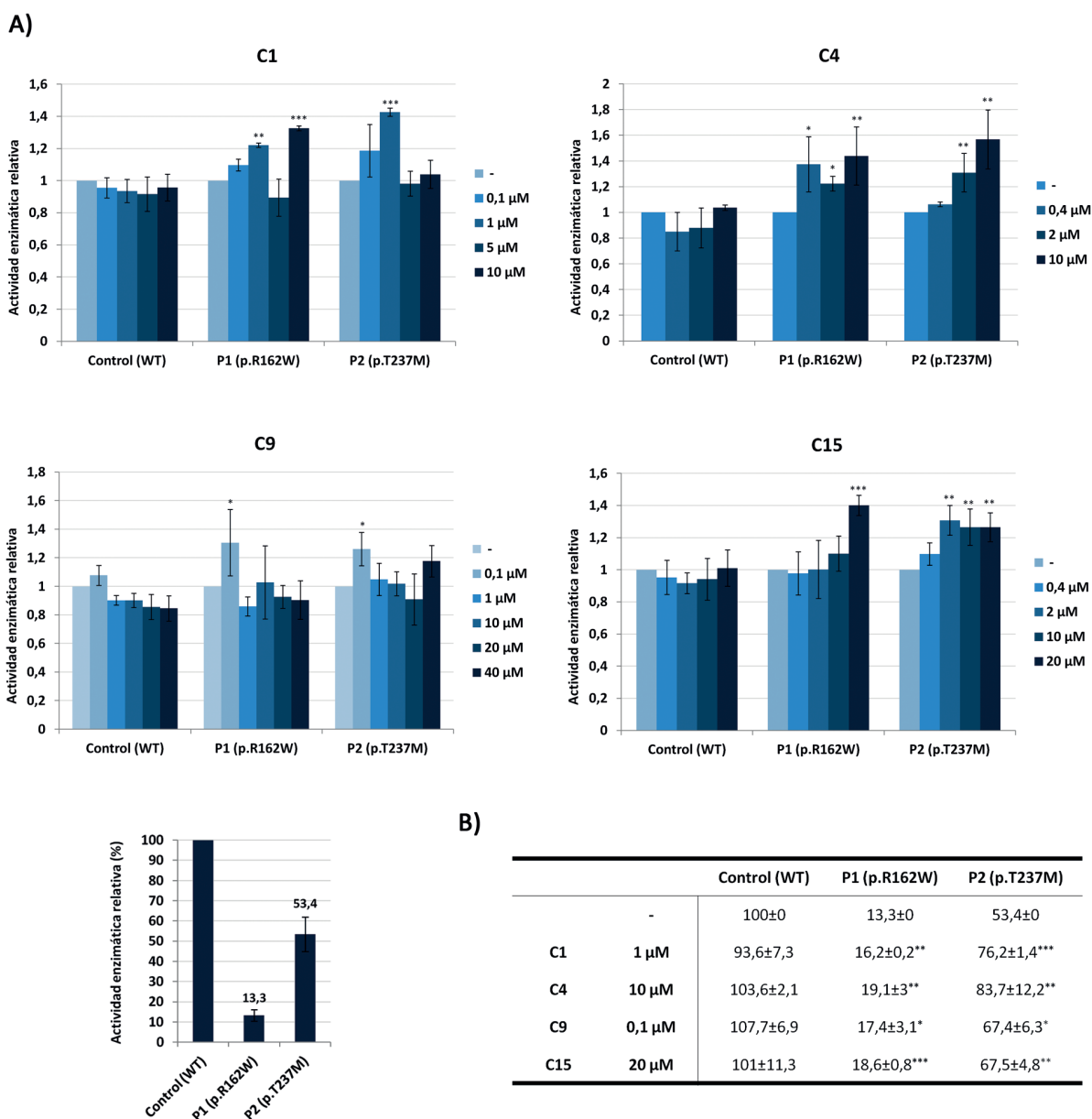


Figura 27. Actividad de PMM2 de fibroblastos de una línea control y dos líneas de pacientes transfectados de manera estable con la proteína WT o con la mutación a estudio (p.R162W y p.T237M) respectivamente e incubados con C1, C4, C9 y C15 a diferentes concentraciones durante 48 horas. A) Representación de la actividad relativa de PMM2 del extracto soluble de los fibroblastos incubados con los diferentes compuestos a diferentes concentraciones. La actividad basal de la cada línea fue considerada 1 en cada caso. Se incluye un gráfico de la actividad basal relativa de las dos líneas celulares estudiadas con respecto a la línea control (%). **B)** Tabla con los valores de actividad a la concentración testada óptima de cada compuesto. La actividad basal de la línea control sobreexpresando la proteína WT fue considerada 100%. Los resultados reflejan la media de al menos tres experimentos independientes (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001). Significatividad estadística representada de cada mutante respecto a su actividad basal.

4.4.2. Evaluación del efecto de reguladores de la proteostasis (PRs) sobre la actividad de PMM2

Esta parte de trabajo ha sido realizada en colaboración con el grupo *Cell and Protein Engineering* bajo la supervisión de la Dra. Laura Segatori, en la *Rice University*, Houston, EEUU. Los PRs testados fueron celastrol, MG132 y carbenoxolona (CBX). Celastrol ha sido descrito como inhibidor de la actividad del proteasoma, así como inductor de la HSR en el citosol y UPR en el RE (Hansen *et al.*, 2011; Kannaiyan *et al.*, 2011; Mu *et al.*, 2008b; Salminen *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2014), MG132 es un inhibidor del proteasoma, lo que conlleva la posterior activación de la HSR y UPR (Bush *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2011; Mu *et al.*, 2008b) y CBX es un inductor de la HSR (Kawashima *et al.*, 2009; Kilpatrick *et al.*, 2013; Nagayama *et al.*, 2001; Thakur y Nehru, 2014). Nuestra hipótesis se centra en que la activación de la HSR, y por lo tanto el aumento de chaperonas moleculares citoplasmáticas, ayudará al plegamiento de los mutantes de PMM2 en el citoplasma. Por otra parte, en el caso de que PMM2 sea degradada por el proteasoma, su inhibición podría estar ayudando a aumentar la cantidad de proteína PMM2 disponible para que ejerzan su función las chaperonas moleculares.

Es necesario puntualizar que los datos mostrados son datos preliminares y es necesaria la consideración de repeticiones de algunos puntos y el testaje de estos compuestos sobre la proteína WT y sobre otros mutantes.

4.4.2.1 Análisis del efecto de los PRs sobre la actividad de mutantes de PMM2 en un modelo celular de enfermedad

En esta parte del trabajo se emplearon de nuevo las líneas P1 y P2 sobreexpresando los mutantes de plegamiento p.R162W y p.T237M respectivamente descritas en el apartado 4.3.2. Estas dos líneas fueron incubadas con los PRs, celastrol, MG132 y CBX a diferentes concentraciones durante 48 horas y tras ese tiempo, se llevó a cabo el ensayo de actividad.

Los resultados preliminares mostraron un aumento significativo de la actividad en ambas líneas celulares portadoras de los mutantes p.R162W y p.T237M respectivamente, incubadas con celastrol a 0,4 μ M y 0,6 μ M, variando este incremento entre 3,2 y 1,7 veces respecto a su actividad basal. La actividad del mutante p.R162W también aumentó significativamente al incubarlo con celastrol a 0,1 μ M y 0,25 μ M, con MG132 a 25 nM, 75nM y 100 nM y con CBX a 0,5 μ M (Figura 28A).

La mayor recuperación de actividad en ambas líneas celulares fue con celastrol a 0,4 μ M, incrementándose en el caso de p.R162W, partiendo de un 13%, actividad basal respecto al WT, a alrededor de un 40% y en el caso del mutante p.T237M, partiendo de un 50%, actividad basal respecto al WT, a un 85% (Figura 28B).

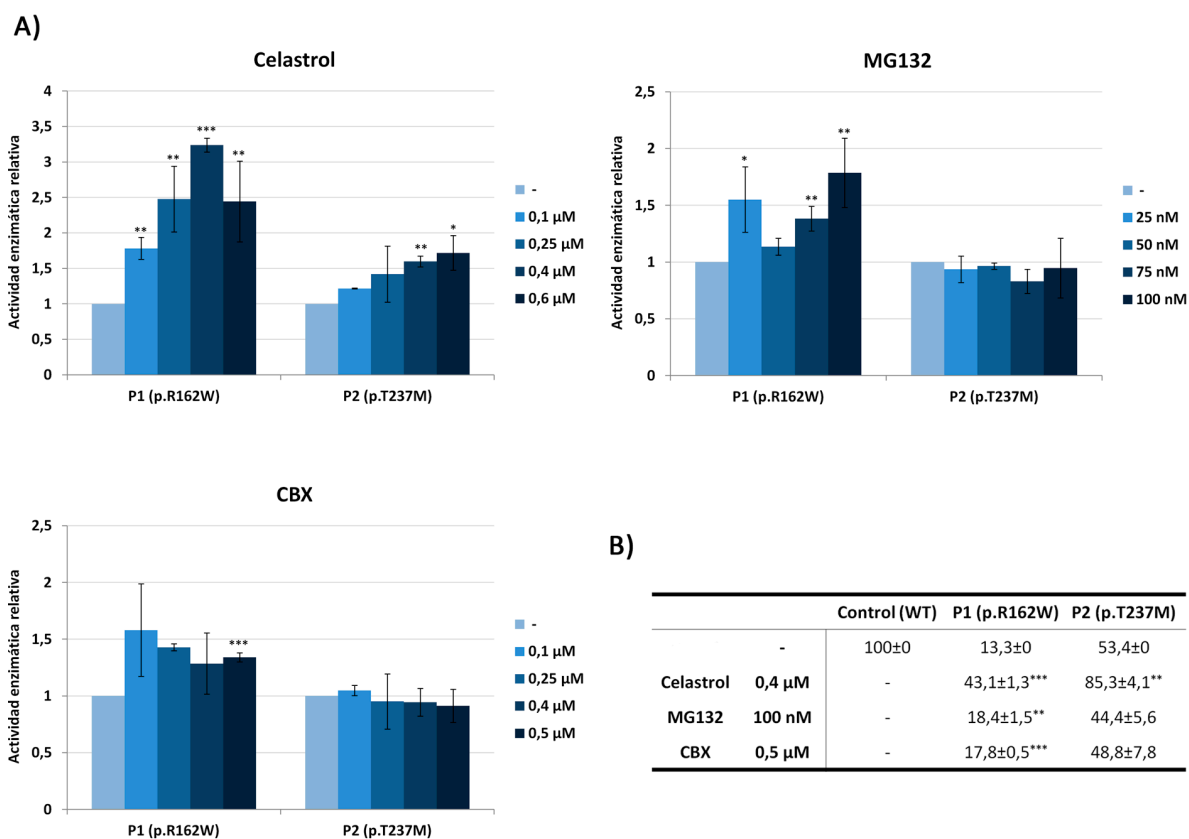


Figura 28. Actividad de PMM2 de fibroblastos de pacientes transfectados de manera estable con la mutación a estudio (p.R162W y p.T237M respectivamente) e incubados con celastrol, MG132 y carbenoxolona (CBX) a diferentes concentraciones. A) Representación de la actividad relativa de PMM2 del extracto soluble de los fibroblastos. La actividad basal de la cada línea, fue considerada 1 en cada caso. **B)** Tabla con los valores de actividad a la concentración óptima de cada compuesto. La actividad basal de la línea control sobreexpresando la proteína WT fue considerada 100%. Los resultados reflejan la media de al menos dos experimentos independientes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Significatividad estadística representada de cada mutante respecto a su actividad basal.

5. Discusión

La baja prevalencia de las enfermedades raras consideradas de manera individual, dificulta su diagnóstico, el entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad y el desarrollo de posibles tratamientos. La caracterización funcional específica de las mutaciones descritas causantes de enfermedad, nos posibilita su clasificación y la búsqueda de aproximaciones terapéuticas generalizadas basadas en el mecanismo de acción de las mutaciones, lo que reduce el esfuerzo y aumenta la eficacia de la búsqueda, disminuyendo de esta manera los costes. Además, el hecho de que en determinadas ocasiones estos defectos funcionales sean compartidos con enfermedades de mayor prevalencia y por lo tanto más estudiadas, como es el caso de las enfermedades conformacionales, incrementa la posibilidad de desarrollo de estas terapias.

En este trabajo se ha realizado la caracterización de mutaciones que afectan al proceso de *splicing* y la aplicación con éxito de una terapia específica con AOs, así como la caracterización funcional de mutaciones *missense* detectadas en pacientes PMM2-CDGs, y la búsqueda y caracterización con éxito de pequeñas moléculas que estabilizan de manera específica, PCs, y de manera indirecta, PRs, los mutantes de PMM2 caracterizados como inestables.

5.1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MUTACIONES QUE AFECTAN AL PROCESO DE *SPLICING* Y TERAPIA ESPECÍFICA CON OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO

En primer lugar, se ha llevado a cabo la identificación y el análisis del efecto de dos mutaciones que afectan al proceso *splicing* en dos genes causantes de enfermedad, *ALDH7A1* cuyo defecto es causante de PDE y *TMEM165* cuyo defecto es causante de TEM165-CDG, y la posterior aplicación de una terapia con oligonucleótidos antisentido que modifican el *splicing* (SSO) tipo morfolino (PMO) en las células de los pacientes, gracias a la cual se ha conseguido recuperar el perfil transcripcional normal y la correspondiente proteína.

El análisis del perfil transcripcional de dos pacientes nos ha permitido identificar una mutación intrónica interna, c.792+182G>A, en el gen *TMEM165* y una mutación exónica “silenciosa”, c.75C>T, en el gen *ALDH7A1*, ambas causantes de enfermedad por afectar al proceso de *splicing*, que no hubiéramos podido detectar de ninguna manera mediante el análisis de exomas de genes específicos secuenciando por el método de Sanger o mediante secuenciación masiva. Incluso la mutación c.75C>T detectada en el gen *ALDH7A1* hubiera sido clasificada como silenciosa y por lo tanto descartada como causante de enfermedad sin aplicar los análisis funcionales. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia del análisis del mRNA para establecer un sistema de diagnóstico completo y eficaz. La dificultad de detección de este tipo de mutaciones junto con la dificultad, en determinadas ocasiones, de acceder al mRNA del paciente y la baja implementación de este tipo de técnicas en los laboratorios de diagnóstico, nos hace pensar que estamos subestimando la frecuencia de las mutaciones que afectan al proceso de *splicing*. Respecto a las mutaciones que provocan

la inserción de un pseudoexón, como ocurre con la mutación detectada en el gen *TMEM165*, su estimación es de entre un 2% y un 7% del total de los alelos mutantes (Gurvich *et al.*, 2008; Pros *et al.*, 2009). Respecto a las mutaciones clasificadas como “silenciosas”, como la detectada en el gen *ALDH7A1*, se estima que muchas de ellas e incluso algunas mutaciones clasificadas como *missense*, son en realidad mutaciones que afectan al proceso de *splicing* (Chamary *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2011; Sauna y Kimchi-Sarfaty, 2011; Sterne-Weiler *et al.*, 2011), algunas ya descritas como causantes de enfermedad (Cartegni *et al.*, 2002; Chamary *et al.*, 2006; Fernandez-Cadenas *et al.*, 2003; O’Driscoll *et al.*, 2003; Santoro *et al.*, 2007), incluso otra mutación “silenciosa” ha sido identificada en el mismo gen, *ALDH7A1* (Salomons *et al.*, 2007). Se han realizado algunas estimaciones concretas analizando el exón 9 y 12 del gen *CFTR* que mostró que hasta una de cada cuatro mutaciones silenciosas eran causantes de *splicing* aberrante (Pagani *et al.*, 2005) y estimaciones en cáncer, describiendo que el 50% de las mutaciones sinónimas conductoras afectan a este proceso (Supek *et al.*, 2014). El desarrollo de las nuevas tecnologías, como el *RNA seq*, técnica que permite el estudio del transcriptoma completo, y el aumento de su accesibilidad para el diagnóstico clínico, permitirá aumentar la identificación de este tipo de mutaciones disminuyendo poco a poco esta subestimación e implementar un diagnóstico más eficaz (Chandrasekharappa *et al.*, 2013; Flanagan *et al.*, 2013; Webb *et al.*, 2012).

El estudio del perfil transcripcional junto con el apoyo de las herramientas bioinformáticas son los primeros pasos para la identificación de mutaciones que afectan al proceso de *splicing*, pero es necesario el aislamiento de la variable a estudio mediante los denominados minigenes para confirmar su patogenicidad y su diagnóstico y poder buscar una terapia apropiada (Baralle y Baralle, 2005; Desviat *et al.*, 2012). En este trabajo, se ha confirmado la patogenicidad de ambas mutaciones aislando las variables del contexto genómico en el que se encuentran mediante un sistema *ex vivo* de minigenes, incluso en el caso de la mutación detectada en el gen *TMEM165* se ha podido confirmar que es la causante de la delección del exón 4.

En el caso de la mutación c.75C>T detectada en el gen *ALDH7A1*, su patogenicidad viene dada por la generación de un nuevo sitio 5' de *splicing* y en el caso de la mutación c.792+182G>A, detectada en el gen *TMEM165*, por la activación de un nuevo sitio 5' de *splicing* causada por el aumento de complementariedad de la región con la U1 snRNP provocada por la mutación, pasando de 7 a 8 de las 9 posibles bases apareadas, además del aumento en bases apareadas consecutivas, lo que incrementa la probabilidad de que ese sitio de *splicing* sea reconocido por la maquinaria (Freund *et al.*, 2005; Le Guedard-Mereuze *et al.*, 2009; Roca *et al.*, 2005). La delección del exón 4 o del exón 3 y 4 observada, es difícil de explicar, ya que la mutación no parece alterar los valores de *splicing* de los sitios 5' y 3' de estos exones y su delección no provoca la recuperación de la pauta de lectura de la proteína, como ocurre de manera natural, por ejemplo, en la DMD (Arechavala-Gomez *et al.*, 2010). La delección del exón 4 puede ser debida al pequeño tamaño del intrón generado, de 62

pb, entre el exón 4 y el pseudoexón. Se ha postulado la necesidad de secuencias específicas para el *splicing* de intrones ultra cortos (menores de 65 pb) para el reclutamiento de un “spliceosoma” más compacto, ya que si nos basamos en las dimensiones de la maquinaria común del “spliceosoma”, son necesarias entre 85 y 113 pb de mRNA lineal para su ensamblaje (Sasaki-Haraguchi *et al.*, 2012).

Desde un punto de vista terapéutico, las dos mutaciones estudiadas, responsables de la generación de un sitio críptico en un exón o de la inclusión de un pseudoexón, son idóneas para la aplicación de una terapia con SSOs, ya que los sitios naturales de *splicing* permanecen intactos y lo suficientemente alejados del nuevo sitio generado para ser usados por la maquinaria de *splicing* durante el bloqueo del sitio críptico. En ambos casos, esta aproximación terapéutica se ha aplicado con éxito, recuperándose el perfil transcripcional y la proteína de manera secuencia y dosis específica. En el caso de la mutación detectada en *TMEM165*, esta recuperación ha sido cuantificada, aumentando de un 2% a un 20% de transcritos normales comparado con el control, eficientemente traducidos en un 60% de proteína respecto al control. Esta proteína, además, está localizada en el aparato de Golgi donde probablemente sea funcional (Demaegd *et al.*, 2013; Rosnoble *et al.*, 2013).

Esta terapia ha sido ampliamente utilizada para la exclusión de pseudoexones en células de pacientes y en modelos animales de otras enfermedades (Dhir y Buratti, 2010; Havens *et al.*, 2013) incluidas EMH como acidemia propiónica (Rincon *et al.*, 2007), aciduria metilmalónica (Perez *et al.*, 2009), PMM2-CDG (Vega *et al.*, 2009), deficiencia de 6-piruvil-tetrahidropterina sintasa (PTPS) (Brasil *et al.*, 2011) y la enfermedad de Niemann-Pick tipo C (Rodríguez-Pascau *et al.*, 2009).

Por otro lado, los resultados obtenidos en el caso del gen *ALDH7A1* apoyan el concepto de su posible uso sobre mutaciones exónicas que afectan al *splicing* ya descrito en otras enfermedades como en ataxia-telangiectasia (A-T) (Du *et al.*, 2007), la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher (Regis *et al.*, 2013) o en un modelo de ratón del síndrome de Usher (Lentz *et al.*, 2013), ampliando así, el tipo de mutaciones sobre las que se puede aplicar.

La principal ventaja del uso de SSOs es que el mRNA corregido es transcrito en su contexto y bajo su control natural, además, es una estrategia mucho más sencilla de implementar que la terapia génica. Su principal inconveniente es la necesidad de un desarrollo individual para cada mutación, con su consecuente optimización en cada caso y la necesidad de cumplimentar la normativa para ser aprobado como fármaco pasando por ensayos clínicos. Esto es un gran problema, en concreto, en el caso de las EMH, ya que la mayoría de las mutaciones son individuales y no prevalentes, por lo que resultaría prácticamente imposible el desarrollo de ensayos clínicos. Además, la falta de modelos animales, debido también a la individualidad de las mutaciones, así como a la dificultad de desarrollar un modelo animal de mutaciones intrónicas internas debido a la baja conservación de estas secuencias entre especies, dificulta el desarrollo de ensayos preclínicos. La aprobación

por parte de la FDA (*Food and Drug Administration*) o por parte de la EMEA (*European Medicines Agency*) de cada química como fármaco, evitando así la necesidad de aprobación de cada AO de manera individual, facilitaría todos estos problemas (Hoffman, 2007; Spitali y Aartsma-Rus, 2012).

Por otra parte, los AOs presentan otro tipo de dificultades comunes a las drogas basadas en ácidos nucleicos que hay que solventar, como su pobre farmacocinética, la falta de penetración en la membrana celular y a menudo, la baja estabilidad (Winkler, 2013). Estas dificultades han quedado plasmadas en el fracaso de uno de los ensayos clínicos de pacientes con melanoma avanzado (Bedikian *et al.*, 2014). Actualmente, se están desarrollando diferentes aproximaciones como el uso de conjugados con péptidos de penetración, nanopartículas dendríméricas o pequeñas moléculas lipofílicas para intentar aumentar su penetración en las células y para conseguir especificidad celular (Bennett y Swayze, 2010; Saleh *et al.*, 2012; Winkler, 2013). Debido a su pobre biodistribución, el potencial terapéutico de la terapia antisentido depende, en gran medida, del órgano diana al que se deba dirigir el tratamiento. En general, los SSOs, independientemente de su química, aplicados de manera sistémica, ejercen su función principalmente en el hígado y en el riñón (Parra *et al.*, 2011; Roberts *et al.*, 2006; Sazani *et al.*, 2002; White *et al.*, 2009; Winkler, 2013).

En el caso de fenotipos multisistémicos, es necesario que el SSO alcance multitud de órganos. Se han descrito diferentes observaciones dependiendo del SSO empleado, con mayor o menor efecto en intestino, pulmones, músculo esquelético, corazón, y otros órganos, pero nunca comparables a los observados en hígado, y en ninguno de los casos se observa efecto en cerebro (Parra *et al.*, 2011; Roberts *et al.*, 2006; Sazani *et al.*, 2002; White *et al.*, 2009). Este sería en el caso del TMEM165-CDG, con mayor necesidad de alcanzar el hueso, ya que el rasgo fenotípico principal de los tres pacientes portadores de la mutación en homocigosis es la displasia esquelética (Zeevaert *et al.*, 2013).

Por otro lado, en el caso de la PDE, el órgano diana sería el cerebro, ya que muchos de los pacientes, a pesar del tratamiento con piridoxina, presentan déficit cognitivo (Bok *et al.*, 2012; Perez *et al.*, 2013). Como ya se ha mencionado, tras la aplicación sistémica de los SSO, no se observa efecto en el cerebro, y en los casos en los que sí se ha observado, las dosis necesarias para ello son cien veces superiores, lo que aumenta el riesgo de toxicidad (Southwell *et al.*, 2012; Spitali y Aartsma-Rus, 2012). Actualmente, para el tratamiento con AOs, la única estrategia disponible en el caso de que el órgano diana sea el SNC, es su aplicación directa al mismo. Recientemente, se han descrito resultados muy alentadores tras completar la fase I de ensayos clínicos con pacientes con SMA, en la cual se ha demostrado que la inyección intratecal de un SSO tipo 2'-O-MOE, es segura y bien tolerada, e incluso se observa mejoría en algunos pacientes (NCT01494701) (Zanetta *et al.*, 2014). Aunque éstos son resultados importantes, el desarrollo de diferentes químicas o vehículos que permitan el paso de la barrera hematoencefálica sigue siendo un reto en la optimización de este tipo de terapias.

A pesar de todas las dificultades descritas, actualmente hay dos AOs aprobados para su uso clínico, Fomivirsén (Vitravene®) para el tratamiento de la retinitis pigmentosa inducida (Roehr, 1998) y recientemente la FDA ha aprobado Mipomersén (Kynamro®) para el tratamiento de la hipercolesterolemia familiar (McGowan *et al.*, 2012; Parhofer, 2012; Visser *et al.*, 2012), aunque se debe puntualizar que el mecanismo de acción de ambos es la inducción de la degradación del mRNA diana. Respecto a los SSOs que no inducen la degradación del mRNA diana, los más prometedores, actualmente en ensayos clínicos avanzados, son para el tratamiento de la DMD y la SMA (Flanigan *et al.*, 2014; Goemans *et al.*, 2011; Kinali *et al.*, 2009; Mendell *et al.*, 2013; Voit *et al.*, 2014; Zanetta *et al.*, 2014).

En resumen, este trabajo añade más evidencias a la necesidad del estudio del perfil transcripcional de los pacientes en busca de posibles mutaciones que afecten al proceso de *splicing* para la obtención de un diagnóstico completo, facilitando así la búsqueda de terapias apropiadas. En el caso de TMEM165-CDG, para la cual actualmente no existe ningún tratamiento, la terapia antisentido podría haber sido aplicada a 3 de los 5 pacientes descritos (Zeevaert *et al.*, 2013). En el caso de la PDE, actualmente existe tratamiento que parece ser efectivo para las crisis, pero no suficiente para asegurar el desarrollo normal del paciente (Bok *et al.*, 2012; Perez *et al.*, 2013). El tratamiento con piridoxina se centra en evitar sólo una parte de la toxicidad producida por los metabolitos acumulados debido al bloqueo de la vía (Mills *et al.*, 2006), sin embargo, la terapia basada en mRNA sería mucho más eficaz, ya que solucionaría tanto los problemas causados por la acumulación de productos tóxicos, como por la falta de la enzima, gracias a la recuperación de la proteína normal, aunque sólo sería aplicable a un número reducido de pacientes, porque a pesar de la alta frecuencia de mutaciones de *splicing* descritas en el gen *ALDH1A1*, 20,6 %, comparado con un 9,1 % general (Stenson *et al.*, 2014) (HGMD® professional release 2014.3), sólo tres de las reportadas incluida la descrita en este trabajo (Milh *et al.*, 2012; Salomons *et al.*, 2007), podrían beneficiarse de este tipo de terapia, ya que las demás afectan a los sitios naturales de *splicing*.

5.2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MUTACIONES *MISSENSE* DETECTADAS EN EL GEN *PMM2* Y TERAPIAS ENFOCADAS A LA ESTABILIZACIÓN DE MUTANTES

En esta parte del trabajo se ha llevado a cabo la caracterización funcional de nueve mutaciones *missense* descritas en pacientes *PMM2*-CDG, el CDG más común pero actualmente sin tratamiento, mediante un sistema de expresión procariota y eucariota con el fin de intentar evaluar su efecto y poder desarrollar terapias específicas de mutación, así como para intentar determinar una correlación genotipo-fenotipo, la cual actualmente no está completamente elucidada (Casado *et al.*, 2012; Giurgea *et al.*, 2005; Grunewald *et al.*, 2001; Kjaergaard *et al.*, 1999; Le Bizec *et al.*, 2005; Matthijs *et al.*, 2000; Matthijs *et al.*, 1998; Perez *et al.*, 2011; Pirard *et al.*, 1999b; Silvaggi *et al.*, 2006; Vega *et al.*, 2011; Westphal *et al.*, 2001).

Todos los datos obtenidos en este trabajo apuntan a que los mutantes estudiados presentan afectada su estabilidad. La primera evidencia de esto fue la observación de diferencias con respecto al WT, en la cantidad de proteína soluble detectada en el extracto bacteriano y la obtenida tras la purificación. En el caso del mutante p.F207S ni siquiera fue posible su detección en la fracción soluble debido a su rápida degradación y/o agregación. Estos resultados han sido apoyados por los ensayos de estabilidad termal y el estudio del perfil de degradación. Finalmente, se han obtenido resultados similares *in silico* mediante el análisis del algoritmo computacional FoldX, que predijo un efecto desestabilizador por parte de la mayoría de las mutaciones. Sólo en dos de los casos no coincidió la predicción con lo observado experimentalmente; en el caso del mutante p.R162W que lo predijo como más estable y en el caso del mutante p.F118L, análogo al mutante p.F122L de ratón, que lo predijo como más inestable. Los análisis *in silico* son un apoyo complementario a los datos obtenidos empíricamente y una buena estrategia de aproximación para el estudio de mutaciones muy poco frecuentes, que ha sido empleado con éxito anteriormente (Guerois *et al.*, 2002; Parthiban *et al.*, 2006; Pey *et al.*, 2007), pero siempre es necesaria su complementación experimental.

El estudio del perfil de oligomerización nos permitió clasificar a los mutantes en 3 categorías. Aquellos mutantes con comportamiento similar al WT, de los que se obtuvo mayor cantidad de dímeros que de agregados, como fueron los mutantes p.V44A, p.D65Y, p.R162W y p.T237M, que apunta a una mayor tendencia a ser degradados, aquellos con más agregados que dímeros, p.R123Q, p.R141H y p.C241S, que apunta a una mayor tendencia a agregar y el mutante p.P113L del que no se pudo obtener ningún perfil de oligomerización. Esta última mutación está localizada en la interfaz de dimerización (Silvaggi *et al.*, 2006), lo que explicaría la ausencia de dímeros. Este estudio, además, nos sugiere que los monómeros son probablemente muy inestables, ya que en ninguno de los casos se detecta pico correspondiente a los mismos.

Los resultados obtenidos de los ensayos de actividad de los extractos bacterianos mostraron una gran reducción de actividad de todos los mutantes, de entre un 70% y prácticamente un 100% respecto a la proteína WT. En el caso de los mutantes purificados en su forma dimérica esta reducción no fue tan acusada, variando entre un 53% y un 100%. En base a estos resultados, pudimos distinguir entre mutantes con cierta actividad residual, como p.V44A, p.D65Y, p.R162W, p.T237M y p.C241S y mutantes con actividad nula, como p.R141H y p.R123Q. Los datos de actividad obtenidos con este sistema de expresión con colas de histidinas fueron ligeramente inferiores a los obtenidos con la proteína de fusión con GST previamente descritos (Vega *et al.*, 2011), lo que pone de manifiesto el papel estabilizador del GST, característica reportada para otras proteínas de fusión con etiquetas grandes (Leandro *et al.*, 2011; Pey *et al.*, 2003; Smith, 2000). Probablemente los resultados de actividad descritos en este trabajo sean más reales, ya que se aprecia un mayor grado de correlación con los datos de actividad de extracto soluble de fibroblastos derivados de pacientes homocigotos o

hemicigotos funcionales para estas mutaciones descritos anteriormente (Vega *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos de la expresión y purificación de los diferentes mutantes en un sistema de expresión procariota, junto con los estudios de actividad, estabilidad y estudios *in silico*, sugirieron que la pérdida de función de la mayoría de los mutantes estudiados está basada en un aumento de la susceptibilidad a ser degradado y/o agregar comparados con la proteína WT. Estos estudios, junto con el análisis estructural de las mutaciones (Silvaggi *et al.*, 2006; Vega *et al.*, 2011), han permitido clasificar a estos mutantes en tres categorías. 1) mutantes de plegamiento como p.V44A, p.D65Y, p.R162W, p.F207S, p.T237M y p.C241S, 2) mutantes de plegamiento y catalíticos como p.R123Q y p.R141H y 3) mutantes de dimerización como p.P113L. Además, podríamos definir a los mutantes clasificados en la categoría uno como mutantes suaves ya que hemos podido detectar proteína soluble y retienen cierta actividad residual, a excepción de p.F207S, del cual no se ha podido detectar ni siquiera proteína soluble. Por otro lado los mutantes clasificados en las categorías dos y tres podrían considerarse severos debido a la falta casi total de actividad. Estos resultados, junto con lo descrito previamente (Andreotti *et al.*, 2013; Kjaergaard *et al.*, 1999; Le Bizec *et al.*, 2005; Perez *et al.*, 2011; Pirard *et al.*, 1999b; Silvaggi *et al.*, 2006; Vega *et al.*, 2011; Vuillaumier-Barrot *et al.*, 2000), sugieren que PMM2-CDG pueda ser considerada una enfermedad conformacional (Gregersen *et al.*, 2006), mecanismo que ha sido asociado a otras EMH como fenilcetonuria (Gamez *et al.*, 2000; Gjetting *et al.*, 2001; Pey *et al.*, 2003), fibrosis quística (Farinha y Amaral, 2005; Lukacs y Verkman, 2012), algunas enfermedades lisosomales (Fan *et al.*, 1999; Futerman y van Meer, 2004; Mu *et al.*, 2008b; Schmitz *et al.*, 2005), defectos en la oxidación de los ácidos grasos (Gregersen y Olsen, 2010; O'Reilly *et al.*, 2005; Pedersen *et al.*, 2003) y la aciduria metilmalónica aislada tipo cblB (Jorge-Finnigan *et al.*, 2010), entre otras.

Además, en este trabajo se ha demostrado la posibilidad de recuperación, en cantidad de proteína y actividad, de los mutantes p.V44A, p.D65Y, p.R162W y p.T237M en condiciones permisivas de plegamiento (28°C) en un modelo celular de enfermedad, lo que añade más evidencias a su inestabilidad (Gamez *et al.*, 2000; Pey *et al.*, 2003), a la posibilidad de recuperación de estos mutantes y sugiere que una prometedora aproximación terapéutica sería aquellas dirigida a la mejora de la estabilidad de mutantes inestables de PMM2.

El establecimiento de una correlación genotipo-fenotipo en el caso de PMM2-CDG es complicado debido al escaso número de homocigotos descritos, cuyo caso más llamativo es el del alelo más frecuente en la población, p.R141H, que no ha sido descrito en homocigosis, sugiriendo que la falta total de actividad PMM2 es incompatible con la vida (Matthijs *et al.*, 1998; Schollen *et al.*, 2000), lo que lleva a pensar, que sólo las mutaciones suaves pueden aparecer en homocigosis. La mayoría de los pacientes PMM2-CDG son hemicigotos funcionales portadores de una mutación severa, como p.R141H, p.F207S, p.R123Q y otra mutación suave, la mayoría de ellas con efecto

desestabilizador y que retienen cierta actividad residual (Perez *et al.*, 2011), como p.V44A, p.D65Y, p.R162W, p.T237M o p.C241S. Algunas de las mutaciones menos severas han sido asociadas a fenotipos más suaves, como en el caso más claro del mutante p.C241S (Briones *et al.*, 2002; Casado *et al.*, 2012; de Lonlay *et al.*, 2001; Giurgea *et al.*, 2005; Grunewald *et al.*, 2001; Westphal *et al.*, 2001). Sin embargo, otras mutaciones que según este trabajo podrían considerarse mutaciones suaves, como p.T237M o p.D65Y descritas tanto en heterocigosis como en homocigosis, o como p.V44A o p.R162W descritas sólo en heterocigosis, han sido asociadas a un amplio espectro de fenotipos desde suaves a severos (Briones *et al.*, 2002; de Lonlay *et al.*, 2001; Grunewald *et al.*, 2001; Matthijs *et al.*, 1998; Perez *et al.*, 2011; Quelhas *et al.*, 2007; Vega *et al.*, 2011). Esta inconsistencia entre el genotipo y el fenotipo es típica de mutaciones que afectan a la estabilidad de la proteína, ya que existen otros factores que pueden estar influyendo en la expresión del fenotipo. Por otra parte, el efecto sobre el fenotipo de la mutación p.P113L ha sido probablemente subestimado debido a su descripción en homocigosis en diferentes pacientes y a los resultados obtenidos previamente con la etiqueta GST que la clasificaron como suave (Perez *et al.*, 2011; Vega *et al.*, 2011). Sin embargo, el fenotipo de estos pacientes en heterocigosis, en algunos casos clasificado como moderado-severo (de Lonlay *et al.*, 2001; Grunewald *et al.*, 2001), junto con nuestros resultados que muestran una gran afectación de la dimerización, indican que podría ser considerada una mutación severa.

Las inconsistencias descritas entre el genotipo y el fenotipo pueden ser debidas a que en las enfermedades monogénicas el fondo genético de cada paciente puede estar influyendo en la expresión de la enfermedad (Dipple y McCabe, 2000; Genin *et al.*, 2008). En concreto, en las enfermedades conformacionales existen determinados elementos, como son el control de calidad de las proteínas (*Protein Quality Control*, PQC), formado por chaperonas que ayudan al plegamiento de proteínas y elementos implicados en la degradación de las mismas, o las condiciones celulares, como la temperatura y las situaciones de estrés (Gregersen, 2006), que pueden contribuir a la expresión de la enfermedad. Además, en el caso de PMM2, es una enzima implicada en una ruta de glicosilación en la que están implicadas alrededor de 75 proteínas (Freeze *et al.*, 2014), cuyo resultado final es el sumatorio de todas ellas. Variaciones en cualquiera de estos genes podrían modular el fenotipo de la enfermedad, como se ha descrito para un polimorfismo en el gen *ALG6* (causante del ALG6-CDG) que aparece de manera dos veces más frecuente en pacientes PMM2-CDG con fenotipo severo que con fenotipo suave o moderado (Westphal *et al.*, 2002).

Para el desarrollo de terapias específicas de mutación son necesarios estudios preclínicos en modelos animales adecuados. En nuestro caso, el posible desarrollo de terapias que mejoren el plegamiento de los mutantes de PMM2, nos llevó a estudiar las mutaciones que porta el único modelo murino actualmente disponible de PMM2-CDG, que podría ser utilizado para ensayos preclínicos (Schneider *et al.*, 2012). El estudio funcional de estos mutantes, p.R137H y p.F118L,

muestra que el mutante p.R137H se comporta de manera similar a su ortólogo humano p.R141H, siendo clasificado como mutante de estabilidad y catalítico y que la mutación p.F118L no afecta a la estabilidad de la proteína, afectando probablemente a sus propiedades catalíticas, posiblemente a su K_m , lo que explicaría su respuesta al incremento de sustrato (Schneider *et al.*, 2012). Respecto al análisis estructural de la mutación p.F122L, análogo de p.F118L en humanos, el residuo Phe¹²² parece contribuir al mantenimiento de un *core* hidrofóbico en la interfaz de dimerización necesario para la misma (Silvaggi *et al.*, 2006). El cambio de una fenilalanina por una leucina, ambos aminoácidos hidrofóbicos, podría no estar alterando ese *core* hidrofóbico necesario para la dimerización, sin embargo, este cambio de un aminoácido no aromático por uno aromático, podría estar provocando algún pequeño cambio estructural que afectara a la posición del aminoácido contiguo, Arg¹²³, implicado en la unión al sustrato y en el cierre de la estructura *core-cap* necesarios para la catálisis. Además, mutaciones en este residuo adyacente, como la descrita en este trabajo, p.R123Q, o la mutación p.R123G, parecen ser de naturaleza catalítica (Vega *et al.*, 2011; Silvaggi *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos del estudio de las mutaciones de Pmm2 indican que este modelo animal no sería un modelo apropiado para el testaje de posibles aproximaciones terapéuticas dirigidas a incrementar la estabilidad de los mutantes de plegamiento, ya que ninguna de las dos mutaciones que porta, presenta un defecto en la estabilidad sin presentar un defecto en las propiedades catalíticas.

En resumen, el estudio funcional de mutantes de PMM2 realizado en este trabajo sugiere que PMM2-CDG puede ser considerada una enfermedad conformacional. Además, el desarrollo de este nuevo sistema de expresión y purificación, establece una herramienta rápida y eficaz para la caracterización de mutaciones *missense* detectadas en *PMM2* con el fin de desarrollar terapias específicas de mutación e inferir una posible correlación genotipo-fenotipo. Además, el elevado porcentaje de mutaciones de este tipo reportadas en *PMM2*, aproximadamente el 80% (Stenson *et al.*, 2014) (*HGMD® professional release* 2014.3), hace que este sistema pueda abarcar el estudio de la gran mayoría de mutaciones descritas en esta enfermedad.

El hecho de que *PMM2-CDG* pueda ser considerada una enfermedad conformacional y la observación de la recuperación de algunas de las mutaciones en condiciones permisivas de plegamiento reportado en este trabajo, junto con el alto porcentaje de mutaciones *missense* detectado en *PMM2*, alrededor del 80% (Stenson *et al.*, 2014) (*HGMD® professional release* 2014.3), y que la mayoría de los pacientes son hemocigotos funcionales con una mutación nula y otra de plegamiento con cierta actividad residual (Perez *et al.*, 2011), hacen que *PMM2-CDG* sea una excelente candidata para ser tratada con pequeños compuestos que estabilicen a los mutantes mal plegados, como son las PCs y los PRs.

Las dos condiciones más importantes para la aplicación de este tipo de terapias son que los mutantes retengan actividad residual y que un leve incremento en la cantidad y actividad de la proteína consiga generar un gran beneficio terapéutico (Muntau *et al.*, 2014). Se desconoce el umbral de actividad enzimática para observar eficiencia clínica en PMM2-CDG, pero un pequeño incremento podría ser suficiente para aliviar fenotipos severos, como se ha observado en otras enfermedades metabólicas (Fan, 2008; Miyazaki *et al.*, 2001; Parenti *et al.*, 2007; Schueler *et al.*, 2004).

En este trabajo se han estudiado dos posibles aproximaciones terapéuticas basadas en pequeños compuestos que estabilicen a mutantes de plegamiento descritos en pacientes PMM2-CDG, la búsqueda y evaluación de PCs y la evaluación de PRs.

La búsqueda de PCs se puede realizar mediante estrategias dirigidas o mediante el rastreo de librerías de miles de compuestos químicos. En nuestro caso, se realizó mediante el rastreo de una librería comercial de 10.000 compuestos, seleccionando quince de ellos capaces de estabilizar a la proteína WT pura dimérica entre 0,8°C y 16,1°C. Posteriormente fueron validados y se fueron seleccionando mediante estudios de actividad y estabilidad con la proteína WT y estudios de estabilidad con diferentes mutantes caracterizados en este trabajo como inestables, p.V44A, p.D65Y, p.R123Q, p.R141H, p.R162W, p.T237M y p.C241S, en un sistema procarionta. Todos estos ensayos nos llevaron a seleccionar cuatro compuestos que fueron testados en un sistema eucariota con resultados muy prometedores como potenciales PCs para PMM2. A pesar de que hemos ido seleccionando compuestos para poder continuar con la validación de los mismos y realizar ensayos más específicos, no se debería descartar ninguno de los quince obtenidos en el rastreo de la librería como potenciales PCs para PMM2-CDG.

Los resultados de los ensayos de actividad de la proteína WT con los compuestos nos sugieren que éstos deben estar presente en el momento del plegamiento de la proteína, ya que no se observa prácticamente ningún incremento de actividad en el caso de la proteína WT pura dimérica previamente plegada incubada con los compuestos, pero sí que se observa un aumento, de entre un 20% y un 45%, cuando éstos son añadidos a las bacterias durante su crecimiento y por lo tanto están presentes en la síntesis y el plegamiento de la proteína.

Los ensayos de estabilidad realizados con los mutantes de plegamientos caracterizados en este trabajo, en los que se observó un incremento de la estabilidad térmica de entre 0,7°C y 45°C y un aumento de la vida media relativa de entre 1,4 y 5,2 veces respecto a su vida media basal relativa, sugieren que los compuestos seleccionados no son específicos de mutante, característica prometedora, ya que muchas de las PCs reportadas para otras enfermedades se han descrito como específicas de mutante (Erlandsen *et al.*, 2004; Flanagan *et al.*, 2009; Pey *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2007).

Sin embargo, hay que tener en cuenta, que la mayoría de los pacientes PMM2-CDG son portadores de una mutación de plegamiento y catalítica, como es la p.R141H, y una de plegamiento (Matthijs *et al.*, 1998; Perez *et al.*, 2011), y que esta falta de especificidad de los compuestos con respecto a los mutantes, podría influir en la capacidad de respuesta de algunos genotipos. Es de esperar, que el efecto de las PCs sobre la actividad de PMM2 en genotipos homocigotos o heterocigotos para mutaciones desestabilizadoras sea mayor que en genotipos heterocigotos con una de las mutaciones de plegamiento y catalítica, ya que ésta disminuirá la cantidad de PC disponible para unirse al otro mutante sin aportar funcionalidad. Una vez más, se evidencia la necesidad de la caracterización funcional y el estudio de los mutantes.

Los resultados obtenidos del perfil de degradación muestran una estabilización significativa de todos los mutantes testados incluido el mutante de dimerización p.P113L por parte del C1, C4, C9 y C15 con un aumento de vida media relativa de entre 2 y 5,2 veces respecto a su vida media relativa basal. Estos resultados amplían el espectro de mutaciones sobre el que se pueden utilizar estos compuestos a los mutantes de dimerización, los cuales son especialmente difíciles de tratar. Esta ampliación incluye a p.F119L, la segunda mutación más común en el norte de Europa después de p.R141H, que además de ser de plegamiento, presenta afectación en la estructura cuaternaria y produce un fenotipo severo (Andreotti *et al.*, 2013; Kjaergaard *et al.*, 1999; Pirard *et al.*, 1999b; Schollen *et al.*, 2000). Este efecto sobre la estructura cuaternaria de las proteínas se ha descrito para otras PCs (Canals *et al.*, 2009; Kobayashi *et al.*, 2009), incluso para una de las PCs aprobadas como fármaco, Tafamidis (Vindaquel®; Fx-1006A), que estabiliza la débil unión dímero-dímero de la proteína transtiretina evitando su disociación y agregación (Bulawa *et al.*, 2012).

El hecho de que el efecto de estos compuestos no parezca ser específico de mutación, siendo positivo sobre mutaciones presentes tanto en pacientes con fenotipos suaves, como moderados o severos, y además apunten a una posible aplicación sobre mutantes de dimerización, amplía de manera extraordinaria su posible aplicación clínica. Se han descrito otros mutantes inestables de PMM2, que no han sido estudiados en este trabajo pero que podrían ser buenos candidatos para ser recuperados mediante estos compuestos, aunque sería necesario realizar una caracterización funcional más específica de algunos de ellos (Andreotti *et al.*, 2013; Kjaergaard *et al.*, 1999; Le Bizec *et al.*, 2005; Perez *et al.*, 2011; Pirard *et al.*, 1999b; Silvaggi *et al.*, 2006; Vega *et al.*, 2011; Vuillaumier-Barrot *et al.*, 2000), para la cual, el sistema de expresión procariota descrito en este trabajo sería idóneo.

Con los resultados obtenidos hasta ahora y reflejados en este trabajo, el compuesto con mayor potencial para convertirse en PC de PMM2 sería C4. Éste es el compuesto que produce un mayor incremento de la actividad de PMM2 y el que presenta una ventana de concentración terapéutica más amplia en el modelo celular empleado con dos mutantes de estabilidad representativos, p.R162W y

p.T237M, la cual es la mutación más frecuente en la población española después de p.R141H (Perez *et al.*, 2011). C4 a 10 μ M, produce un incremento en la actividad en el caso del mutante p.R162W, partiendo de un 13%, actividad basal del mutante respecto al WT, a alrededor de un 20% y en el caso del mutante p.T237M, partiendo de un 50%, actividad basal del mutante respecto al WT, a un 80%. En ambos casos se produce un aumento de alrededor del 50% respecto a su actividad basal residual, que probablemente sea suficiente para observar un beneficio terapéutico en los pacientes PMM2-CDG como se ha observado en otras EMH (Fan, 2008; Miyazaki *et al.*, 2001; Parenti *et al.*, 2007; Schueler *et al.*, 2004).

Con los experimentos realizados hasta ahora no podemos asegurar el mecanismo de acción mediante el cual estos compuestos están ejerciendo su función estabilizadora. Éstos podrían estar uniéndose al centro activo de la misma o a alguna cavidad alostérica (Suzuki, 2014). La mayoría de las PCs descritas hasta ahora y las más eficaces en la estabilización de enzimas, son ligandos que se unen al sitio de unión del sustrato. Este tipo de PCs ha sido ampliamente estudiado en las enfermedades lisosomales (Boyd *et al.*, 2013; Fan y Ishii, 2007; Tropak *et al.*, 2007). Éstas deben ser usadas a concentraciones subinhibitorias, lo que restringe la ventana terapéutica de concentración complicando su desarrollo clínico, además, suelen presentar pocas propiedades para ser aplicados como fármacos, por lo tanto, lo óptimo sería un compuesto con alta afinidad por un sitio alostérico, proveyendo estabilización y al mismo tiempo evadiendo la inhibición de la enzima (Aymami *et al.*, 2014; Patnaik *et al.*, 2012; Porto *et al.*, 2012). De los datos obtenidos de los ensayos de actividad con la proteína WT pura dimérica, podríamos sugerir, de los cuatro compuestos que hemos testado en el modelo celular, que C1, C9 y C15 podrían ser inhibidores, ya que a altas concentraciones parece que inhiben la actividad enzimática de PMM2, pero sin embargo, C4 a la mayor concentración testada, ~250 μ M, no la inhibe, aunque esto no puede descartar que a mayores concentraciones lo haga. Actualmente se está investigando el sitio de unión de estos compuestos a la proteína con el fin de desarrollar series de compuestos con pequeñas modificaciones estructurales que mejoren sus propiedades como PC y como fármaco en general para una futura aplicación terapéutica.

Es necesario apuntar la necesidad de analizar el efecto de estos compuestos sobre la isoforma de PMM2, PMM1, ya que también pueden estar ejerciendo algún efecto, tanto positivo como negativo sobre ella, como ocurre con algunas de las PCs descritas para la fenilalanina hidroxilasa (PAH) y enzimas pertenecientes a su misma familia (Calvo *et al.*, 2010). PMM1 y PMM2 presentan diferente afinidad por los sustratos (Pirard *et al.*, 1999a) y aparentemente diferente función (Veigada-Cunha *et al.*, 2008). Además, Pmm1 no ha sido descrita como causante de enfermedad, no parece ser esencial en el desarrollo del ratón (Cromphout *et al.*, 2006), ni puede compensar la falta de Pmm2 en el ratón *Knock out* para la misma (Thiel *et al.*, 2006), pero presentan un 65% de homología (Silvaggi *et al.*, 2006).

Recientemente se ha descrito la estabilización *in vivo* de la formación del dímero del mutante p.F119L de PMM2 mediante uno de sus posibles cofactores, la glucosa-1,6-bisfosfato (Andreotti *et al.*, 2013). Como ya se ha comentado, la unión a las enzimas de ligandos naturales como sustratos, cofactores, activadores o inhibidores, ejerce, normalmente, un efecto estabilizador sobre las mismas (Bernier *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2008). Estos resultados añaden más evidencias al posible tratamiento de PMM2-CDG mediante estabilizadores como las PCs y abre la puerta a una posible terapia mediante el incremento intracelular de la concentración de este ligando.

La descripción en otras enfermedades conformacionales del efecto sinérgico de la aplicación conjunta de PCs y PRs, debido a la capacidad de estos últimos de aumentar la cantidad de proteína soluble disponible para que la PC pueda unirse y ejercer su función (Mu *et al.*, 2008b; Powers *et al.*, 2009), nos llevó a la evaluación de diferentes PRs para PMM2-CDG. El incremento en los últimos años del conocimiento de la red de proteostasis ha permitido el desarrollo de estas nuevas estrategias terapéuticas con PRs, compuestos capaces de incrementar la capacidad de esta red de manera genérica (Ong y Kelly, 2011; Powers *et al.*, 2009), para el tratamiento del creciente grupo de enfermedades conformacionales. Además, este tipo de terapias ha sido aplicada y desarrollada con éxito sobre mutantes muy inestables sobre los que las PCs de manera individual no pueden ejercer su función debido a la insuficiente cantidad de proteína soluble disponible (Mu *et al.*, 2008b; Powers *et al.*, 2009), lo que abre una posibilidad para el posible tratamiento de determinados mutantes muy inestables de PMM2 como p.F207S.

En este trabajo se han evaluado tres PRs, celastrol, MG132 (Mu *et al.*, 2008b) y CBX (Kawashima *et al.*, 2009) en un modelo celular sobreexpresando las mutaciones p.R162W y p.T237M respectivamente, como en el caso de las PCs. Los resultados preliminares obtenidos son prometedores, ya que se ha podido observar un incremento de la actividad de los dos mutantes con celastrol, compuesto más efectivo a 0,4 μM , incrementando la actividad del mutante p.R162W, partiendo de un 13%, actividad basal del mutante respecto al WT, a un 40%, un incremento del 230% respecto a su actividad basal, y en el caso del mutante p.T237M, partiendo de un 50%, actividad basal del mutante respecto al WT, a un 85%, un incremento de aproximadamente el 60% respecto a su basal. También se ha observado aumento en la actividad del mutante p.R162W, aunque en menor medida, con MG132 y CBX, sin embargo, estos compuestos a las concentraciones testadas son ineficaces sobre el mutante p.T237M. Estos resultados son preliminares pero alentadores, sobre todo en el caso del celastrol, y actualmente estamos trabajando en la confirmación y en la adición de más evidencias de la estabilización de estos mutantes por parte de estos compuestos.

Para conocer la modulación de qué vías de la red de proteostasis son la mejor opción terapéutica en cada caso, es importante conocer previamente qué componentes de esta red interaccionan con cada proteína, como se ha estudiado por ejemplo, con la proteína CFTR (Koulov *et*

al., 2010; Ong y Kelly, 2011; Wang *et al.*, 2006), el receptor GABA_c (Wang *et al.*, 2013) o en Alzheimer (Dimant *et al.*, 2012). En el caso de PMM2 estos mecanismos se desconocen, a excepción de que es una enzima citoplasmática y por lo tanto nuestra hipótesis se centra en que la activación de la HSR con el correspondiente aumento de chaperonas moleculares citoplasmáticas, ayudará a la estabilización de los mutantes de PMM2. Por otra parte, la investigación del sistema de degradación de PMM2 guiaría la aplicación de moduladores de esta vía con el fin de evitarla. Esta aplicación sería especialmente interesante en el caso de los mutantes en los que se ha descrito una mayor tendencia a ser degradados, como p.V44A, p.D65Y, p.R162W y p.T237M, los cuales han sido estudiados funcionalmente en este trabajo. En el caso del uso del inhibidor del proteasoma MG132, si PMM2 fuera degradada por esta vía, evitar su eliminación aumentaría la cantidad de proteína disponible para que ejercieran su función las chaperonas moleculares citoplasmáticas generadas tras la activación de la HSR. Con los resultados obtenidos en este trabajo no es posible elucidar el mecanismo de acción implicado en el incremento de actividad de estos dos mutantes inestables de PMM2 por parte de estos tres compuestos, por lo que son necesarios experimentos futuros para ello.

La modulación de vías reguladoras de la proteostasis es una aproximación muy atractiva ya que presenta la ventaja de ser una estrategia terapéutica más general y por lo tanto, un mismo PR puede ser empleado para diferentes enfermedades conformacionales asumiendo que las proteínas mutantes dependan de componentes comunes de la red de proteostasis (Ong y Kelly, 2011), como se ha demostrado con éxito en diferentes enfermedades lisosomales (Mu *et al.*, 2008b). Además, algunos de ellos son fármacos previamente aprobados para su uso en otras enfermedades (Mu *et al.*, 2008a; Yang *et al.*, 2008), como CBX, ampliamente utilizado en el tratamiento de úlceras pépticas (Pinder *et al.*, 1976) y algunos han sido extensamente estudiados en enfermedades con alta prevalencia, como los inhibidores del proteasoma en cáncer (Orlowski y Kuhn, 2008), de los cuales ya hay uno aceptado como fármaco, Bortezomib (Velcade®) (Kane *et al.*, 2003; Twombly, 2003). Sin embargo, esta red está finamente ajustada y altamente integrada, por lo que modificarla conlleva un espectro de efectos secundarios no intencionados (Lindquist y Kelly, 2011; Sloan *et al.*, 2009). Para evitar un efecto tan general, se están estudiando pequeñas moléculas de segunda generación más selectivos y específicos, capaces de modular sólo determinados componentes de una vía, como por ejemplo, determinadas chaperonas, en vez de activar una vía completa (Chang *et al.*, 2011; Evans *et al.*, 2010; Marozkina *et al.*, 2010; Tsaytler *et al.*, 2011).

Por otra parte, el uso de PRs modulando otro tipo de vías, podría ampliarse al conjunto de CDGs. Como dianas terapéuticas para estas enfermedades se ha sugerido la activación de la UPR de manera moderada y en concreto, de la chaperona Grp78 en determinados tipos celulares (Lehrman, 2006; Sun *et al.*, 2013) debido a la descripción de cierto estrés basal en fibroblastos de pacientes

CDGs tipo I, al efecto positivo del estrés de RE sobre la síntesis del LLO y la N-glicosilación (Lecca *et al.*, 2005; Lehrman, 2006; Shang *et al.*, 2007; Shang *et al.*, 2002) y a la susceptibilidad selectiva de las neuronas cerebelares de ratón a defectos en la N-glicosilación debido a su ineficiente respuesta a estrés de RE (Sun *et al.*, 2013). Además, se ha demostrado en otras enfermedades conformacionales como las enfermedades lisosomales, que la modulación del Ca²⁺ en el RE ayuda al plegamiento y al tráfico de proteínas mal plegadas en el mismo (Mu *et al.*, 2008a; Ong *et al.*, 2010), como sería el caso de las proteínas hipoglicosiladas generadas en los CDGs, por lo que la modulación de esta vía podría ser otra diana para el tratamiento de los CDGs con PRs.

El siguiente paso para la validación de estos compuestos como potenciales PCs de PMM2 y la evaluación de los PRs, sería el estudio de su farmacocinética (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) y de su farmacodinámica (Tuntland *et al.*, 2014) en un modelo animal. Debido a falta de un modelo animal apropiado de PMM2-CDG, la mejor opción sería el uso de un ratón WT, como ya se ha empleado en otros casos (Calvo *et al.*, 2010; Jorge-Finnigan *et al.*, 2013; Pey *et al.*, 2008). Una aproximación previa muy prometedora sería la generación de células madre pluripotentes (*induced pluripotent stem cells, iPS*) a partir de fibroblastos de pacientes portadores de mutaciones de plegamiento y su posterior diferenciación en diferentes tipos celulares (Inoue *et al.*, 2014; Robinton y Daley, 2012), ya que estos pacientes presentan afectación multisistémica, incluido el SNC (Grunewald, 2009). Además, esto permitiría estudiar la fisiopatología de la enfermedad en un modelo celular más adecuado al que utilizamos en la actualidad (Cline *et al.*, 2012; Foulquier *et al.*, 2012; Grunewald *et al.*, 2001) y así evitar la necesidad de sobreexpresar la proteína para poder ver el efecto de los compuestos. Esta aproximación ya ha sido desarrollada en otras enfermedades conformacionales para el testaje de chaperonas químicas (Shang *et al.*, 2014), PCs (Panicker *et al.*, 2014; Tiscornia *et al.*, 2013) y PRs (Mehta *et al.*, 2014).

La naturaleza multisistémica de la enfermedad provoca la necesidad de una distribución sistémica de los compuestos incluido el SNC (Grunewald, 2009). En principio, los compuestos que forman parte de la librería comercial empleada para el rastreo de PCs, cumplen las cinco reglas de Lipinski, lo que aumenta las probabilidades de presentar alta absorción e infiltración, así como de cruzar la barrera hematoencefálica, además de poder ser administrado oralmente debido a su bajo peso molecular (Lipinski *et al.*, 2001).

El hecho de que los pacientes PMM2-CDG sean sintomáticos al nacer (Grunewald, 2009), la observación de la letalidad en el ratón *Knock out* para *Pmm2* (Thiel *et al.*, 2006), del fenotipo totalmente normal obtenido en el modelo de ratón de PMM2-CDG tras la administración de manosa a la madre antes y durante el embarazo (Schneider *et al.*, 2012), apunta a que cualquier tratamiento debería ser administrado durante el desarrollo embrionario. A pesar de ello, una administración posterior podría atenuar los síntomas y evitar parte de la afectación sistémica y progresiva que se

observa en estos pacientes, sobre todo durante el primer estadio de la enfermedad, el visceral, cuando se produce la mayor tasa de mortalidad, alrededor del 20% (Grunewald, 2009).

La opción terapéutica del uso de PCs y/o PRs para PMM2-CDG, es una alternativa muy prometedora, ya que está dirigida directamente al problema, a incrementar la cantidad de enzima funcional. Otras opciones terapéuticas sugeridas para esta enfermedad incluyen la manipulación de flujos metabólicos, como el de manosa (Sharma *et al.*, 2011), cuya modulación puede conllevar graves efectos (Cline *et al.*, 2012; de la Fuente *et al.*, 1986; DeRossi *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2014; Sols *et al.*, 1960). También se ha sugerido la manipulación del flujo de glucosa con el fin de incrementar la glucosa-1,6-bisfosfato intracelular, recientemente descrita como estabilizador de PMM2 (Andreotti *et al.*, 2013), pero esta manipulación muy probablemente presentaría también efectos negativos graves.

La descripción de estos compuestos como potenciales PCs o PRs constituye una prueba de concepto sobre el posible uso de pequeños compuestos estabilizadores que actúen de manera directa o indirecta sobre PMM2 y establece los cimientos del estudio de una nueva terapia para pacientes PMM2-CDG. Además, añade más evidencias al éxito conseguido con este tipo de compuestos, actualmente en estado preclínico, clínico o fármacos aprobados, que actúan como PCs o como PRs en las denominadas enfermedades conformacionales, algunas de las cuales son EMH (Gavrin *et al.*, 2012; Leidenheimer y Ryder, 2014; Lindquist y Kelly, 2011; Muntau *et al.*, 2014; Powers *et al.*, 2009; Suzuki, 2014).

6. Conclusiones/Conclusions

1. El análisis del perfil transcripcional junto con el estudio de las variantes encontradas mediante un sistema *ex vivo* de minigenes nos ha permitido la identificación y caracterización de dos mutaciones que afectan al proceso de *splicing* causantes de enfermedad, una mutación exónica (c.75C>T) en el gen *ALDH7A1*, la cual habría sido clasificada como silenciosa sin los estudios transcripcionales realizados y una mutación intrónica interna (c.792+182G>A) en el gen *TMEM165*.
2. La terapia antisentido permite la recuperación del proceso de *splicing* y por lo tanto de la correspondiente proteína funcional correctamente localizada. La aplicación con éxito de esta terapia sobre las mutaciones de *splicing* caracterizadas en este trabajo abre la puerta a un posible tratamiento para la PDE y el TMEM165-CDG.
3. Los estudios de actividad y estabilidad de la proteína PMM2 en un sistema de expresión procariota y eucariota junto con estudios *in silico*, nos han permitido caracterizar funcionalmente diferentes mutantes descritos en pacientes PMM2-CDG. Se han identificado mutaciones que afectan al plegamiento de la proteína cuya actividad es recuperable *ex vivo* en condiciones permisivas de plegamiento, así como mutaciones que afectan al plegamiento y al proceso catalítico y una mutación que afecta a la dimerización.
4. La principal causa de pérdida de función de los mutantes descritos en PMM2-CDG es su inestabilidad y por lo tanto su tendencia a agregar o a ser degradados, lo que sugiere que PMM2-CDG pueda ser considerada una enfermedad conformacional.
5. Hemos podido inferir la severidad de las mutaciones estudiadas y describir una posible correlación genotipo-fenotipo, identificando mutantes más suaves que retienen cierta actividad residual y mutantes severos que afectan a la catálisis o a la dimerización de la proteína.
6. La identificación de una serie de compuestos como potenciales chaperonas farmacológicas que estabilizan a PMM2, siendo cuatro de ellos capaces de aumentar su actividad en células de pacientes portadoras de mutaciones de plegamiento, abre una nueva y prometedora opción terapéutica para PMM2-CDG, enfermedad actualmente sin tratamiento.
7. Se ha identificado un regulador de la proteostasis, celastrol, que parece estabilizar indirectamente a PMM2 al incrementar su actividad en un modelo celular de enfermedad y que podría ser aplicado conjuntamente con chaperonas farmacológicas con el fin de aumentar de manera sinérgica la estabilidad de mutantes de plegamiento.
8. El éxito de las aproximaciones terapéuticas descrito en este trabajo para PDE, TMEM165-CDG y PMM2-CDG, abre nuevas perspectivas para el tratamiento de otras enfermedades raras al demostrar la eficacia de terapias basadas en el mecanismo de acción de las mutaciones.

1. Transcriptional profile analysis combined with a mutational study using an *ex vivo* minigene system have allowed us to characterize two mutations affecting the splicing process, one exonic mutation (c.75C>T) in *ALDH7A1* gene, which would have been classified as “silent” if the proposed transcriptional studies were not performed, and one deep intronic mutation (c.792+182G>A) in *TMEM165* gene.
2. Antisense therapy enables the transcriptional profile recovery and therefore the proper protein translation. The successful antisense therapy described in this work offers the possibility of a new therapeutic approach for two inherited metabolic diseases, PDE and *TMEM165*-CDG.
3. PMM2 activity and stability analysis in a prokaryotic and an eukaryotic expression system combined with *in silico* studies have allowed us to characterize functionally missense mutations described in PMM2-CDG patients. We have identified folding mutations, whose activity has been recovered *ex vivo* in permissive folding conditions, folding and catalytic mutations and one mutation affecting dimer interaction.
4. Loss-of-function of most of mutant proteins described in PMM2-CDG is based on their instability and therefore their tendency to be degraded and/or aggregated, suggesting that PMM2-CDG could be considered a conformational disease.
5. We have described mutants severity as well as a tentative genotype-phenotype correlation by identifying mild mutants which retain some residual activity and severe mutants which affect protein catalysis or dimerization.
6. The identification of some chemical compounds as potential pharmacological chaperones for PMM2, being four of them the most promising ones by increasing PMM2 activity in patients-derived fibroblasts over-expressing folding mutants, paves the way to develop a new promising therapy for PMM2-CDG, the most common CDG for which, up to date, there is no curative treatment available.
7. We have identified a proteostasis regulator, celastrol, which appears to indirectly stabilize PMM2 since it is able to increase mutants’ activity in a cellular disease model. Furthermore, this compound could be co-applied with pharmacological chaperones in order to increase mutants’ stability in a synergistic manner.
8. The success of the therapeutic approaches on PDE, *TMEM165*-CDG and PMM2-CDG described in this work shed some light on treatments for other rare diseases by specific mutation therapies aimed at mRNA or proteins.

7. Bibliografía

- Almeida, A. M., Murakami, Y., Baker, A., Maeda, Y., Roberts, I. A., Kinoshita, T., Layton, D. M. y Karadimitris, A. (2007). Targeted therapy for inherited GPI deficiency. *New England Journal of Medicine* 356, 1641-7.
- Andreotti, G., Pedone, E., Giordano, A. y Cubellis, M. V. (2013). Biochemical phenotype of a common disease-causing mutation and a possible therapeutic approach for the phosphomannomutase 2-associated disorder of glycosylation. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 1, 32-44.
- Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-30.
- Arakawa, T., Ejima, D., Kita, Y. y Tsumoto, K. (2006). Small molecule pharmacological chaperones: From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs. *Biochimica et Biophysica Acta* 1764, 1677-87.
- Arechavala-Gomez, V., Kinali, M., Feng, L., Guglieri, M., Edge, G., Main, M., Hunt, D., Lehovsky, J., Straub, V., Bushby, K., Sewry, C. A., Morgan, J. E. y Muntoni, F. (2010). Revertant fibres and dystrophin traces in Duchenne muscular dystrophy: implication for clinical trials. *Neuromuscular Disorders* 20, 295-301.
- Arrabal, L., Teresa, L., Sanchez-Alcudia, R., Castro, M., Medrano, C., Gutierrez-Solana, L., Roldan, S., Ormazabal, A., Perez-Cerda, C., Merinero, B., Perez, B., Artuch, R., Ugarte, M. y Desviat, L. R. (2011). Genotype-phenotype correlations in sepiapterin reductase deficiency. A splicing defect accounts for a new phenotypic variant. *Neurogenetics* 12, 183-91.
- Arslan, A. D., He, X., Wang, M., Rumschlag-Booms, E., Rong, L. y Beck, W. T. (2013). A high-throughput assay to identify small-molecule modulators of alternative pre-mRNA splicing. *Journal of Biomolecular Screening* 18, 180-90.
- Aymami, J., Barril, X., Delgado, A., Revés, M., Lavilla, R., Higaki, K., García-Collazo, A. M., Rodríguez-Pascau, L., Cubero, E. y Pizcueta, P. Enzyme enhancement therapy through non-competitive pharmacological chaperones. *International Work-Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering 2014. "Proceedings IWBBIO 2014"*. 2014, p. 390-395.
- Balch, W. E., Morimoto, R. I., Dillin, A. y Kelly, J. W. (2008). Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 319, 916-9.
- Baralle, D. y Baralle, M. (2005). Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *Journal of Medical Genetics* 42, 737-48.
- Baralle, D., Lucassen, A. y Buratti, E. (2009). Missed threads. The impact of pre-mRNA splicing defects on clinical practice. *EMBO Reports* 10, 810-6.
- Barone, R., Sturiale, L., Palmigiano, A., Zappia, M. y Garozzo, D. (2012). Glycomics of pediatric and adulthood diseases of the central nervous system. *Journal of Proteomics* 75, 5123-39.
- Bauman, J. A., Li, S. D., Yang, A., Huang, L. y Kole, R. (2010). Anti-tumor activity of splice-switching oligonucleotides. *Nucleic Acids Research* 38, 8348-56.
- Baxter, P. (1999). Epidemiology of pyridoxine dependent and pyridoxine responsive seizures in the UK. *Archives of Disease in Childhood* 81, 431-3.

Bedikian, A. Y., Garbe, C., Conry, R., Lebbe, C. y Grob, J. J. (2014). Dacarbazine with or without oblimersen (a Bcl-2 antisense oligonucleotide) in chemotherapy-naïve patients with advanced melanoma and low-normal serum lactate dehydrogenase: 'The AGENDA trial'. *Melanoma Research* 24, 237-43.

Behne, M. J., Tu, C. L., Aronchik, I., Epstein, E., Bench, G., Bikle, D. D., Pozzan, T. y Mauro, T. M. (2003). Human keratinocyte ATP2C1 localizes to the Golgi and controls Golgi Ca²⁺ stores. *Journal of Investigative Dermatology* 121, 688-94.

Belaya, K., Finlayson, S., Cossins, J., Liu, W. W., Maxwell, S., Palace, J. y Beeson, D. (2012a). Identification of DPAGT1 as a new gene in which mutations cause a congenital myasthenic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1275, 29-35.

Belaya, K., Finlayson, S., Slater, C. R., Cossins, J., Liu, W. W., Maxwell, S., McGowan, S. J., Maslau, S., Twigg, S. R., Walls, T. J., Pascual Pascual, S. I., Palace, J. y Beeson, D. (2012b). Mutations in DPAGT1 cause a limb-girdle congenital myasthenic syndrome with tubular aggregates. *American Journal of Human Genetics* 91, 193-201.

Bennett, C. F. y Swayze, E. E. (2010). RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 50, 259-93.

Bernier, V., Lagace, M., Bichet, D. G. y Bouvier, M. (2004). Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 15, 222-8.

Bill, B. R., Petzold, A. M., Clark, K. J., Schimmenti, L. A. y Ekker, S. C. (2009). A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish* 6, 69-77.

Bok, L. A., Halbertsma, F. J., Houterman, S., Wevers, R. A., Vreeswijk, C., Jakobs, C., Struys, E., Van Der Hoeven, J. H., Sival, D. A. y Willemsen, M. A. (2012). Long-term outcome in pyridoxine-dependent epilepsy. *Developmental Medicine and Child Neurology* 54, 849-54.

Boyd, R. E., Lee, G., Rybczynski, P., Benjamin, E. R., Khanna, R., Wustman, B. A. y Valenzano, K. J. (2013). Pharmacological chaperones as therapeutics for lysosomal storage diseases. *Journal of Medicinal Chemistry* 56, 2705-25.

Brasil, S., Viecelli, H. M., Meili, D., Rassi, A., Desviat, L. R., Perez, B., Ugarte, M. y Thony, B. (2011). Pseudoexon exclusion by antisense therapy in 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency. *Human Mutation* 32, 1019-27.

Briones, P., Vilaseca, M. A., Schollen, E., Ferrer, I., Maties, M., Busquets, C., Artuch, R., Gort, L., Marco, M., van Schaftingen, E., Matthijs, G., Jaeken, J. y Chabas, A. (2002). Biochemical and molecular studies in 26 Spanish patients with congenital disorder of glycosylation type Ia. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 25, 635-46.

Brocker, C., Lassen, N., Estey, T., Pappa, A., Cantore, M., Orlova, V. V., Chavakis, T., Kavanagh, K. L., Oppermann, U. y Vasiliou, V. (2010). Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) is a novel enzyme involved in cellular defense against hyperosmotic stress. *Journal of Biological Chemistry* 285, 18452-63.

Bulawa, C. E., Connelly, S., Devit, M., Wang, L., Weigel, C., Fleming, J. A., Packman, J., Powers, E. T., Wiseman, R. L., Foss, T. R., Wilson, I. A., Kelly, J. W. y Labaudiniere, R. (2012). Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 9629-34.

Bush, K. T., Goldberg, A. L. y Nigam, S. K. (1997). Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *Journal of Biological Chemistry* 272, 9086-92.

Calamini, B. y Morimoto, R. I. (2012). Protein homeostasis as a therapeutic target for diseases of protein conformation. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 12, 2623-40.

Calamini, B., Silva, M. C., Madoux, F., Hutt, D. M., Khanna, S., Chalfant, M. A., Saldanha, S. A., Hodder, P., Tait, B. D., Garza, D., Balch, W. E. y Morimoto, R. I. (2012). Small-molecule proteostasis regulators for protein conformational diseases. *Nature Chemical Biology* 8, 185-96.

Calvo, A. C., Scherer, T., Pey, A. L., Ying, M., Winge, I., McKinney, J., Haavik, J., Thony, B. y Martinez, A. (2010). Effect of pharmacological chaperones on brain tyrosine hydroxylase and tryptophan hydroxylase 2. *Journal of Neurochemistry* 114, 853-63.

Canals, M., Lopez-Gimenez, J. F. y Milligan, G. (2009). Cell surface delivery and structural reorganization by pharmacological chaperones of an oligomerization-defective alpha(1b)-adrenoceptor mutant demonstrates membrane targeting of GPCR oligomers. *Biochemical Journal* 417, 161-72.

Cartegni, L., Chew, S. L. y Krainer, A. R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews Genetics* 3, 285-98.

Casado, M., O'Callaghan, M. M., Montero, R., Perez-Cerda, C., Perez, B., Briones, P., Quintana, E., Muchart, J., Aracil, A., Pineda, M. y Artuch, R. (2012). Mild clinical and biochemical phenotype in two patients with PMM2-CDG (congenital disorder of glycosylation Ia). *Cerebellum* 11, 557-63.

Cirak, S., Feng, L., Anthony, K., Arechavala-Gomez, V., Torelli, S., Sewry, C., Morgan, J. E. y Muntoni, F. (2012). Restoration of the dystrophin-associated glycoprotein complex after exon skipping therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Molecular Therapy* 20, 462-7.

Clayton, P. T. (2006). B6-responsive disorders: a model of vitamin dependency. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 29, 317-26.

Cline, A., Gao, N., Flanagan-Steet, H., Sharma, V., Rosa, S., Sonon, R., Azadi, P., Sadler, K. C., Freeze, H. H., Lehrman, M. A. y Steet, R. (2012). A zebrafish model of PMM2-CDG reveals altered neurogenesis and a substrate-accumulation mechanism for N-linked glycosylation deficiency. *Molecular Biology of the Cell* 23, 4175-87.

Cossins, J., Belaya, K., Hicks, D., Salih, M. A., Finlayson, S., Carboni, N., Liu, W. W., Maxwell, S., Zoltowska, K., Farsani, G. T., Laval, S., Seidhamed, M. Z., Donnelly, P., Bentley, D., McGowan, S. J., Muller, J., Palace, J., Lochmuller, H. y Beeson, D. (2013). Congenital myasthenic syndromes due to mutations in ALG2 and ALG14. *Brain* 136, 944-56.

Cromphout, K., Keldermans, L., Snellinx, A., Collet, J. F., Grunewald, S., De Geest, N., Sciot, R., Vanschaftingen, E., Jaeken, J., Matthijs, G. y Hartmann, D. (2005). Tissue distribution of the murine phosphomannomutases Pmm1 and Pmm2 during brain development. *European Journal of Neuroscience* 22, 991-6.

Cromphout, K., Vleugels, W., Heykants, L., Schollen, E., Keldermans, L., Sciot, R., D'Hooge, R., De Deyn, P. P., von Figura, K., Hartmann, D., Korner, C. y Matthijs, G. (2006). The normal phenotype of Pmm1-deficient mice suggests that Pmm1 is not essential for normal mouse development. *Molecular and Cellular Biology* 26, 5621-35.

Cylwik, B., Lipartowska, K., Chrostek, L. y Gruszewska, E. (2013a). Congenital disorders of glycosylation. Part II. Defects of protein O-glycosylation. *Acta Biochimica Polonica* 60, 361-8.

Cylwik, B., Naklicki, M., Chrostek, L. y Gruszewska, E. (2013b). Congenital disorders of glycosylation. Part I. Defects of protein N-glycosylation. *Acta Biochimica Polonica* 60, 151-61.

Chamary, J. V., Parmley, J. L. y Hurst, L. D. (2006). Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals. *Nature Reviews Genetics* 7, 98-108.

Chan, C. L., Wong, J. W., Wong, C. P., Chan, M. K. y Fong, W. P. (2011). Human antiquitin: structural and functional studies. *Chemico-Biological Interactions* 191, 165-70.

Chandrasekharappa, S. C., Lach, F. P., Kimble, D. C., Kamat, A., Teer, J. K., Donovan, F. X., Flynn, E., Sen, S. K., Thongthip, S., Sanborn, E., Smogorzewska, A., Auerbach, A. D. y Ostrander, E. A. (2013). Massively parallel sequencing, aCGH, and RNA-Seq technologies provide a comprehensive molecular diagnosis of Fanconi anemia. *Blood* 121, e138-48. doi: 10.1182/blood-2012-12-474585.

Chang, L., Miyata, Y., Ung, P. M., Bertelsen, E. B., McQuade, T. J., Carlson, H. A., Zuiderweg, E. R. y Gestwicki, J. E. (2011). Chemical screens against a reconstituted multiprotein complex: myricetin blocks DnaJ regulation of DnaK through an allosteric mechanism. *Chemistry and Biology* 18, 210-21.

Chu, J., Mir, A., Gao, N., Rosa, S., Monson, C., Sharma, V., Steet, R., Freeze, H. H., Lehrman, M. A. y Sadler, K. C. (2013). A zebrafish model of congenital disorders of glycosylation with phosphomannose isomerase deficiency reveals an early opportunity for corrective mannose supplementation. *Disease Models and Mechanisms* 6, 95-105.

David, A., Srirangalingam, U., Metherell, L. A., Khoo, B. y Clark, A. J. (2010). Repair of aberrant splicing in growth hormone receptor by antisense oligonucleotides targeting the splice sites of a pseudoexon. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95, 3542-6.

De Conti, L., Baralle, M. y Buratti, E. (2013). Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 4, 49-60.

de Koning, T. J., Dorland, L., van Diggelen, O. P., Boonman, A. M., de Jong, G. J., van Noort, W. L., De Schryver, J., Duran, M., van den Berg, I. E., Gerwig, G. J., Berger, R. y Poll-The, B. T. (1998). A novel disorder of N-glycosylation due to phosphomannose isomerase deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 245, 38-42.

de la Fuente, M., Penas, P. F. y Sols, A. (1986). Mechanism of mannose toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 140, 51-5.

- de la Morena-Barrio, M. E., Hernandez-Caselles, T., Corral, J., Garcia-Lopez, R., Martinez-Martinez, I., Perez-Duenas, B., Altisent, C., Sevivas, T., Kristensen, S. R., Guillen-Navarro, E., Minano, A., Vicente, V., Jaeken, J. y Lozano, M. L. (2013). GPI-anchor and GPI-anchored protein expression in PMM2-CDG patients. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8, 170.
- dde Lonlay, P., Seta, N., Barrot, S., Chabrol, B., Drouin, V., Gabriel, B. M., Journal, H., Kretz, M., Laurent, J., Le Merrer, M., Leroy, A., Pedespan, D., Sarda, P., Villeneuve, N., Schmitz, J., van Schaftingen, E., Matthijs, G., Jaeken, J., Korner, C., Munnich, A., Saudubray, J. M. y Cormier-Daire, V. (2001). A broad spectrum of clinical presentations in congenital disorders of glycosylation I: a series of 26 cases. *Journal of Medical Genetics* 38, 14-9.
- Demaegd, D., Colinet, A. S., Deschamps, A. y Morsomme, P. (2014). Molecular evolution of a novel family of putative calcium transporters. *PLoS One* 9, e100851. doi: 10.1371/journal.pone.0100851.
- Demaegd, D., Foulquier, F., Colinet, A. S., Gremillon, L., Legrand, D., Mariot, P., Peiter, E., Van Schaftingen, E., Matthijs, G. y Morsomme, P. (2013). Newly characterized Golgi-localized family of proteins is involved in calcium and pH homeostasis in yeast and human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 6859-64.
- DeRossi, C., Bode, L., Eklund, E. A., Zhang, F., Davis, J. A., Westphal, V., Wang, L., Borowsky, A. D. y Freeze, H. H. (2006). Ablation of mouse phosphomannose isomerase (Mpi) causes mannose 6-phosphate accumulation, toxicity, and embryonic lethality. *Journal of Biological Chemistry* 281, 5916-27.
- Desviat, L. R., Perez, B. y Ugarte, M. (2012). Minigenes to confirm exon skipping mutations. *Methods in Molecular Biology* 867, 37-47.
- Desviat, L. R., Pérez, B. y Ugarte, M. (2001). Bases moleculares de las enfermedades metabólicas hereditarias. En *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias*, (ed. P. Sanjurjo A. Baldellou and S. Ergon), pp. 1-13. Madrid.
- Dhir, A. y Buratti, E. (2010). Alternative splicing: role of pseudoexons in human disease and potential therapeutic strategies. *The FEBS Journal* 277, 841-55.
- Dimant, H., Ebrahimi-Fakhari, D. y McLean, P. J. (2012). Molecular chaperones and co-chaperones in Parkinson disease. *Neuroscientist* 18, 589-601.
- Dipple, K. M. y McCabe, E. R. (2000). Modifier genes convert "simple" Mendelian disorders to complex traits. *Molecular Genetics and Metabolism* 71, 43-50.
- Dobson, C. M. (2001). The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 356, 133-45.
- Dobson, C. M. (2004). Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 15, 3-16.
- Dominski, Z. y Kole, R. (1993). Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 8673-7.

- Du, L., Pollard, J. M. y Gatti, R. A. (2007). Correction of prototypic ATM splicing mutations and aberrant ATM function with antisense morpholino oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 6007-12.
- Ebinger, M., Schultze, C. y König, S. (1999). Demographics and diagnosis of pyridoxine-dependent seizures. *Journal of Pediatrics* 134, 795-6.
- Eklund, E. A., Merbouh, N., Ichikawa, M., Nishikawa, A., Clima, J. M., Dorman, J. A., Norberg, T. y Freeze, H. H. (2005). Hydrophobic Man-1-P derivatives correct abnormal glycosylation in Type I congenital disorder of glycosylation fibroblasts. *Glycobiology* 15, 1084-93.
- Ellis, R. J. y Minton, A. P. (2006). Protein aggregation in crowded environments. *Biological Chemistry* 387, 485-97.
- Engel, A. G., Ohno, K. y Sine, S. M. (1999). Congenital myasthenic syndromes: recent advances. *Archives of Neurology* 56, 163-7.
- Erlandsen, H., Pey, A. L., Gamez, A., Perez, B., Desviat, L. R., Aguado, C., Koch, R., Surendran, S., Tying, S., Matalon, R., Scriver, C. R., Ugarte, M., Martinez, A. y Stevens, R. C. (2004). Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 16903-8.
- Evans, C. G., Chang, L. y Gestwicki, J. E. (2010). Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target. *Journal of Medicinal Chemistry* 53, 4585-602.
- Fan, J. Q. (2008). A counterintuitive approach to treat enzyme deficiencies: use of enzyme inhibitors for restoring mutant enzyme activity. *Biological Chemistry* 389, 1-11.
- Fan, J. Q. y Ishii, S. (2007). Active-site-specific chaperone therapy for Fabry disease. Yin and Yang of enzyme inhibitors. *The FEBS Journal* 274, 4962-71.
- Fan, J. Q., Ishii, S., Asano, N. y Suzuki, Y. (1999). Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nature Medicine* 5, 112-5.
- Fargue, S., Rumsby, G. y Danpure, C. J. (2013). Multiple mechanisms of action of pyridoxine in primary hyperoxaluria type 1. *Biochimica et Biophysica Acta* 1832, 1776-83.
- Farinha, C. M. y Amaral, M. D. (2005). Most F508del-CFTR is targeted to degradation at an early folding checkpoint and independently of calnexin. *Molecular and Cellular Biology* 25, 5242-52.
- Ferguson, D. P., Schmitt, E. E. y Lightfoot, J. T. (2013). Vivo-morpholinos induced transient knockdown of physical activity related proteins. *PLoS One* 8, e61472. doi: 10.1371/journal.pone.0061472.
- Fernandez-Cadenas, I., Andreu, A. L., Gamez, J., Gonzalo, R., Martin, M. A., Rubio, J. C. y Arenas, J. (2003). Splicing mosaic of the myophosphorylase gene due to a silent mutation in McArdle disease. *Neurology* 61, 1432-4.

- Flanagan, J. J., Rossi, B., Tang, K., Wu, X., Mascioli, K., Donaudy, F., Tuzzi, M. R., Fontana, F., Cubellis, M. V., Porto, C., Benjamin, E., Lockhart, D. J., Valenzano, K. J., Andria, G., Parenti, G. y Do, H. V. (2009). The pharmacological chaperone 1-deoxynojirimycin increases the activity and lysosomal trafficking of multiple mutant forms of acid alpha-glucosidase. *Human Mutation* 30, 1683-92.
- Flanagan, S. E., Xie, W., Caswell, R., Damhuis, A., Vianey-Saban, C., Akcay, T., Darendeliler, F., Bas, F., Guven, A., Siklar, Z., Ocal, G., Berberoglu, M., Murphy, N., O'Sullivan, M., Green, A., Clayton, P. E., Banerjee, I., Clayton, P. T., Hussain, K., Weedon, M. N. y Ellard, S. (2013). Next-generation sequencing reveals deep intronic cryptic ABCC8 and HADH splicing founder mutations causing hyperinsulinism by pseudoexon activation. *American Journal of Human Genetics* 92, 131-6.
- Flanigan, K. M., Voit, T., Rosales, X. Q., Servais, L., Kraus, J. E., Wardell, C., Morgan, A., Dorricott, S., Nakielny, J., Quarcoo, N., Liefwaard, L., Drury, T., Campion, G. y Wright, P. (2014). Pharmacokinetics and safety of single doses of drisapersen in non-ambulant subjects with Duchenne muscular dystrophy: results of a double-blind randomized clinical trial. *Neuromuscular Disorders* 24, 16-24.
- Foulquier, F., Amyere, M., Jaeken, J., Zeevaert, R., Schollen, E., Race, V., Bammens, R., Morelle, W., Rosnoble, C., Legrand, D., Demaegd, D., Buist, N., Cheillan, D., Guffon, N., Morsomme, P., Annaert, W., Freeze, H. H., Van Schaftingen, E., Vikkula, M. y Matthijs, G. (2012). TMEM165 deficiency causes a congenital disorder of glycosylation. *American Journal of Human Genetics* 91, 15-26.
- Foulquier, F., Ungar, D., Reynders, E., Zeevaert, R., Mills, P., Garcia-Silva, M. T., Briones, P., Winchester, B., Morelle, W., Krieger, M., Annaert, W. y Matthijs, G. (2007). A new inborn error of glycosylation due to a Cog8 deficiency reveals a critical role for the Cog1-Cog8 interaction in COG complex formation. *Human Molecular Genetics* 16, 717-30.
- Foulquier, F., Vasile, E., Schollen, E., Callewaert, N., Raemaekers, T., Quelhas, D., Jaeken, J., Mills, P., Winchester, B., Krieger, M., Annaert, W. y Matthijs, G. (2006). Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1 deficiency reveals a previously uncharacterized congenital disorder of glycosylation type II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 3764-9.
- Freeze, H. H. (2006). Genetic defects in the human glycome. *Nature Reviews Genetics* 7, 537-51.
- Freeze, H. H., Chong, J. X., Bamshad, M. J. y Ng, B. G. (2014). Solving glycosylation disorders: fundamental approaches reveal complicated pathways. *American Journal of Human Genetics* 94, 161-75.
- Freeze, H. H., Eklund, E. A., Ng, B. G. y Patterson, M. C. (2012). Neurology of inherited glycosylation disorders. *The Lancet Neurology* 11, 453-66.
- Freeze, H. H. y Schachter, H. (2009). Genetic Disorders of Glycosylation. En *Essentials of Glycobiology*. (Cold Spring Harbor(NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press), Chapter 42. New York.
- Freeze, H. H. y Sharma, V. (2010). Metabolic manipulation of glycosylation disorders in humans and animal models. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 21, 655-62.
- Freund, M., Hicks, M. J., Konermann, C., Otte, M., Hertel, K. J. y Schaal, H. (2005). Extended base pair complementarity between U1 snRNA and the 5' splice site does not inhibit splicing in higher eukaryotes, but rather increases 5' splice site recognition. *Nucleic Acids Research* 33, 5112-9.

Futerman, A. H. y van Meer, G. (2004). The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 554-65.

Gagnon, K. T., Pendergraft, H. M., Deleavey, G. F., Swayze, E. E., Potier, P., Randolph, J., Roesch, E. B., Chattopadhyaya, J., Damha, M. J., Bennett, C. F., Montallier, C., Lemaitre, M. y Corey, D. R. (2010). Allele-selective inhibition of mutant huntingtin expression with antisense oligonucleotides targeting the expanded CAG repeat. *Biochemistry* 49, 10166-78.

Gallagher, R. C., Van Hove, J. L., Scharer, G., Hyland, K., Plecko, B., Waters, P. J., Mercimek-Mahmutoglu, S., Stockler-Ipsiroglu, S., Salomons, G. S., Rosenberg, E. H., Struys, E. A. y Jakobs, C. (2009). Folinic acid-responsive seizures are identical to pyridoxine-dependent epilepsy. *Annals of Neurology* 65, 550-6.

Gallego-Villar, L., Viecelli, H. M., Perez, B., Harding, C. O., Ugarte, M., Thony, B. y Desviat, L. R. (2014). A sensitive assay system to test antisense oligonucleotides for splice suppression therapy in the mouse liver. *Molecular Therapy-Nucleic Acids* 3, e193. doi: 10.1038/mtna.2014.44.

Gamez, A., Perez, B., Ugarte, M. y Desviat, L. R. (2000). Expression analysis of phenylketonuria mutations. Effect on folding and stability of the phenylalanine hydroxylase protein. *Journal of Biological Chemistry* 275, 29737-42.

Gao, N., Shang, J., Huynh, D., Manthati, V. L., Arias, C., Harding, H. P., Kaufman, R. J., Mohr, I., Ron, D., Falck, J. R. y Lehrman, M. A. (2011). Mannose-6-phosphate regulates destruction of lipid-linked oligosaccharides. *Molecular Biology of the Cell* 22, 2994-3009.

Garrod, S. A. E. (1909). *Inborn Errors of Metabolism: The Croonian Lectures Delivered Before the Royal College of Physicians of London, in June, 1908*: H. Frowde [and] Hodder & Stoughton, Oxford University Press.

Gavrin, L. K., Denny, R. A. y Saiah, E. (2012). Small molecules that target protein misfolding. *Journal of Medicinal Chemistry* 55, 10823-43.

Genin, E., Feingold, J. y Clerget-Darpoux, F. (2008). Identifying modifier genes of monogenic disease: strategies and difficulties. *Human Genetics* 124, 357-68.

Giugliani, R., Waldek, S., Germain, D. P., Nicholls, K., Bichet, D. G., Simosky, J. K., Bragat, A. C., Castelli, J. P., Benjamin, E. R. y Boudes, P. F. (2013). A Phase 2 study of migalastat hydrochloride in females with Fabry disease: selection of population, safety and pharmacodynamic effects. *Molecular Genetics and Metabolism* 109, 86-92.

Giurgea, I., Michel, A., Le Merrer, M., Seta, N. y de Lonlay, P. (2005). Underdiagnosis of mild congenital disorders of glycosylation type Ia. *Pediatric Neurology* 32, 121-3.

Gjetting, T., Petersen, M., Guldberg, P. y Guttler, F. (2001). *In vitro* expression of 34 naturally occurring mutant variants of phenylalanine hydroxylase: correlation with metabolic phenotypes and susceptibility toward protein aggregation. *Molecular Genetics and Metabolism* 72, 132-43.

- Goemans, N. M., Tulinius, M., van den Akker, J. T., Burm, B. E., Ekhart, P. F., Heuvelmans, N., Holling, T., Janson, A. A., Platenburg, G. J., Sipkens, J. A., Sitsen, J. M., Aartsma-Rus, A., van Ommen, G. J., Buyse, G., Darin, N., Verschuuren, J. J., Campion, G. V., de Kimpe, S. J. y van Deutekom, J. C. (2011). Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *New England Journal of Medicine* 364, 1513-22.
- Graziewicz, M. A., Tarrant, T. K., Buckley, B., Roberts, J., Fulton, L., Hansen, H., Orum, H., Kole, R. y Sazani, P. (2008). An endogenous TNF-alpha antagonist induced by splice-switching oligonucleotides reduces inflammation in hepatitis and arthritis mouse models. *Molecular Therapy* 16, 1316-22.
- Gregersen, N. (2006). Protein misfolding disorders: pathogenesis and intervention. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 29, 456-70.
- Gregersen, N., Bross, P., Andrese, B. S., Pedersen, C. B., Corydon, T. J. y Bolund, L. (2001). The role of chaperone-assisted folding and quality control in inborn errors of metabolism: protein folding disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 24, 189-212.
- Gregersen, N., Bross, P., Jorgensen, M. M., Corydon, T. J. y Andresen, B. S. (2000). Defective folding and rapid degradation of mutant proteins is a common disease mechanism in genetic disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 23, 441-7.
- Gregersen, N., Bross, P., Vang, S. y Christensen, J. H. (2006). Protein misfolding and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7, 103-24.
- Gregersen, N. y Olsen, R. K. (2010). Disease mechanisms and protein structures in fatty acid oxidation defects. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 33, 547-53.
- Grunewald, S. (2009). The clinical spectrum of phosphomannomutase 2 deficiency (CDG-Ia). *Biochimica et Biophysica Acta* 1792, 827-34.
- Grunewald, S., Schollen, E., Van Schaftingen, E., Jaeken, J. y Matthijs, G. (2001). High residual activity of PMM2 in patients' fibroblasts: possible pitfall in the diagnosis of CDG-Ia (phosphomannomutase deficiency). *American Journal of Human Genetics* 68, 347-54.
- Guerois, R., Nielsen, J. E. y Serrano, L. (2002). Predicting changes in the stability of proteins and protein complexes: a study of more than 1000 mutations. *Journal of Molecular Biology* 320, 369-87.
- Guillard, M., Dimopoulou, A., Fischer, B., Morava, E., Lefeber, D. J., Kornak, U. y Wevers, R. A. (2009). Vacuolar H⁺-ATPase meets glycosylation in patients with cutis laxa. *Biochimica et Biophysica Acta* 1792, 903-14.
- Gurvich, O. L., Tuohy, T. M., Howard, M. T., Finkel, R. S., Medne, L., Anderson, C. B., Weiss, R. B., Wilton, S. D. y Flanigan, K. M. (2008). DMD pseudoexon mutations: splicing efficiency, phenotype, and potential therapy. *Annals of Neurology* 63, 81-9.
- Gutierrez, M. C. y Delgado-Coello, B. A. (1989). Influence of pipercolic acid on the release and uptake of [3H]GABA from brain slices of mouse cerebral cortex. *Neurochemical Research* 14, 405-8.
- Hauptle, M. A. y Hennet, T. (2009). Congenital disorders of glycosylation: an update on defects affecting the biosynthesis of dolichol-linked oligosaccharides. *Human Mutation* 30, 1628-41.

- Hammarstrom, P., Wiseman, R. L., Powers, E. T. y Kelly, J. W. (2003). Prevention of transthyretin amyloid disease by changing protein misfolding energetics. *Science* 299, 713-6.
- Hansen, J., Palmfeldt, J., Vang, S., Corydon, T. J., Gregersen, N. y Bross, P. (2011). Quantitative proteomics reveals cellular targets of celastrol. *PLoS One* 6, e26634. doi: 10.1371/journal.pone.0026634.
- Hardre, R., Khaled, A., Willemetz, A., Dupre, T., Moore, S., Gravier-Pelletier, C. y Le Merrer, Y. (2007). Mono, di and tri-mannopyranosyl phosphates as mannose-1-phosphate prodrugs for potential CDG-la therapy. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 17, 152-5.
- Havens, M. A., Duelli, D. M. y Hastings, M. L. (2013). Targeting RNA splicing for disease therapy. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 4, 247-66.
- Hennet, T. (2012). Diseases of glycosylation beyond classical congenital disorders of glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820, 1306-17.
- Hoeller, D. y Dikic, I. (2009). Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature* 458, 438-44.
- Hoffman, E. P. (2007). Skipping toward personalized molecular medicine. *New England Journal of Medicine* 357, 2719-22.
- Hu, J., Matsui, M., Gagnon, K. T., Schwartz, J. C., Gabillet, S., Arar, K., Wu, J., Bezprozvanny, I. y Corey, D. R. (2009). Allele-specific silencing of mutant huntingtin and ataxin-3 genes by targeting expanded CAG repeats in mRNAs. *Nature Biotechnology* 27, 478-84.
- Hu, Z., Bonifas, J. M., Beech, J., Bench, G., Shigihara, T., Ogawa, H., Ikeda, S., Mauro, T. y Epstein, E. H., Jr. (2000). Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nature Genetics* 24, 61-5.
- Hunt, A. D., Jr., Stokes, J., Jr., Mc, C. W. y Stroud, H. H. (1954). Pyridoxine dependency: report of a case of intractable convulsions in an infant controlled by pyridoxine. *Pediatrics* 13, 140-5.
- Hutt, D. M. y Balch, W. E. (2013). Expanding proteostasis by membrane trafficking networks. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3, 1-21.
- Inoue, H., Nagata, N., Kurokawa, H. y Yamanaka, S. (2014). iPS cells: a game changer for future medicine. *EMBO Journal* 33, 409-17.
- Jaeken, J. (2003). Komrower Lecture. Congenital disorders of glycosylation (CDG): it's all in it! *Journal of Inherited Metabolic Disease* 26, 99-118.
- Jaeken, J. (2010). Congenital disorders of glycosylation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1214, 190-8.
- Jaeken, J. (2011). Congenital disorders of glycosylation (CDG): it's (nearly) all in it! *Journal of Inherited Metabolic Disease* 34, 853-8.
- Jaeken, J., Hennet, T., Matthijs, G. y Freeze, H. H. (2009). CDG nomenclature: time for a change! *Biochimica et Biophysica Acta* 1792, 825-6.

- Jaeken, J. y Matthijs, G. (2007). Congenital disorders of glycosylation: a rapidly expanding disease family. *The Annual Review of Genomics and Human Genetics* 8, 261-78.
- Jaeken, J., van Eijk, H. G., van der Heul, C., Corbeel, L., Eeckels, R. y Eggermont, E. (1984). Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome. *Clinica Chimica Acta* 144, 245-7.
- Jaeken, J., Vanderschueren-Lodeweyckx, M., Casaer, P., Snoeck, L., Corbeel, L., Eggermont, E. y Eeckels, R. (1980). Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum prolactin, FSH and GH levels, partial TBG-deficiency, increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: a new syndrome?. *Pediatric Research* 14, 179-179.
- Jahn, T. R. y Radford, S. E. (2008). Folding versus aggregation: polypeptide conformations on competing pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 469, 100-17.
- Jansen, L. A., Hevner, R. F., Roden, W. H., Hahn, S. H., Jung, S. y Gospe, S. M., Jr. (2014). Glial localization of antiquitin: implications for pyridoxine-dependent epilepsy. *Annals of Neurology* 75, 22-32.
- Jorge-Finnigan, A., Aguado, C., Sanchez-Alcudia, R., Abia, D., Richard, E., Merinero, B., Gamez, A., Banerjee, R., Desviat, L. R., Ugarte, M. y Perez, B. (2010). Functional and structural analysis of five mutations identified in methylmalonic aciduria cblB type. *Human Mutation* 31, 1033-42.
- Jorge-Finnigan, A., Brasil, S., Underhaug, J., Ruiz-Sala, P., Merinero, B., Banerjee, R., Desviat, L. R., Ugarte, M., Martinez, A. y Perez, B. (2013). Pharmacological chaperones as a potential therapeutic option in methylmalonic aciduria cblB type. *Human Molecular Genetics* 22, 3680-9.
- Kalbfuss, B., Mabon, S. A. y Misteli, T. (2001). Correction of alternative splicing of tau in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17. *Journal of Biological Chemistry* 276, 42986-93.
- Kane, R. C., Bross, P. F., Farrell, A. T. y Pazdur, R. (2003). Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *The Oncologist* 8, 508-13.
- Kannaiyan, R., Shanmugam, M. K. y Sethi, G. (2011). Molecular targets of celastrol derived from Thunder of God Vine: potential role in the treatment of inflammatory disorders and cancer. *Cancer Letters* 303, 9-20.
- Kawashima, D., Asai, M., Katagiri, K., Takeuchi, R. y Ohtsuka, K. (2009). Reinvestigation of the effect of carbenoxolone on the induction of heat shock proteins. *Cell Stress and Chaperones* 14, 535-43.
- Khajavi, M., Inoue, K. y Lupski, J. R. (2006). Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *European Journal of Human Genetics* 14, 1074-81.
- Kilpatrick, K., Novoa, J. A., Hancock, T., Guerriero, C. J., Wipf, P., Brodsky, J. L. y Segatori, L. (2013). Chemical induction of Hsp70 reduces alpha-synuclein aggregation in neuroglioma cells. *ACS Chemical Biology* 8, 1460-8.
- Kim, D., Kim, S. H. y Li, G. C. (1999). Proteasome inhibitors MG132 and lactacystin hyperphosphorylate HSF1 and induce hsp70 and hsp27 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 254, 264-8.

- Kim, H. J., Joo, H. J., Kim, Y. H., Ahn, S., Chang, J., Hwang, K. B., Lee, D. H. y Lee, K. J. (2011). Systemic analysis of heat shock response induced by heat shock and a proteasome inhibitor MG132. *PLoS One* 6, e20252. doi: 10.1371/journal.pone.0020252.
- Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M. y Hartl, F. U. (2013). Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual Review of Biochemistry* 82, 323-55.
- Kinali, M., Arechavala-Gomez, V., Feng, L., Cirak, S., Hunt, D., Adkin, C., Guglieri, M., Ashton, E., Abbs, S., Nihoyannopoulos, P., Garralda, M. E., Rutherford, M., McCulley, C., Popplewell, L., Graham, I. R., Dickson, G., Wood, M. J., Wells, D. J., Wilton, S. D., Kole, R., Straub, V., Bushby, K., Sewry, C., Morgan, J. E. y Muntoni, F. (2009). Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *Lancet Neurology* 8, 918-28.
- Kjaergaard, S., Kristiansson, B., Stibler, H., Freeze, H. H., Schwartz, M., Martinsson, T. y Skovby, F. (1998). Failure of short-term mannose therapy of patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A. *Acta Paediatrica* 87, 884-8.
- Kjaergaard, S., Skovby, F. y Schwartz, M. (1999). Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A: expression and characterisation of wild type and mutant PMM2 in *E. coli*. *European Journal of Human Genetics* 7, 884-8.
- Kobayashi, H., Ogawa, K., Yao, R., Lichtarge, O. y Bouvier, M. (2009). Functional rescue of beta-adrenoceptor dimerization and trafficking by pharmacological chaperones. *Traffic* 10, 1019-33.
- Kole, R., Krainer, A. R. y Altman, S. (2012). RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nature Reviews Drug Discovery* 11, 125-40.
- Koo, T. y Wood, M. J. (2013). Clinical trials using antisense oligonucleotides in duchenne muscular dystrophy. *Human Gene Therapy* 24, 479-88.
- Kornak, U., Reynders, E., Dimopoulou, A., van Reeuwijk, J., Fischer, B., Rajab, A., Budde, B., Nurnberg, P., Foulquier, F., Lefeber, D., Urban, Z., Gruenewald, S., Annaert, W., Brunner, H. G., van Bokhoven, H., Wevers, R., Morava, E., Matthijs, G., Van Maldergem, L. y Mundlos, S. (2008). Impaired glycosylation and cutis laxa caused by mutations in the vesicular H⁺-ATPase subunit ATP6V0A2. *Nature Genetics* 40, 32-4.
- Koulov, A. V., LaPointe, P., Lu, B., Razvi, A., Coppinger, J., Dong, M. Q., Matteson, J., Laister, R., Arrowsmith, C., Yates, J. R., 3rd y Balch, W. E. (2010). Biological and structural basis for Aha1 regulation of Hsp90 ATPase activity in maintaining proteostasis in the human disease cystic fibrosis. *Molecular Biology of the Cell* 21, 871-84.
- Le Bizec, C., Vuillaumier-Barrot, S., Barnier, A., Dupre, T., Durand, G. y Seta, N. (2005). A new insight into PMM2 mutations in the French population. *Human Mutation* 25, 504-5.
- Le Guedard-Mereuze, S., Vache, C., Molinari, N., Vaudaine, J., Claustres, M., Roux, A. F. y Tuffery-Giraud, S. (2009). Sequence contexts that determine the pathogenicity of base substitutions at position +3 of donor splice-sites. *Human Mutation* 30, 1329-39.

- Leandro, J., Simonsen, N., Saraste, J., Leandro, P. y Flatmark, T. (2011). Phenylketonuria as a protein misfolding disease: The mutation pG46S in phenylalanine hydroxylase promotes self-association and fibril formation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1812, 106-20.
- Leandro, P. y Gomes, C. M. (2008). Protein misfolding in conformational disorders: rescue of folding defects and chemical chaperoning. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 8, 901-11.
- Lecca, M. R., Wagner, U., Patrignani, A., Berger, E. G. y Hennet, T. (2005). Genome-wide analysis of the unfolded protein response in fibroblasts from congenital disorders of glycosylation type-I patients. *FASEB Journal* 19, 240-2.
- Lee, P., Treacy, E. P., Crombez, E., Wasserstein, M., Waber, L., Wolff, J., Wendel, U., Dorenbaum, A., Bechuk, J., Christ-Schmidt, H., Seashore, M., Giovannini, M., Burton, B. K. y Morris, A. A. (2008). Safety and efficacy of 22 weeks of treatment with sapropterin dihydrochloride in patients with phenylketonuria. *American Journal of Medical Genetics A* 146A, 2851-9.
- Lee, W. C., Kang, D., Causevic, E., Herdt, A. R., Eckman, E. A. y Eckman, C. B. (2010). Molecular characterization of mutations that cause globoid cell leukodystrophy and pharmacological rescue using small molecule chemical chaperones. *Journal of Neuroscience* 30, 5489-97.
- Lefeber, D. J., Morava, E. y Jaeken, J. (2011). How to find and diagnose a CDG due to defective N-glycosylation. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 34, 849-52.
- Lehrman, M. A. (2006). Stimulation of N-linked glycosylation and lipid-linked oligosaccharide synthesis by stress responses in metazoan cells. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 41, 51-75.
- Leidenheimer, N. J. y Ryder, K. G. (2014). Pharmacological chaperoning: a primer on mechanism and pharmacology. *Pharmacological Research* 83, 10-9.
- Lentz, J. J., Jodelka, F. M., Hinrich, A. J., McCaffrey, K. E., Farris, H. E., Spalitta, M. J., Bazan, N. G., Duelli, D. M., Rigo, F. y Hastings, M. L. (2013). Rescue of hearing and vestibular function by antisense oligonucleotides in a mouse model of human deafness. *Nature Medicine* 19, 345-50.
- Levy, H. L., Milanowski, A., Chakrapani, A., Cleary, M., Lee, P., Trefz, F. K., Whitley, C. B., Feillet, F., Feigenbaum, A. S., Bechuk, J. D., Christ-Schmidt, H. y Dorenbaum, A. (2007). Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study. *Lancet* 370, 504-10.
- Li, L., Zhang, S., Zhang, X., Li, T., Tang, Y., Liu, H., Yang, W. y Le, W. (2013). Autophagy enhancer carbamazepine alleviates memory deficits and cerebral amyloid-beta pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research* 10, 433-41.
- Lim, K. H., Ferraris, L., Filloux, M. E., Raphael, B. J. y Fairbrother, W. G. (2011). Using positional distribution to identify splicing elements and predict pre-mRNA processing defects in human genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 11093-8.
- Lindquist, S. L. y Kelly, J. W. (2011). Chemical and biological approaches for adapting proteostasis to ameliorate protein misfolding and aggregation diseases: progress and prognosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3:a004507. doi: 10.1101/cshperspect.a004507.

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. y Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* 46, 3-26.

Lukacs, G. L. y Verkman, A. S. (2012). CFTR: folding, misfolding and correcting the DeltaF508 conformational defect. *Trends in Molecular Medicine* 18, 81-91.

Maquat, L. E. (2004). Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 89-99.

Marozkina, N. V., Yemen, S., Borowitz, M., Liu, L., Plapp, M., Sun, F., Islam, R., Erdmann-Gilmore, P., Townsend, R. R., Lichti, C. F., Mantri, S., Clapp, P. W., Randell, S. H., Gaston, B. y Zaman, K. (2010). Hsp 70/Hsp 90 organizing protein as a nitrosylation target in cystic fibrosis therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 11393-8.

Marquardt, T., Luhn, K., Srikrishna, G., Freeze, H. H., Harms, E. y Vestweber, D. (1999). Correction of leukocyte adhesion deficiency type II with oral fucose. *Blood* 94, 3976-85.

Martinez, A., Calvo, A. C., Teigen, K. y Pey, A. L. (2008). Rescuing proteins of low kinetic stability by chaperones and natural ligands phenylketonuria, a case study. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 83, 89-134.

Matthijs, G., Rymen, D., Millon, M. B., Souche, E. y Race, V. (2013). Approaches to homozygosity mapping and exome sequencing for the identification of novel types of CDG. *Glycoconjugate Journal* 30, 67-76.

Matthijs, G., Schollen, E., Bjursell, C., Erlandson, A., Freeze, H., Imtiaz, F., Kjaergaard, S., Martinsson, T., Schwartz, M., Seta, N., Vuillaumier-Barrot, S., Westphal, V. y Winchester, B. (2000). Mutations in PMM2 that cause congenital disorders of glycosylation, type Ia (CDG-Ia). *Human Mutation* 16, 386-94.

Matthijs, G., Schollen, E., Pardon, E., Veiga-Da-Cunha, M., Jaeken, J., Cassiman, J. J. y Van Schaftingen, E. (1997a). Mutations in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate-deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome). *Nature Genetics* 16, 88-92.

Matthijs, G., Schollen, E., Pirard, M., Budarf, M. L., Van Schaftingen, E. y Cassiman, J. J. (1997b). PMM (PMM1), the human homologue of SEC53 or yeast phosphomannomutase, is localized on chromosome 22q13. *Genomics* 40, 41-7.

Matthijs, G., Schollen, E., Van Schaftingen, E., Cassiman, J. J. y Jaeken, J. (1998). Lack of homozygotes for the most frequent disease allele in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A. *American Journal of Human Genetics* 62, 542-50.

Mayatepek, E. y Kohlmuller, D. (1998). Mannose supplementation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I and phosphomannomutase deficiency. *European Journal of Pediatrics* 157, 605-6.

- McGowan, M. P., Tardif, J. C., Ceska, R., Burgess, L. J., Soran, H., Gouni-Berthold, I., Wagener, G. y Chasan-Taber, S. (2012). Randomized, placebo-controlled trial of mipomersen in patients with severe hypercholesterolemia receiving maximally tolerated lipid-lowering therapy. *PLoS One* 7, e49006. doi: 10.1371/journal.pone.0049006.
- Mehta, A., Sequiera, G. L., Ramachandra, C. J., Sudibyo, Y., Chung, Y., Sheng, J., Wong, K. Y., Tan, T. H., Wong, P., Liew, R. y Shim, W. (2014). Re-trafficking of hERG reverses long QT syndrome 2 phenotype in human iPSC-derived cardiomyocytes. *Cardiovascular Research* 102, 497-506.
- Mendell, J. R., Rodino-Klapac, L. R., Sahenk, Z., Roush, K., Bird, L., Lowes, L. P., Alfano, L., Gomez, A. M., Lewis, S., Kota, J., Malik, V., Shontz, K., Walker, C. M., Flanigan, K. M., Corridore, M., Kean, J. R., Allen, H. D., Shilling, C., Melia, K. R., Sazani, P., Saoud, J. B. y Kaye, E. M. (2013). Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Annals of Neurology* 74, 637-47.
- Mercimek-Mahmutoglu, S., Cordeiro, D., Cruz, V., Hyland, K., Struys, E. A., Kyriakopoulou, L. y Mamak, E. (2014). Novel therapy for pyridoxine dependent epilepsy due to ALDH7A1 genetic defect: l-arginine supplementation alternative to lysine-restricted diet. *European Journal of Paediatric Neurology* 18, 741-6.
- Milh, M., Pop, A., Kanhai, W., Villeneuve, N., Cano, A., Struys, E. A., Salomons, G. S., Chabrol, B. y Jakobs, C. (2012). Atypical pyridoxine-dependent epilepsy due to a pseudoexon in ALDH7A1. *Molecular Genetics and Metabolism* 105, 684-6.
- Mills, P. B., Struys, E., Jakobs, C., Plecko, B., Baxter, P., Baumgartner, M., Willemsen, M. A., Omran, H., Tacke, U., Uhlenberg, B., Weschke, B. y Clayton, P. T. (2006). Mutations in antiqutin in individuals with pyridoxine-dependent seizures. *Nature Medicine* 12, 307-9.
- Misawa, T., Hayashi, H., Sugiyama, Y. y Hashimoto, Y. (2012). Discovery and structural development of small molecules that enhance transport activity of bile salt export pump mutant associated with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 20, 2940-9.
- Miyazaki, T., Ohura, T., Kobayashi, M., Shigematsu, Y., Yamaguchi, S., Suzuki, Y., Hata, I., Aoki, Y., Yang, X., Minjares, C., Haruta, I., Uto, H., Ito, Y. y Muller, U. (2001). Fatal propionic acidemia in mice lacking propionyl-CoA carboxylase and its rescue by postnatal, liver-specific supplementation via a transgene. *Journal of Biological Chemistry* 276, 35995-9.
- Mowrer, K. R. y Wolfe, M. S. (2008). Promotion of BACE1 mRNA alternative splicing reduces amyloid beta-peptide production. *Journal of Biological Chemistry* 283, 18694-701.
- Mu, T. W., Fowler, D. M. y Kelly, J. W. (2008a). Partial restoration of mutant enzyme homeostasis in three distinct lysosomal storage disease cell lines by altering calcium homeostasis. *PLoS Biology* 6, e26. doi: 10.1371/journal.pbio.0060026.
- Mu, T. W., Ong, D. S., Wang, Y. J., Balch, W. E., Yates, J. R., 3rd, Segatori, L. y Kelly, J. W. (2008b). Chemical and biological approaches synergize to ameliorate protein-folding diseases. *Cell* 134, 769-81.
- Muntau, A. C., Leandro, J., Staudigl, M., Mayer, F. y Gersting, S. W. (2014). Innovative strategies to treat protein misfolding in inborn errors of metabolism: pharmacological chaperones and proteostasis regulators. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 37, 505-23.

- Nagai, Y., Fujikake, N., Popiel, H. A. y Wada, K. (2010). Induction of molecular chaperones as a therapeutic strategy for the polyglutamine diseases. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 11, 188-97.
- Nagayama, S., Jono, H., Suzaki, H., Sakai, K., Tsuruya, E., Yamatsu, I., Isohama, Y., Miyata, T. y Kai, H. (2001). Carbenoxolone, a new inducer of heat shock protein 70. *Life Sciences* 69, 2867-73.
- Nakamura, K., Maeda, Y., Morimoto, K., Katayama, S., Kondo, K. y Nakamura, S. (2013). Functional expression of amyloidogenic human stefins A and B in *Pichia pastoris* using codon optimization. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 60, 283-8.
- Nasevicius, A. y Ekker, S. C. (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nature Genetics* 26, 216-20.
- Niehues, R., Hasilik, M., Alton, G., Korner, C., Schiebe-Sukumar, M., Koch, H. G., Zimmer, K. P., Wu, R., Harms, E., Reiter, K., von Figura, K., Freeze, H. H., Harms, H. K. y Marquardt, T. (1998). Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. *Journal of Clinical Investigation* 101, 1414-20.
- Niesen, F. H., Berglund, H. y Vedadi, M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols* 2, 2212-21.
- Nilsen, T. W. y Graveley, B. R. (2010). Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463, 457-63.
- Noorwez, S. M., Ostrov, D. A., McDowell, J. H., Krebs, M. P. y Kaushal, S. (2008). A high-throughput screening method for small-molecule pharmacologic chaperones of misfolded rhodopsin. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 49, 3224-30.
- O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V. L., Woods, C. G., Jeggo, P. A. y Goodship, J. A. (2003). A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nature Genetics* 33, 497-501.
- O'Reilly, L. P., Andresen, B. S. y Engel, P. C. (2005). Two novel variants of human medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD). K364R, a folding mutation, and R256T, a catalytic-site mutation resulting in a well-folded but totally inactive protein. *The FEBS Journal* 272, 4549-57.
- Old, S. E. y De Vivo, D. C. (1989). Pyruvate dehydrogenase complex deficiency: biochemical and immunoblot analysis of cultured skin fibroblasts. *Annals of Neurology* 26, 746-51.
- Ong, D. S. y Kelly, J. W. (2011). Chemical and/or biological therapeutic strategies to ameliorate protein misfolding diseases. *Current Opinion in Cell Biology* 23, 231-8.
- Ong, D. S., Mu, T. W., Palmer, A. E. y Kelly, J. W. (2010). Endoplasmic reticulum Ca²⁺ increases enhance mutant glucocerebrosidase proteostasis. *Nature Chemical Biology* 6, 424-32.
- Orlowski, R. Z. y Kuhn, D. J. (2008). Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. *Clinical Cancer Research* 14, 1649-57.

- Osorio, F. G., Navarro, C. L., Cadinanos, J., Lopez-Mejia, I. C., Quiros, P. M., Bartoli, C., Rivera, J., Tazi, J., Guzman, G., Varela, I., Depetris, D., de Carlos, F., Cobo, J., Andres, V., De Sandre-Giovannoli, A., Freije, J. M., Levy, N. y Lopez-Otin, C. (2011). Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging. *Science Translational Medicine* 3, 106ra107.
- Owen, L. A., Uehara, H., Cahoon, J., Huang, W., Simonis, J. y Ambati, B. K. (2012). Morpholino-mediated increase in soluble Flt-1 expression results in decreased ocular and tumor neovascularization. *PLoS One* 7, e33576. doi: 10.1371/journal.pone.0033576.
- Ozsolak, F. y Milos, P. M. (2011). RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature Reviews Genetics* 12, 87-98.
- Pagani, F., Raponi, M. y Baralle, F. E. (2005). Synonymous mutations in CFTR exon 12 affect splicing and are not neutral in evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 6368-72.
- Pampols, T. (2010). Inherited metabolic rare disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 686, 397-431.
- Panicker, L. M., Miller, D., Awad, O., Bose, V., Lun, Y., Park, T. S., Zambidis, E. T., Sgambato, J. A. y Feldman, R. A. (2014). Gaucher iPSC-derived macrophages produce elevated levels of inflammatory mediators and serve as a new platform for therapeutic development. *Stem Cells* 32, 2338-49.
- Panneerselvam, K. y Freeze, H. H. (1996). Mannose corrects altered N-glycosylation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome fibroblasts. *Journal of Clinical Investigation* 97, 1478-87.
- Parenti, G., Zuppaldi, A., Gabriela Pittis, M., Rosaria Tuzzi, M., Annunziata, I., Meroni, G., Porto, C., Donaudy, F., Rossi, B., Rossi, M., Filocamo, M., Donati, A., Bembi, B., Ballabio, A. y Andria, G. (2007). Pharmacological enhancement of mutated alpha-glucosidase activity in fibroblasts from patients with Pompe disease. *Molecular Therapy* 15, 508-14.
- Parhofer, K. G. (2012). Mipomersen: evidence-based review of its potential in the treatment of homozygous and severe heterozygous familial hypercholesterolemia. *Core Evidence* 7, 29-38.
- Parra, M. K., Gee, S., Mohandas, N. y Conboy, J. G. (2011). Efficient *in vivo* manipulation of alternative pre-mRNA splicing events using antisense morpholinos in mice. *Journal of Biological Chemistry* 286, 6033-9.
- Parthiban, V., Gromiha, M. M. y Schomburg, D. (2006). CUPSAT: prediction of protein stability upon point mutations. *Nucleic Acids Research* 34, W239-42.
- Patnaik, S., Zheng, W., Choi, J. H., Motabar, O., Southall, N., Westbroek, W., Lea, W. A., Velayati, A., Goldin, E., Sidransky, E., Leister, W. y Marugan, J. J. (2012). Discovery, structure-activity relationship, and biological evaluation of noninhibitory small molecule chaperones of glucocerebrosidase. *Journal of Medicinal Chemistry* 55, 5734-48.
- Pedersen, C. B., Bross, P., Winter, V. S., Corydon, T. J., Bolund, L., Bartlett, K., Vockley, J. y Gregersen, N. (2003). Misfolding, degradation, and aggregation of variant proteins. The molecular pathogenesis of short chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency. *Journal of Biological Chemistry* 278, 47449-58.

- Perez-Duenas, B., Garcia-Cazorla, A., Pineda, M., Poo, P., Campistol, J., Cusi, V., Schollen, E., Matthijs, G., Grunewald, S., Briones, P., Perez-Cerda, C., Artuch, R. y Vilaseca, M. A. (2009). Long-term evolution of eight Spanish patients with CDG type Ia: typical and atypical manifestations. *European Journal of Paediatric Neurology* 13, 444-51.
- Perez, B., Briones, P., Quelhas, D., Artuch, R., Vega, A. I., Quintana, E., Gort, L., Ecay, M. J., Matthijs, G., Ugarte, M. y Perez-Cerda, C. (2011). The molecular landscape of phosphomannose mutase deficiency in iberian peninsula: identification of 15 population-specific mutations. *Journal of Inherited Metabolic Disease Reports* 1, 117-23.
- Perez, B., Gutierrez-Solana, L. G., Verdu, A., Merinero, B., Yuste-Checa, P., Ruiz-Sala, P., Calvo, R., Jalan, A., Marin, L. L., Campos, O., Ruiz, M. A., San Miguel, M., Vazquez, M., Castro, M., Ferrer, I., Navarrete, R., Desviat, L. R., Lapunzina, P., Ugarte, M. y Perez-Cerda, C. (2013). Clinical, biochemical, and molecular studies in pyridoxine-dependent epilepsy. Antisense therapy as possible new therapeutic option. *Epilepsia* 54, 239-48.
- Perez, B., Rincon, A., Jorge-Finnigan, A., Richard, E., Merinero, B., Ugarte, M. y Desviat, L. R. (2009). Pseudoxon exclusion by antisense therapy in methylmalonic aciduria (MMAuria). *Human Mutation* 30, 1676-82.
- Perez, B., Rodriguez-Pascau, L., Vilageliu, L., Grinberg, D., Ugarte, M. y Desviat, L. R. (2010). Present and future of antisense therapy for splicing modulation in inherited metabolic disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 33, 397-403.
- Perez, B., Vilageliu, L., Grinberg, D. y Desviat, L. R. (2014). Antisense mediated splicing modulation for inherited metabolic diseases: challenges for delivery. *Nucleic Acid Therapeutics* 24, 48-56.
- Pey, A. L., Desviat, L. R., Gamez, A., Ugarte, M. y Perez, B. (2003). Phenylketonuria: genotype-phenotype correlations based on expression analysis of structural and functional mutations in PAH. *Human Mutation* 21, 370-8.
- Pey, A. L., Stricher, F., Serrano, L. y Martinez, A. (2007). Predicted effects of missense mutations on native-state stability account for phenotypic outcome in phenylketonuria, a paradigm of misfolding diseases. *American Journal of Human Genetics* 81, 1006-24.
- Pey, A. L., Ying, M., Cremades, N., Velazquez-Campoy, A., Scherer, T., Thony, B., Sancho, J. y Martinez, A. (2008). Identification of pharmacological chaperones as potential therapeutic agents to treat phenylketonuria. *Journal of Clinical Investigation* 118, 2858-67.
- Pinder, R. M., Brogden, R. N., Sawyer, P. R., Speight, T. M., Spencer, R. y Avery, G. S. (1976). Carbenoxolone: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in peptic ulcer disease. *Drugs* 11, 245-307.
- Pirard, M., Achouri, Y., Collet, J. F., Schollen, E., Matthijs, G. y Van Schaftingen, E. (1999a). Kinetic properties and tissular distribution of mammalian phosphomannomutase isozymes. *Biochemical Journal* 339 (Pt 1), 201-7.
- Pirard, M., Matthijs, G., Heykants, L., Schollen, E., Grunewald, S., Jaeken, J. y van Schaftingen, E. (1999b). Effect of mutations found in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type IA on the activity of phosphomannomutase 2. *FEBS Letters* 452, 319-22.

- Porto, C., Ferrara, M. C., Meli, M., Acampora, E., Avolio, V., Rosa, M., Cobucci-Ponzano, B., Colombo, G., Moracci, M., Andria, G. y Parenti, G. (2012). Pharmacological enhancement of alpha-glucosidase by the allosteric chaperone N-acetylcysteine. *Molecular Therapy* 20, 2201-11.
- Powers, E. T., Morimoto, R. I., Dillin, A., Kelly, J. W. y Balch, W. E. (2009). Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annual Review of Biochemistry* 78, 959-91.
- 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. y Lazaro, C. (2009). Antisense therapeutics for neurofibromatosis type 1 caused by deep intronic mutations. *Human Mutation* 30, 454-62.
- Quelhas, D., Quental, R., Vilarinho, L., Amorim, A. y Azevedo, L. (2007). Congenital disorder of glycosylation type Ia: searching for the origin of common mutations in PMM2. *Annals of Human Genetics* 71, 348-53.
- Rawat, M., Singh, D. y Saraf, S. (2008). Lipid carriers: a versatile delivery vehicle for proteins and peptides. *Yakugaku Zasshi. Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 128, 269-80.
- Regis, S., Corsolini, F., Grossi, S., Tappino, B., Cooper, D. N. y Filocamo, M. (2013). Restoration of the normal splicing pattern of the PLP1 gene by means of an antisense oligonucleotide directed against an exonic mutation. *PLoS One* 8, e73633. doi: 10.1371/journal.pone.0073633.
- Reinhardt, T. A., Lippolis, J. D. y Sacco, R. E. (2014). The Ca(2+)/H(+) antiporter TMEM165 expression, localization in the developing, lactating and involuting mammary gland parallels the secretory pathway Ca(2+) ATPase (SPCA1). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 445, 417-21.
- Ren, H. Y., Grove, D. E., De La Rosa, O., Houck, S. A., Sopha, P., Van Goor, F., Hoffman, B. J. y Cyr, D. M. (2013). VX-809 corrects folding defects in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein through action on membrane-spanning domain 1. *Molecular Biology of the Cell* 24, 3016-24.
- Reynders, E., Foulquier, F., Annaert, W. y Matthijs, G. (2011). How Golgi glycosylation meets and needs trafficking: the case of the COG complex. *Glycobiology* 21, 853-63.
- Reynders, E., Foulquier, F., Leao Teles, E., Quelhas, D., Morelle, W., Rabouille, C., Annaert, W. y Matthijs, G. (2009). Golgi function and dysfunction in the first COG4-deficient CDG type II patient. *Human Molecular Genetics* 18, 3244-56.
- Rincon, A., Aguado, C., Desviat, L. R., Sanchez-Alcudia, R., Ugarte, M. y Perez, B. (2007). Propionic and methylmalonic acidemia: antisense therapeutics for intronic variations causing aberrantly spliced messenger RNA. *American Journal of Human Genetics* 81, 1262-70.
- Roberts, J., Palma, E., Sazani, P., Orum, H., Cho, M. y Kole, R. (2006). Efficient and persistent splice switching by systemically delivered LNA oligonucleotides in mice. *Molecular Therapy* 14, 471-5.
- Robinton, D. A. y Daley, G. Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 481, 295-305.
- Roca, X., Sachidanandam, R. y Krainer, A. R. (2005). Determinants of the inherent strength of human 5' splice sites. *RNA* 11, 683-98.

Rodriguez-Pascau, L., Coll, M. J., Vilageliu, L. y Grinberg, D. (2009). Antisense oligonucleotide treatment for a pseudoexon-generating mutation in the NPC1 gene causing Niemann-Pick type C disease. *Human Mutation* 30, E993-E1001.

Roehr, B. (1998). Fomivirsen approved for CMV retinitis. *Journal of the International Association of Physicians in AIDS Care* 4, 14-6.

Rosnoblet, C., Legrand, D., Demaegd, D., Hacine-Gherbi, H., de Bettignies, G., Bammens, R., Borrego, C., Duvet, S., Morsomme, P., Matthijs, G. y Foulquier, F. (2013). Impact of disease-causing mutations on TMEM165 subcellular localization, a recently identified protein involved in CDG-II. *Human Molecular Genetics* 22, 2914-28.

Rowe, S. M. y Verkman, A. S. (2013). Cystic fibrosis transmembrane regulator correctors and potentiators. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3:a009761. doi: 10.1101/cshperspect.a009761.

Rutschow, S., Thiem, J., Kranz, C. y Marquardt, T. (2002). Membrane-permeant derivatives of mannose-1-phosphate. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 10, 4043-9.

Saleh, A. F., Arzumanov, A. A. y Gait, M. J. (2012). Overview of alternative oligonucleotide chemistries for exon skipping. *Methods in Molecular Biology* 867, 365-78.

Salminen, A., Lehtonen, M., Paimela, T. y Kaarniranta, K. (2010). Celastrol: Molecular targets of Thunder God Vine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 394, 439-42.

Salomons, G. S., Bok, L. A., Struys, E. A., Pope, L. L., Darmin, P. S., Mills, P. B., Clayton, P. T., Willemsen, M. A. y Jakobs, C. (2007). An intriguing "silent" mutation and a founder effect in antiquitin (ALDH7A1). *Annals of Neurology* 62, 414-8.

Sanderson, S., Green, A., Preece, M. A. y Burton, H. (2006). The incidence of inherited metabolic disorders in the West Midlands, UK. *Archives of Disease in Childhood* 91, 896-9.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-7.

Santoro, M., Modoni, A., Sabatelli, M., Madia, F., Piemonte, F., Tozzi, G., Ricci, E., Tonali, P. A. y Silvestri, G. (2007). Chronic GM2 gangliosidosis type Sandhoff associated with a novel missense HEXB gene mutation causing a double pathogenic effect. *Molecular Genetics and Metabolism* 91, 111-4.

Santos-Sierra, S., Kirchmair, J., Perna, A. M., Reiss, D., Kemter, K., Roschinger, W., Glossmann, H., Gersting, S. W., Muntau, A. C., Wolber, G. y Lagler, F. B. (2012). Novel pharmacological chaperones that correct phenylketonuria in mice. *Human Molecular Genetics* 21, 1877-87.

Sasaki-Haraguchi, N., Shimada, M. K., Taniguchi, I., Ohno, M. y Mayeda, A. (2012). Mechanistic insights into human pre-mRNA splicing of human ultra-short introns: potential unusual mechanism identifies G-rich introns. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 423, 289-94.

Saudubray, J. M., Sedel, F. y Walter, J. H. (2006). Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: an introduction. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 29, 261-74.

- Sauna, Z. E. y Kimchi-Sarfaty, C. (2011). Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nature Reviews Genetics* 12, 683-91.
- Sazani, P., Gemignani, F., Kang, S. H., Maier, M. A., Manoharan, M., Persmark, M., Bortner, D. y Kole, R. (2002). Systemically delivered antisense oligomers upregulate gene expression in mouse tissues. *Nature Biotechnology* 20, 1228-33.
- Scott, K., Gadomski, T., Kozicz, T. y Morava, E. (2014). Congenital disorders of glycosylation: new defects and still counting. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 37, 609-17.
- Schmid, F., Hiller, T., Korner, G., Glaus, E., Berger, W. y Neidhardt, J. (2013). A gene therapeutic approach to correct splice defects with modified U1 and U6 snRNPs. *Human Gene Therapy* 24, 97-104.
- Schmitz, M., Alfalah, M., Aerts, J. M., Naim, H. Y. y Zimmer, K. P. (2005). Impaired trafficking of mutants of lysosomal glucocerebrosidase in Gaucher's disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 37, 2310-20.
- Schneider, A., Thiel, C., Rindermann, J., DeRossi, C., Popovici, D., Hoffmann, G. F., Grone, H. J. y Korner, C. (2012). Successful prenatal mannose treatment for congenital disorder of glycosylation-Ia in mice. *Nature Medicine* 18, 71-3.
- Schollen, E., Kjaergaard, S., Legius, E., Schwartz, M. y Matthijs, G. (2000). Lack of Hardy-Weinberg equilibrium for the most prevalent PMM2 mutation in CDG-Ia (congenital disorders of glycosylation type Ia). *European Journal of Human Genetics* 8, 367-71.
- Schollen, E., Pardon, E., Heykants, L., Renard, J., Doggett, N. A., Callen, D. F., Cassiman, J. J. y Matthijs, G. (1998). Comparative analysis of the phosphomannomutase genes PMM1, PMM2 and PMM2psi: the sequence variation in the processed pseudogene is a reflection of the mutations found in the functional gene. *Human Molecular Genetics* 7, 157-64.
- Schueler, U. H., Kolter, T., Kaneski, C. R., Zirzow, G. C., Sandhoff, K. y Brady, R. O. (2004). Correlation between enzyme activity and substrate storage in a cell culture model system for Gaucher disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 27, 649-58.
- Schymkowitz, J., Borg, J., Stricher, F., Nys, R., Rousseau, F. y Serrano, L. (2005a). The FoldX web server: an online force field. *Nucleic Acids Research* 33, W382-8.
- Schymkowitz, J. W., Rousseau, F., Martins, I. C., Ferkinghoff-Borg, J., Stricher, F. y Serrano, L. (2005b). Prediction of water and metal binding sites and their affinities by using the Fold-X force field. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 10147-52.
- Senderek, J., Muller, J. S., Dusl, M., Strom, T. M., Guergueltcheva, V., Diepolder, I., Laval, S. H., Maxwell, S., Cossins, J., Krause, S., Muelas, N., Vilchez, J. J., Colomer, J., Mallebrera, C. J., Nascimento, A., Nafissi, S., Kariminejad, A., Nilipour, Y., Bozorgmehr, B., Najmabadi, H., Rodolico, C., Sieb, J. P., Steinlein, O. K., Schlotter, B., Schoser, B., Kirschner, J., Herrmann, R., Voit, T., Oldfors, A., Lindbergh, C., Urtizberea, A., von der Hagen, M., Hubner, A., Palace, J., Bushby, K., Straub, V., Beeson, D., Abicht, A. y Lochmuller, H. (2011). Hexosamine biosynthetic pathway mutations cause neuromuscular transmission defect. *American Journal of Human Genetics* 88, 162-72.

- Seo, J., Howell, M. D., Singh, N. N. y Singh, R. N. (2013). Spinal muscular atrophy: an update on therapeutic progress. *Biochimica et Biophysica Acta* 1832, 2180-90.
- Shang, J., Gao, N., Kaufman, R. J., Ron, D., Harding, H. P. y Lehrman, M. A. (2007). Translation attenuation by PERK balances ER glycoprotein synthesis with lipid-linked oligosaccharide flux. *Journal of Cell Biology* 176, 605-16.
- Shang, J., Korner, C., Freeze, H. y Lehrman, M. A. (2002). Extension of lipid-linked oligosaccharides is a high-priority aspect of the unfolded protein response: endoplasmic reticulum stress in Type I congenital disorder of glycosylation fibroblasts. *Glycobiology* 12, 307-17.
- Shang, L., Hua, H., Foo, K., Martinez, H., Watanabe, K., Zimmer, M., Kahler, D. J., Freeby, M., Chung, W., LeDuc, C., Goland, R., Leibel, R. L. y Egli, D. (2014). beta-cell dysfunction due to increased ER stress in a stem cell model of Wolfram syndrome. *Diabetes* 63, 923-33.
- Sharma, V., Ichikawa, M., He, P., Scott, D. A., Bravo, Y., Dahl, R., Ng, B. G., Cosford, N. D. y Freeze, H. H. (2011). Phosphomannose isomerase inhibitors improve N-glycosylation in selected phosphomannomutase-deficient fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 286, 39431-8.
- Sharma, V., Nayak, J., DeRossi, C., Charbono, A., Ichikawa, M., Ng, B. G., Grajales-Esquivel, E., Srivastava, A., Wang, L., He, P., Scott, D. A., Russell, J., Contreras, E., Guess, C. M., Krajewski, S., Del Rio-Tsonis, K. y Freeze, H. H. (2014). Mannose supplements induce embryonic lethality and blindness in phosphomannose isomerase hypomorphic mice. *FASEB Journal* 28, 1854-69.
- Silvaggi, N. R., Zhang, C., Lu, Z., Dai, J., Dunaway-Mariano, D. y Allen, K. N. (2006). The X-ray crystal structures of human alpha-phosphomannomutase 1 reveal the structural basis of congenital disorder of glycosylation type 1a. *Journal of Biological Chemistry* 281, 14918-26.
- Singh, R. K. y Cooper, T. A. (2012). Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. *Trends in Molecular Medicine* 18, 472-82.
- Sloan, L. A., Fillmore, M. C. y Churcher, I. (2009). Small-molecule modulation of cellular chaperones to treat protein misfolding disorders. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 12, 666-81.
- Smith, D. B. (2000). Generating fusions to glutathione S-transferase for protein studies. *Methods in Enzymology* 326, 254-70.
- Sols, A., Cadenas, E. y Alvarado, F. (1960). Enzymatic basis of mannose toxicity in honey bees. *Science* 131, 297-8.
- Song, W., Wang, F., Savini, M., Ake, A., di Ronza, A., Sardiello, M. y Segatori, L. (2013). TFEB regulates lysosomal proteostasis. *Human Molecular Genetics* 22, 1994-2009.
- Southwell, A. L., Skotte, N. H., Bennett, C. F. y Hayden, M. R. (2012). Antisense oligonucleotide therapeutics for inherited neurodegenerative diseases. *Trends in Molecular Medicine* 18, 634-43.
- Spitali, P. y Aartsma-Rus, A. (2012). Splice modulating therapies for human disease. *Cell* 148, 1085-8.

- Stenson, P. D., Mort, M., Ball, E. V., Shaw, K., Phillips, A. y Cooper, D. N. (2014). The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Human Genetics* 133, 1-9.
- Sterne-Weiler, T., Howard, J., Mort, M., Cooper, D. N. y Sanford, J. R. (2011). Loss of exon identity is a common mechanism of human inherited disease. *Genome Research* 21, 1563-71.
- SStockler, S., Plecko, B., Gospe, S. M., Jr., Coulter-Mackie, M., Connolly, M., van Karnebeek, C., Mercimek-Mahmutoglu, S., Hartmann, H., Scharer, G., Struijs, E., Tein, I., Jakobs, C., Clayton, P. y Van Hove, J. L. (2011). Pyridoxine dependent epilepsy and antiquitin deficiency: clinical and molecular characteristics and recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Molecular Genetics and Metabolism* 104, 48-60.
- Stojkovic, T., Vissing, J., Petit, F., Piraud, M., Orngreen, M. C., Andersen, G., Claeys, K. G., Wary, C., Hogrel, J. Y. y Laforet, P. (2009). Muscle glycogenosis due to phosphoglucomutase 1 deficiency. *New England Journal of Medicine* 361, 425-7.
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification* 41, 207-34.
- Sturla, L., Puglielli, L., Tonetti, M., Berninsone, P., Hirschberg, C. B., De Flora, A. y Etzioni, A. (2001). Impairment of the Golgi GDP-L-fucose transport and unresponsiveness to fucose replacement therapy in LAD II patients. *Pediatric Research* 49, 537-42.
- Sun, L., Zhao, Y., Zhou, K., Freeze, H. H., Zhang, Y. W. y Xu, H. (2013). Insufficient ER-stress response causes selective mouse cerebellar granule cell degeneration resembling that seen in congenital disorders of glycosylation. *Molecular Brain* 6, 52.
- Sun, Y., Liou, B., Xu, Y. H., Quinn, B., Zhang, W., Hamler, R., Setchell, K. D. y Grabowski, G. A. (2012). *Ex vivo* and *in vivo* effects of isofagomine on acid beta-glucosidase variants and substrate levels in Gaucher disease. *Journal of Biological Chemistry* 287, 4275-87.
- Supek, F., Minana, B., Valcarcel, J., Gabaldon, T. y Lehner, B. (2014). Synonymous mutations frequently act as driver mutations in human cancers. *Cell* 156, 1324-35.
- Suzuki, Y. (2014). Emerging novel concept of chaperone therapies for protein misfolding diseases. *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B Physical and Biological Sciences* 90, 145-62.
- Svasti, S., Suwanmanee, T., Fucharoen, S., Moulton, H. M., Nelson, M. H., Maeda, N., Smithies, O. y Kole, R. (2009). RNA repair restores hemoglobin expression in IVS2-654 thalassemic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 1205-10.
- Taniguchi-Ikeda, M., Kobayashi, K., Kanagawa, M., Yu, C. C., Mori, K., Oda, T., Kuga, A., Kurahashi, H., Akman, H. O., DiMauro, S., Kaji, R., Yokota, T., Takeda, S. y Toda, T. (2011). Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature* 478, 127-31.

Tegtmeyer, L. C., Rust, S., van Scherpenzeel, M., Ng, B. G., Losfeld, M. E., Timal, S., Raymond, K., He, P., Ichikawa, M., Veltman, J., Huijben, K., Shin, Y. S., Sharma, V., Adamowicz, M., Lammens, M., Reunert, J., Witten, A., Schrapers, E., Matthijs, G., Jaeken, J., Rymen, D., Stojkovic, T., Laforet, P., Petit, F., Aumaitre, O., Czarnowska, E., Piraud, M., Podskarbi, T., Stanley, C. A., Matalon, R., Burda, P., Seyyedi, S., Debus, V., Socha, P., Sykut-Cegielska, J., van Spronsen, F., de Meirleir, L., Vajro, P., DeClue, T., Ficicioglu, C., Wada, Y., Wevers, R. A., Vanderschaeghe, D., Callewaert, N., Fingerhut, R., van Schaftingen, E., Freeze, H. H., Morava, E., Lefeber, D. J. y Marquardt, T. (2014). Multiple phenotypes in phosphoglucomutase 1 deficiency. *New England Journal of Medicine* 370, 533-42.

Thakur, P. y Nehru, B. (2014). Long-term heat shock proteins (HSPs) induction by carbenoxolone improves hallmark features of Parkinson's disease in a rotenone-based model. *Neuropharmacology* 79, 190-200.

Thiel, C., Lubke, T., Matthijs, G., von Figura, K. y Korner, C. (2006). Targeted disruption of the mouse phosphomannomutase 2 gene causes early embryonic lethality. *Molecular and Cellular Biology* 26, 5615-20.

Tiscornia, G., Vivas, E. L., Matalonga, L., Berniakovich, I., Barragan Monasterio, M., Eguizabal, C., Gort, L., Gonzalez, F., Ortiz Mellet, C., Garcia Fernandez, J. M., Ribes, A., Veiga, A. y Izpisua Belmonte, J. C. (2013). Neuronopathic Gaucher's disease: induced pluripotent stem cells for disease modelling and testing chaperone activity of small compounds. *Human Molecular Genetics* 22, 633-45.

Trefz, F. K., Burton, B. K., Longo, N., Casanova, M. M., Gruskin, D. J., Dorenbaum, A., Kakkis, E. D., Crombez, E. A., Grange, D. K., Harmatz, P., Lipson, M. H., Milanowski, A., Randolph, L. M., Vockley, J., Whitley, C. B., Wolff, J. A., Bebchuk, J., Christ-Schmidt, H. y Hennermann, J. B. (2009). Efficacy of sapropterin dihydrochloride in increasing phenylalanine tolerance in children with phenylketonuria: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Pediatrics* 154, 700-7.

Tropak, M. B., Blanchard, J. E., Withers, S. G., Brown, E. D. y Mahuran, D. (2007). High-throughput screening for human lysosomal beta-N-Acetyl hexosaminidase inhibitors acting as pharmacological chaperones. *Chemistry and Biology* 14, 153-64.

Tropak, M. B. y Mahuran, D. (2007). Lending a helping hand, screening chemical libraries for compounds that enhance beta-hexosaminidase A activity in GM2 gangliosidosis cells. *The FEBS Journal* 274, 4951-61.

Tsaytler, P., Harding, H. P., Ron, D. y Bertolotti, A. (2011). Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science* 332, 91-4.

Tuntland, T., Ethell, B., Kosaka, T., Blasco, F., Zang, R. X., Jain, M., Gould, T. y Hoffmaster, K. (2014). Implementation of pharmacokinetic and pharmacodynamic strategies in early research phases of drug discovery and development at Novartis Institute of Biomedical Research. *Frontiers in Pharmacology* 5, 174.

Twombly, R. (2003). First proteasome inhibitor approved for multiple myeloma. *Journal of the National Cancer Institute* 95, 845.

Uchikawa, H., Fujii, K., Kohno, Y., Katsumata, N., Nagao, K., Yamada, M. y Miyashita, T. (2007). U7 snRNA-mediated correction of aberrant splicing caused by activation of cryptic splice sites. *Journal of Human Genetics* 52, 891-7.

- Underhaug, J., Aubi, O. y Martinez, A. (2012). Phenylalanine hydroxylase misfolding and pharmacological chaperones. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 12, 2534-45.
- Vabulas, R. M., Raychaudhuri, S., Hayer-Hartl, M. y Hartl, F. U. (2010). Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2:a004390. doi: 10.1101/cshperspect.a004390.
- van Karnebeek, C. D., Hartmann, H., Jaggamantri, S., Bok, L. A., Cheng, B., Connolly, M., Coughlin, C. R., 2nd, Das, A. M., Gospe, S. M., Jr., Jakobs, C., van der Lee, J. H., Mercimek-Mahmutoglu, S., Meyer, U., Struys, E., Sinclair, G., Van Hove, J., Collet, J. P., Plecko, B. R. y Stockler, S. (2012). Lysine restricted diet for pyridoxine-dependent epilepsy: first evidence and future trials. *Molecular Genetics and Metabolism* 107, 335-44.
- Van Schaftingen, E. y Jaeken, J. (1995). Phosphomannomutase deficiency is a cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *FEBS Letters* 377, 318-20.
- Vasiliou, V. y Nebert, D. W. (2005). Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Human Genomics* 2, 138-43.
- Vega, A. I., Perez-Cerda, C., Abia, D., Gamez, A., Briones, P., Artuch, R., Desviat, L. R., Ugarte, M. y Perez, B. (2011). Expression analysis revealing destabilizing mutations in phosphomannomutase 2 deficiency (PMM2-CDG) : Expression analysis of PMM2-CDG mutations. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 34, 929-39.
- Vega, A. I., Perez-Cerda, C., Desviat, L. R., Matthijs, G., Ugarte, M. y Perez, B. (2009). Functional analysis of three splicing mutations identified in the PMM2 gene: toward a new therapy for congenital disorder of glycosylation type Ia. *Human Mutation* 30, 795-803.
- Veiga-da-Cunha, M., Vleugels, W., Maliekal, P., Matthijs, G. y Van Schaftingen, E. (2008). Mammalian phosphomannomutase PMM1 is the brain IMP-sensitive glucose-1,6-bisphosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 283, 33988-93.
- Visser, M. E., Wagener, G., Baker, B. F., Geary, R. S., Donovan, J. M., Beuers, U. H., Nederveen, A. J., Verheij, J., Trip, M. D., Basart, D. C., Kastelein, J. J. y Stroes, E. S. (2012). Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, lowers low-density lipoprotein cholesterol in high-risk statin-intolerant patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *European Heart Journal* 33, 1142-9.
- Vockley, J. (2008). Metabolism as a complex genetic trait, a systems biology approach: implications for inborn errors of metabolism and clinical diseases. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 31, 619-29.
- Vogt, G., Chappier, A., Yang, K., Chuzhanova, N., Feinberg, J., Fieschi, C., Boisson-Dupuis, S., Alcais, A., Filipe-Santos, O., Bustamante, J., de Beaucoudrey, L., Al-Mohsen, I., Al-Hajjar, S., Al-Ghoni, A., Adimi, P., Mirsaeidi, M., Khalilzadeh, S., Rosenzweig, S., de la Calle Martin, O., Bauer, T. R., Puck, J. M., Ochs, H. D., Furthner, D., Engelhorn, C., Belohradsky, B., Mansouri, D., Holland, S. M., Schreiber, R. D., Abel, L., Cooper, D. N., Soudais, C. y Casanova, J. L. (2005). Gains of glycosylation comprise an unexpectedly large group of pathogenic mutations. *Nature Genetics* 37, 692-700.

- Voit, T., Topaloglu, H., Straub, V., Muntoni, F., Deconinck, N., Campion, G., De Kimpe, S. J., Eagle, M., Guglieri, M., Hood, S., Liefwaard, L., Loubakos, A., Morgan, A., Nakielny, J., Quarcoo, N., Ricotti, V., Rolfe, K., Servais, L., Wardell, C., Wilson, R., Wright, P. y Kraus, J. E. (2014). Safety and efficacy of drisapersen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy (DEMAND II): an exploratory, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Neurol* 13, 987-96.
- Vuillaumier-Barrot, S., Hetet, G., Barnier, A., Dupre, T., Cuer, M., de Lonlay, P., Cormier-Daire, V., Durand, G., Grandchamp, B. y Seta, N. (2000). Identification of four novel PMM2 mutations in congenital disorders of glycosylation (CDG) Ia French patients. *Journal of Medical Genetics* 37, 579-80.
- Wahl, M. C., Will, C. L. y Luhrmann, R. (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136, 701-18.
- Wally, V., Murauer, E. M. y Bauer, J. W. (2012). Spliceosome-mediated trans-splicing: the therapeutic cut and paste. *Journal of Investigative Dermatology* 132, 1959-66.
- Wang, F. y Segatori, L. (2013). Remodeling the proteostasis network to rescue glucocerebrosidase variants by inhibiting ER-associated degradation and enhancing ER folding. *PLoS One* 8, e61418. doi: 10.1371/journal.pone.0061418.
- Wang, X., Venable, J., LaPointe, P., Hutt, D. M., Koulov, A. V., Coppinger, J., Gurkan, C., Kellner, W., Matteson, J., Plutner, H., Riordan, J. R., Kelly, J. W., Yates, J. R., 3rd y Balch, W. E. (2006). Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell* 127, 803-15.
- Wang, Y. J., Han, D. Y., Tabib, T., Yates, J. R., 3rd y Mu, T. W. (2013). Identification of GABA(C) receptor protein homeostasis network components from three tandem mass spectrometry proteomics approaches. *Journal of Proteome Research* 12, 5570-86.
- Ward, A. J. y Cooper, T. A. (2010). The pathobiology of splicing. *Journal of Pathology* 220, 152-63.
- Webb, T. R., Parfitt, D. A., Gardner, J. C., Martinez, A., Bevilacqua, D., Davidson, A. E., Zito, I., Thiselton, D. L., Ressa, J. H., Apergi, M., Schwarz, N., Kanuga, N., Michaelides, M., Cheetham, M. E., Gorin, M. B. y Hardcastle, A. J. (2012). Deep intronic mutation in OFD1, identified by targeted genomic next-generation sequencing, causes a severe form of X-linked retinitis pigmentosa (RP23). *Human Molecular Genetics* 21, 3647-54.
- Westphal, V., Kjaergaard, S., Schollen, E., Martens, K., Grunewald, S., Schwartz, M., Matthijs, G. y Freeze, H. H. (2002). A frequent mild mutation in ALG6 may exacerbate the clinical severity of patients with congenital disorder of glycosylation Ia (CDG-Ia) caused by phosphomannomutase deficiency. *Human Molecular Genetics* 11, 599-604.
- Westphal, V., Peterson, S., Patterson, M., Tournay, A., Blumenthal, A., Treacy, E. P. y Freeze, H. H. (2001). Functional significance of PMM2 mutations in mildly affected patients with congenital disorders of glycosylation Ia. *Genetics in Medicine* 3, 393-8.
- Wheeler, T. M., Lueck, J. D., Swanson, M. S., Dirksen, R. T. y Thornton, C. A. (2007). Correction of CIC-1 splicing eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of myotonic dystrophy. *Journal of Clinical Investigation* 117, 3952-7.

- Wheeler, T. M., Sobczak, K., Lueck, J. D., Osborne, R. J., Lin, X., Dirksen, R. T. y Thornton, C. A. (2009). Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA. *Science* 325, 336-9.
- White, P. J., Anastasopoulos, F., Pouton, C. W. y Boyd, B. J. (2009). Overcoming biological barriers to *in vivo* efficacy of antisense oligonucleotides. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 11, e10. doi: 10.1017/S1462399409001021.
- Winkler, J. (2013). Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications. *Therapeutic Delivery* 4, 791-809.
- Wolfe, L. A. y Krasnewich, D. (2013). Congenital disorders of glycosylation and intellectual disability. *Developmental Disabilities Research Reviews* 17, 211-25.
- Wong, J. W., Chan, C. L., Tang, W. K., Cheng, C. H. y Fong, W. P. (2010). Is antiqutin a mitochondrial Enzyme? *Journal of Cellular Biochemistry* 109, 74-81.
- Wu, X., Steet, R. A., Bohorov, O., Bakker, J., Newell, J., Krieger, M., Spaapen, L., Kornfeld, S. y Freeze, H. H. (2004). Mutation of the COG complex subunit gene COG7 causes a lethal congenital disorder. *Nature Medicine* 10, 518-23.
- Yang, C., Swallows, C. L., Zhang, C., Lu, J., Xiao, H., Brady, R. O. y Zhuang, Z. (2014). Celastrol increases glucocerebrosidase activity in Gaucher disease by modulating molecular chaperones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 249-54.
- Yang, J., Bridges, K., Chen, K. Y. y Liu, A. Y. (2008). Riluzole increases the amount of latent HSF1 for an amplified heat shock response and cytoprotection. *PLoS One* 3, e2864. doi: 10.1371/journal.pone.0002864.
- Yu, Z., Sawkar, A. R., Whalen, L. J., Wong, C. H. y Kelly, J. W. (2007). Isofagomine- and 2,5-anhydro-2,5-imino-D-glucitol-based glucocerebrosidase pharmacological chaperones for Gaucher disease intervention. *Journal of Medicinal Chemistry* 50, 94-100.
- Zanetta, C., Nizzardo, M., Simone, C., Monguzzi, E., Bresolin, N., Comi, G. P. y Corti, S. (2014). Molecular therapeutic strategies for spinal muscular atrophies: current and future clinical trials. *Clinical Therapeutics* 36, 128-40.
- Zdebska, E., Musielak, M., Jaeken, J. y Koscielak, J. (2001). Band 3 glycoprotein and glycophorin A from erythrocytes of children with congenital disorder of glycosylation type-Ia are underglycosylated. *Proteomics* 1, 269-74.
- Zeevaert, R., de Zegher, F., Sturiale, L., Garozzo, D., Smet, M., Moens, M., Matthijs, G. y Jaeken, J. (2013). Bone Dysplasia as a Key Feature in Three Patients with a Novel Congenital Disorder of Glycosylation (CDG) Type II Due to a Deep Intronic Splice Mutation in TMEM165. *Journal of Inherited Metabolic Disease Reports* 8, 145-52.
- Zoltowska, K., Webster, R., Finlayson, S., Maxwell, S., Cossins, J., Muller, J., Lochmuller, H. y Beeson, D. (2013). Mutations in GFPT1 that underlie limb-girdle congenital myasthenic syndrome result in reduced cell-surface expression of muscle AChR. *Human Molecular Genetics* 22, 2905-13.

8. Publicaciones

Parte de este trabajo se encuentra recogido en las siguientes publicaciones:

- Pérez B, Gutiérrez-Solana LG, Verdú A, Merinero B, **Yuste-Checa P**, Ruiz-Sala P, Calvo R, Jalan A, Marín LL, Campos O, Ruiz MÁ, Miguel MS, Vázquez M, Castro M, Ferrer I, Navarrete R, Desviat LR, Lapunzina P, Ugarte M, Pérez-Cerdá C. Biochemical and molecular studies in pyridoxine-dependent epilepsy: eight novel mutations in the aldh7a1 gene (2013) *Epilepsia* 54:239-48.
- **Yuste-Checa P**, Medrano C, Gámez A, Desviat LR, Matthijs G, Ugarte M, Pérez-Cerdá C, Pérez B. Antisense-mediated therapeutic pseudoexon skipping in TMEM165-CDG (2015) *Clin Genet* 87:42-8.
- **Yuste-Checa P**, Gámez A, Brasil S, Desviat L R, Ugarte M, Pérez-Cerdá C, Pérez B. The effects of PMM2-CDG-causing mutations on the folding, activity and stability of the PMM2 protein. Enviado.