

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica

**Estudio del gen *CLCN1* en pacientes de miotonía
congénita: caracterización funcional de nuevas
mutaciones**

Carmen Palma Milla

Madrid, 2017

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**Estudio del gen *CLCN1* en pacientes de miotonía
congénita: caracterización funcional de nuevas
mutaciones**

Carmen Palma Milla, licenciada en Bioquímica

Director: Dr. Jesús Molano Mateos

Madrid, Hospital Universitario La Paz

Quiero dedicar este trabajo especialmente a Jesús y Paloma por ser magníficos profesionales y mejores personas. Gracias Jesús por haberme ofrecido este proyecto, haberme facilitado todo cuanto estaba en tu mano, por tu dedicación y tu esfuerzo. También quiero agradecer al resto de compañeros del equipo de Diagnóstico Molecular de la Paz, especialmente a Rubén y a Tegra y al resto de personas que sin pertenecer a este laboratorio me ayudaron en la parte experimental de la tesis, Susi, Adela y Luis Barrios. Este trabajo no hubiera sido posible además sin la colaboración de Paco Barros y Pilar de la Peña, gracias por vuestra labor desinteresada y la ayuda que me habéis prestado.

Por último, gracias a Josemi por el apoyo de estos años en los que he estado involucrada en este proyecto. Durante este tiempo hemos cambiado de ciudad, de trabajo y lo más importante, hemos sido padres. Sin tu ayuda y tu apoyo incondicional hubiera sido mucho más difícil llevar a término este proyecto de tesis e imposible todo lo demás.

RESUMEN

La miotonía congénita (MC) es la forma más común de miotonía no distrófica y está causada por mutaciones en el gen *CLCN1*, codificante del principal canal de iones cloruro del músculo esquelético (CIC-1); la alteración de la función de este canal, regulado por voltaje, da lugar al fenómeno de miotonía. La enfermedad se puede heredar con un modo de herencia dominante (enfermedad de Thomsen) o recesiva (enfermedad de Becker). El fenotipo clínico de ambas formas de la enfermedad es similar aunque la forma recesiva se caracteriza por una mayor gravedad de los síntomas. El diagnóstico clínico de MC debe sospecharse cuando se observan episodios de rigidez muscular (miotonia), fenómeno *warm-up*, miotonía clínica, patrón electromiográfico característico y/o historia familiar. El diagnóstico molecular de miotonía congénita consiste en el análisis del gen *CLCN1*.

En esta Memoria se han estudiado a nivel genético la serie de pacientes afectados de MC más extensa descrita en población española; compuesta de 71 casos índice y familiares, alcanzando un total de 99 individuos. El diagnóstico genético de estos pacientes se llevó a cabo mediante el estudio de variantes en el gen *CLCN1* con técnicas de secuenciación y Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA); también se realizó el análisis del gen *SCN4A* (secuenciación de exones seleccionados) causante de paramiotonía congénita. Con este algoritmo diagnóstico se alcanzó una tasa diagnóstica del 51%; de ellos el 88% portaban variantes patogénicas en *CLCN1* y un 12% resultaron portadores de variantes patogénicas en *SCN4A*. No se detectaron mutaciones del tipo de grandes deleciones/duplicaciones en ninguno de los pacientes estudiados. En esta Memoria se describen 27 variantes patogénicas diferentes en *CLCN1*, 19 mutaciones habían sido descritas previamente en la literatura científica y 8 mutaciones son caracterizadas por primera vez en este trabajo; éstas últimas son analizadas con predictores *in silico* y analizada su conservación a lo largo de la evolución. Además se ha realizado por primera vez el ensayo funcional electrofisiológico de 6 de estas mutaciones de cambio de sentido. Para ello se realizó mutagénesis dirigida para la obtención de los ADNc mutantes de *CLCN1* y se ensayó en condiciones de "clamp de voltaje" con célula entera. Se sometieron las células HEK293 a un protocolo de pulsos a distintos voltajes para obtener curvas de probabilidad de apertura (P_0) y se estudió la densidad de corriente de las células transfectadas con *CLCN1* mutante y mutante/silvestre (relación 1:1).

Por último se abordó el estudio del probable efecto fundador de la mutación c.180+3A>T. Para ello se analizaron 6 polimorfismos en el gen *CLCN1* en pacientes portadores de la mutación y en población control. Se llevó a cabo un estudio de haplotipos y un estudio de asociación caso-control. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a la frecuencia o tipos de haplotipo encontrados, por lo que no se pudo confirmar la existencia de un efecto fundador.

ABSTRACT

Myotonia congenita (MC) is the most common form of non-dystrophic myotonia and is caused by mutations in the *CLCN1* gene, encoding the main skeletal muscle ion chloride channel (ClC-1). Altering the function of this voltage-gated channel, leads to the phenomenon of myotonia. The disease can be inherited with a dominant (Thomsen disease) or recessive trait (Becker disease). Clinical phenotype of both forms of the disease is similar, although the recessive form is characterized by more severe symptoms. The clinical diagnosis of MC should be suspected in a patient who presents with episodes of muscle stiffness (myotonia), warm-up phenomenon, a characteristic electromyographic pattern, and/or family history. Molecular testing of *CLCN1* gene is the present approach for molecular diagnosis of MC.

In this Memory, the largest cohort of MC patients in spanish population is studied, composed by 71 index cases and family members, numbering 99 individuals in total. Genetic testing of these patients was performed by variant analysis in the *CLCN1* gene by DNA sequencing and MLPA test; analysis of the *SCN4A* gene causing paramyotonia congenita was also performed (by sequencing of selected exons). With this algorithm a diagnostic yield of 51% was achieved; 88% of diagnosed individuals had *CLCN1* pathogenic variants and 12% had *SCN4A* pathogenic variants. Gross deletions/duplications were not detected in any patient. In this Memory, 27 different pathogenic variants are described in *CLCN1*, 19 of them were known mutations described previously in scientific literature and 8 of them are described for the first time in this Memory, the former ones are analyzed with *in silico* and conservation tools. Furthermore, electrophysiologic analysis of 6 those missense pathogenic variants was performed. Site-directed mutagenesis was carried out to obtain cDNA mutants of *CLCN1* and whole cell patch clamp was performed on transfected HEK293 cells. A voltage protocol was applied to obtain open probability curves (P_0) and current densities in transfected cells with mutant *CLCN1* and mutant/wild type (1:1 rate).

Finally, analysis of a likely founder effect of c.180+3A>T mutation was achieved. Genotype of 6 polymorphisms in *CLCN1* gene was analyzed in c.180+3A>T carriers and in control population. Haplotype analysis and association test were done. No statistically significant differences were detected between both groups regarding haplotype type or haplotype frequencies. As a conclusion, the existence of a founder effect remained unconfirmed.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	9
1.1.	MIOTONÍA CONGÉNITA: DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD	9
1.2.	DIAGNÓSTICO CLÍNICO	11
1.3.	PREVALENCIA.....	14
1.4.	EL CANAL CLC-1	15
1.5.	MUTACIONES EN <i>CLCN1</i>	17
1.6.	UTILIDAD DE LOS ENSAYOS FUNCIONALES	19
2.	OBJETIVOS	20
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	21
3.1.	PACIENTES Y RECOGIDA DE DATOS	21
3.2.	DIAGNÓSTICO MOLECULAR	21
3.3.	CONSTRUCCIÓN DE GENES <i>CLCN1</i> MUTANTES PARA SU ANÁLISIS FUNCIONAL	28
3.4.	EXPRESIÓN DEL GEN SILVESTRE Y DE LOS GENES MUTANTES EN CÉLULAS HEK293	32
3.5.	REGISTROS IÓNICOS.....	32
3.6.	ESTUDIO DEL POSIBLE EFECTO FUNDADOR DE LA MUTACIÓN <i>CLCN1</i> : c.180+3A>T. ANÁLISIS DE SNPs:	33
4.	RESULTADOS	35
4.1.	DISTRIBUCIÓN DE MUTACIONES EN <i>CLCN1</i> EN LA COHORTE DE PACIENTES CON MIOTONÍA CONGÉNITA.....	35
4.2.	MUTACIONES NUEVAS EN <i>CLCN1</i>	39
4.3.	PREDICCIÓN MEDIANTE HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS DEL EFECTO FUNCIONAL DE LAS NUEVAS MUTACIONES CARACTERIZADAS EN <i>CLCN1</i>	42
4.4.	CONSERVACIÓN DE LOS RESIDUOS AMINOACÍDICOS AFECTADOS POR LAS NUEVAS MUTACIONES DE CAMBIO DE SENTIDO EN <i>CLCN1</i>	44
4.5.	MUTACIONES DETECTADAS EN <i>SCN4A</i>	46
4.6.	PREDICCIÓN MEDIANTE HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS DEL EFECTO FUNCIONAL DE LA MUTACIÓN P.SER1434PRO DETECTADA EN <i>SCN4A</i>	47
4.7.	CONSERVACIÓN DEL RESIDUO AMINOACÍDICO AFECTADO POR LA MUTACIÓN DE CAMBIO DE SENTIDO P.SER1434PRO EN <i>SCN4A</i>	48
4.8.	ANÁLISIS DE GRANDES DELECCIONES/DUPLICACIONES EN EL GEN <i>CLCN1</i> MEDIANTE MLPA (MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION).....	48
4.9.	RESULTADO DEL ANÁLISIS FUNCIONAL DE MUTACIONES.....	49
4.10.	EFECTO FUNDADOR:	55
5.	DISCUSIÓN:	60
6.	CONCLUSIONES	74
7.	BIBLIOGRAFÍA	76
8.	ANEXO	83

Clave de abreviaturas:

ADNc: ácido desoxiribonucleico copia

BGH: hormona de crecimiento bovina (del inglés *Bovine Growth Hormone*)

ddH₂O: agua doble-destilada

DM1: distrofia miotónica tipo 1

DM2: distrofia miotónica tipo 2

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTPs: deoxinucleotido trifosfato

HEK293: células embrionarias de riñón humano (del inglés *Human Embryonic Kidney Cell Line 293*)

LB: medio Luria Bertani

MC: miotonía congénita

MLPA: del inglés *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

RGM: enfermedad de Becker o miotonía generalizada recesiva (del inglés *Recessive Generalized Myotonia*)

EMG: electromiograma

HPO: del inglés *Human Phenotype Ontology*

MAF: frecuencia poblacional del alelo menor (del inglés *Minor Allele Frequency*)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Miotonía congénita: descripción de la enfermedad

Las miotonías no distróficas son un grupo de canalopatías tradicionalmente consideradas como un grupo diferente de las miotonías distróficas debido a la ausencia de debilidad progresiva y afectación sistémica. Las miotonías no distróficas están causadas por disfunción de los principales canales iónicos musculares y entre ellas están incluidas las enfermedades de miotonía congénita, paramiotonía congénita y miotonías asociadas al canal de sodio¹. La miotonía congénita (MC) es la forma más común de miotonía no distrófica². Descrita por primera vez en el año 1876 por Julius Thomsen³, es una enfermedad producida por la alteración del principal canal de iones cloruro del músculo esquelético. Una reducción en la conductancia de Cl⁻ del músculo lleva a un aumento de la excitabilidad de la célula muscular y produce el fenómeno de miotonía, es decir retraso en la relajación muscular después de una contracción voluntaria⁴.

Los individuos afectos de MC sufren rigidez muscular al iniciar el movimiento. Esta rigidez sin embargo remite después de varias repeticiones de ese mismo movimiento (fenómeno *warm-up*). El fenómeno miotónico no es exclusivo de la MC, ya que aparece en otras enfermedades como la parálisis periódica hiperpotasémica, la paramiotonía congénita, y las distrofias miotónicas 1 y 2, entre otras⁵. Siendo la miotonía el síntoma más llamativo de estas enfermedades es importante una atenta observación de los síntomas, una cuidadosa revisión de la historia clínica y del patrón de herencia para poder realizar un diagnóstico diferencial.

Las mutaciones en el gen *CLCN1* producen miotonía congénita^{6,7} y ésta puede ser heredada de manera autosómica dominante (enfermedad de Thomsen) o autosómica recesiva (enfermedad de Becker o miotonía generalizada recesiva, RGM del inglés *Recessive Generalized Myotonia*). El fenotipo clínico de estas dos formas de la enfermedad es similar y a menudo difícil de diferenciar y para ello debemos observar la intensidad de los síntomas de los pacientes y el patrón de herencia en la familia afectada (Tabla 1). Ambas enfermedades están provocadas por mutaciones en el gen *CLCN1* que codifica el canal de cloruros del músculo esquelético CIC-1.

Tabla 1. Presentación clínica de miotonía congénita⁵

Características clínicas	Enfermedad de Thomsen	Enfermedad de Becker
Herencia	Dominante	Recesiva
Edad de aparición	Nacimiento	4-6 años
Músculos afectados	Grupos individuales de músculos	Aparición gradual que se generaliza a todos los músculos
Fuerza muscular	Normal o aumentada	Normal después de episodios de debilidad transitoria
Gravedad	Leve a moderado	Moderado a grave
Hipertrofia muscular	Ausencia a muy leve	Leve a evidente
Ratio de género	♂ ≈ ♀	♂ ≈ ♀

La forma dominante de MC o enfermedad de Thomsen (OMIM 160800) se hace patente generalmente durante la infancia temprana. Se observa un retraso en la relajación muscular y aunque no es frecuente observar hipertrofia muscular en niños afectos, sí que aparecen los músculos de las extremidades inferiores bien definidos. Habitualmente, la enfermedad de Thomsen no se identifica hasta la adolescencia, cuando se aprecia cierta torpeza y dificultad (rigidez) para el movimiento después del descanso. La enfermedad de Thomsen tiene un espectro fenotípico de leve a moderado, siendo la expectativa de vida normal. Es frecuente encontrar heterogeneidad intrafamiliar referida a la edad de aparición, grupo muscular afectado y gravedad. No es raro diagnosticar la enfermedad en individuos clínicamente asintomáticos en los que la realización de un electromiograma demuestra un patrón miotónico.

La enfermedad de Becker o RGM (OMIM 255700) es similar a la de Thomsen excepto por tener un patrón de herencia autosómico recesivo y presentar generalmente un fenotipo más grave. Clínicamente se presenta durante la infancia o adolescencia temprana, acompañada de hipertrofia muscular pronunciada⁸. El fenómeno miotónico es más severo que en la enfermedad de Thomsen y los pacientes pueden experimentar periodos transitorios de debilidad al iniciar el movimiento⁹. Los individuos afectos pueden ver comprometido su control postural y sufrir caídas; también pueden producirse mialgias aunque no es muy común. Por último, a pesar de la hipertrofia muscular algunos individuos presentan atrofia de los antebrazos^{10,5,11}.

1.2. Diagnóstico clínico

El diagnóstico clínico de miotonía congénita se debe de sospechar en los siguientes supuestos^{5,12,10,4,13}:

- Episodios de rigidez muscular o calambres de aparición en la infancia.
- Remisión o alivio de la rigidez con el ejercicio: fenómeno *warm-up*.
- Contracción miotónica provocada por la percusión muscular. Esta se ensaya en músculos prominentes como la eminencia tenar, la lengua o el tríceps sural.
- Patrón electromiográfico característico que muestra descargas miotónicas: incrementos significativos de la actividad insercional y descargas repetitivas de elevada frecuencia. La duración de las descargas repetitivas se correlaciona con el retraso en la relajación muscular y representa la característica electrofisiológica típica de la enfermedad (Figura 1).
- Historia familiar consistente con patrón de herencia autosómico dominante o recesivo. La historia familiar puede servir para distinguir entre estas dos entidades en algunos casos pero no siempre, debido a la variabilidad en la expresión de la enfermedad. En una misma familia pueden darse casos de enfermedad de Thomsen en unos miembros y de enfermedad de Becker, en otros. En la mayoría de las familias, un patrón de herencia autosómico dominante excluye el diagnóstico de RGM, pero la ausencia de miotonía en los progenitores es menos informativa ya que podríamos estar ante un caso de RGM o de baja penetrancia para una de las mutaciones. La posibilidad de la aparición de una mutación *de novo* es negligible ya que no se han descrito en esta enfermedad.
- La biopsia muscular es poco informativa. Se pueden observar algunos signos inespecíficos como variabilidad del tamaño de fibras, numerosas fibras atróficas, engrosamiento de éstas en los músculos hipertróficos, localización central del núcleo y agregados mitocondriales. Cuando se estudia el subtipo de fibras, se observa una ausencia completa del tipo 2B^{14,2}.

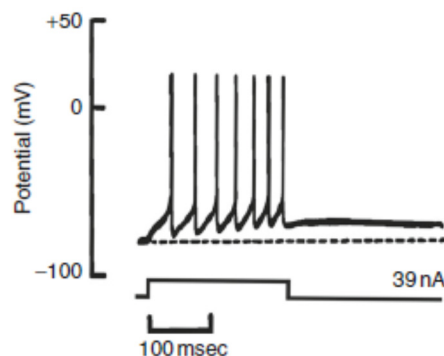


Figura 1. Datos de potencial de acción tomados de músculo miotónico en respuesta a estímulo eléctrico. Tras el estímulo de la fibra muscular (39 nA) se producen múltiples picos de potencial de acción y una pequeña despolarización. La línea de puntos representa el potencial de reposo⁵.

El diagnóstico diferencial de MC incluye otros desórdenes genéticos en los cuales la miotonía es el hallazgo principal. Es fundamental distinguir las formas no distróficas de miotonía de los síndromes miotónicos distróficos como las distrofia miotónicas tipo 1 y 2. Las distrofias miotónicas tipo 1 y 2, DM1 y DM2 (OMIM 160900 y 602668, respectivamente) siempre deben ser consideradas en el diagnóstico diferencial de MC. Aunque en la enfermedad de Becker se observa cierto grado de debilidad y desgaste muscular, el patrón es muy diferente en las distrofias miotónicas y además en éstas últimas se observan con frecuencia otras manifestaciones extramusculares como las cataratas tempranas, alteración de la conducción cardíaca y la disfunción endocrina¹⁰. Es interesante reseñar que el fenómeno miotónico asociado a DM se debe al procesamiento de ARN aberrante de *CLCN1* causado por acumulación en el núcleo celular de productos de ARN patogénicos con cientos de repeticiones CUG y CCUG, procedentes de los genes *DMPK1* y *ZNF9* (actualmente denominado *CNBP* según el Comité de Nomenclatura de Genes HUGO) respectivamente¹⁵.

La enfermedad conocida como paramiotonía congénita (OMIM 168300), es una miopatía no distrófica causada por mutaciones en el gen *SCN4A*, que codifica el canal de sodio responsable de iniciar el potencial de acción y puede a veces confundirse con la MC. Aunque ambos casos se presentan con debilidad generalizada desde la infancia, los individuos con paramiotonía tienen una sensibilidad extrema al frío que les provoca un empeoramiento de los síntomas. Además, en los individuos con paramiotonía la rigidez se agrava con la repetición de la contracción muscular, fenómeno contrario al *warm-up* observado en los pacientes con MC.

Otra enfermedad provocada por mutaciones en el gen *SCN4A* es la denominada miotonía agravada por potasio (OMIM 170500, 613345), en la que la miotonía se asocia a episodios de parálisis periódica hiperpotasémica. Los dos fenotipos relacionados con el gen *SCN4A* presentan una herencia autosómica dominante y son el resultado de mutaciones que provocan un aumento de función del canal del sodio^{2,11,16}. Se estima que más de un 20% de los pacientes con sospecha de padecer MC tienen mutaciones en *SCN4A*¹⁷. En la tabla 2 se enumeran algunas de las mutaciones más frecuentemente descritas en este gen, localizadas en los exones 9, 13, 22 y 24.

Tabla 2. Relación de mutaciones frecuentes en el gen *SCN4A* causantes de paramiotonía congénita y fenotipos asociados.

Fenotipo asociado (OMIM) ¹⁸	Exón	Mutación	Código dbSNP (NCBI) ¹⁹	Código HGMD ²⁰
Miotonía congénita atípica	9	c.1333G>A p.Val445Met	rs121908552	CM971327
Parálisis periódica normopotasémica, sensible a potasio	13	c.2023C>T p.Arg675Trp	rs121908556	CM043574
Parálisis periódica normopotasémica, sensible a potasio	13	c.2023C>G p.Arg675Gly	rs121908556	CM043573
Parálisis periódica normopotasémica, sensible a potasio	13	c.2024G>A p.Arg675Gln	rs121908557	CM043572
Paramiotonía congénita	13	c.2078T>C p.Ile693Thr	rs80338956	CM962693
Parálisis periódica hiperpotasémica	13	c.2111C>T p.Thr704Met	rs80338957	CM910351
Paramiotonía congénita	22	c.3917G>T p.Gly1306Val	rs80338792	CM920619
Miotonía fluctuante	22	c.3917G>C p.Gly1306Ala	rs80338792	CM930669
Miotonía permanente	22	c.3917G>A p.Gly1306Glu	rs80338792	CM930668
Paramiotonía congénita	22	c.3938C>T p.Thr1313Met	rs121908547	CM941270
Paramiotonía congénita	24	c.4298T>G p.Leu1433Arg	rs121908550	CM930671
Síndrome miasténico congénito 16	24	c.4325T>A p.Val1442Glu	rs121908553	CM031353

Tabla 2. (Continuación)

Fenotipo asociado (OMIM) ¹⁸	Exón	Mutación	Código dbSNP (NCBI) ¹⁹	Código HGMD ²⁰
Paramiotonía congénita	24	c.4342C>T p.Arg1448Cys	rs121908544	CM941272
Paramiotonía congénita	24	c.4343G>A p.Arg1448His	rs121908545	CM941271
Paramiotonía congénita	24	c.4367G>A p.Gly1456Glu	rs121908554	CM991126
Paramiotonía congénita	24	c.4428G>A p.Met1476Ile	rs121908559	CM075003
Miotonía agravada por potasio	24	c.4765G>A p.Val1589Met	rs121908548	CM930672
Parálisis periódica hiperpotasémica	24	c.4774A>G p.Met1592Val	rs80338962	CM910353

1.3. Prevalencia

No existen datos actualizados de la prevalencia de MC, de modo que actualmente siguen vigentes los datos de prevalencia estimados por Becker entre 1:23000 y 1:50000⁸. Aunque en algunas fuentes podemos encontrar que la forma dominante de la enfermedad es más frecuente¹⁰, la mayoría de los autores considera que la forma recesiva de la enfermedad es más común que la dominante^{21,13}. Uno de los estudios que apoyan esta última tesis es el de Fialho y colaboradores²², en el que se estudia una cohorte de 300 pacientes residentes en Reino Unido. Estos autores detectan un 37% de herencia dominante frente a un 40% de herencia recesiva (familias o casos esporádicos con dos mutaciones); el 23% restante corresponde a las familias y casos esporádicos en los que sólo fue detectada una mutación. Una de las limitaciones de este artículo es que al estar incluidas en este último grupo mutaciones no descritas que carecen de ensayo funcional no se podría distinguir entre casos de herencia dominante y casos de herencia recesiva en los que no se ha detectado una segunda mutación. Papponen y colaboradores²³ estiman una prevalencia para Finlandia de 7.3 en 100.000 habitantes, siendo mayoritaria la forma recesiva. En un estudio reciente en Inglaterra, se describen datos de muy baja prevalencia para miotonía congénita: 0.52 en 100.000 habitantes²⁴.

1.4. El canal CIC-1

El CIC-1 pertenece a la familia de canales iónicos regulados por voltaje, que en mamíferos se compone de nueve miembros²⁵.

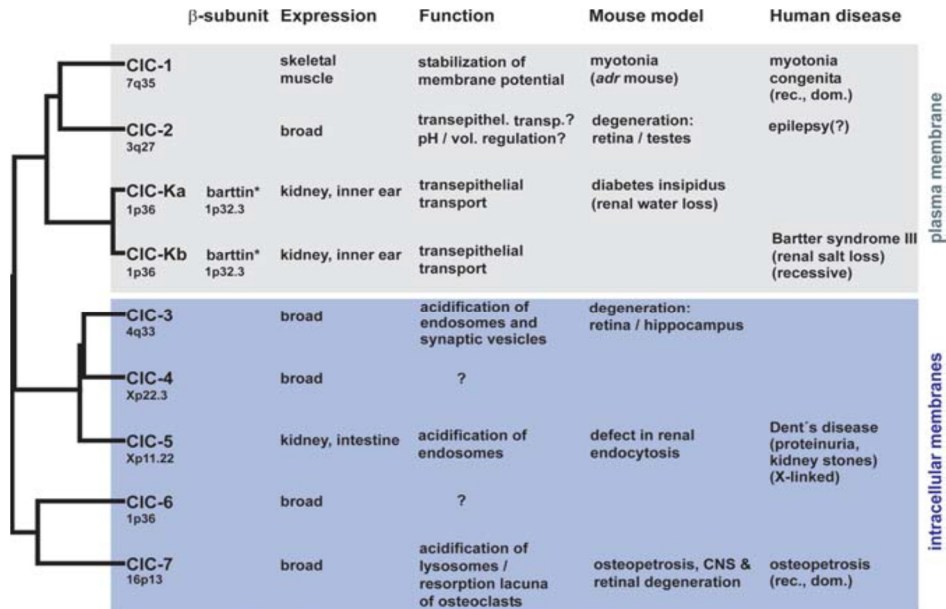


Figura 2. Árbol filogenético de canales CIC de mamífero. Los canales en el recuadro gris funcionan principalmente en la membrana plasmática, mientras que los canales del recuadro azul se localizan principalmente en membranas intracelulares²⁶.

Los canales de cloruro regulados por voltaje “CIC” están presentes en todas las especies superiores y en la mayoría de los procariotas. En la especie humana, los canales CIC se clasifican en tres grupos atendiendo a su semejanza en la secuencia nucleotídica²⁵. El grupo de canales anclados a la membrana plasmática está formado por, CIC-1 (expresión predominante en músculo esquelético), CIC-2 (expresión ubicua) y canales CIC-K (expresión predominante en riñón). Los otros dos grupos, CIC-3/CIC-4/CIC-5 por una parte y CIC-6/CIC-7 por otra, están formados por canales anclados a la membrana intracelular de organelas. La alteración en el funcionamiento de estos canales iónicos da lugar a diferentes enfermedades genéticas²⁶ (Figura 2).

Los canales iónicos CIC-1 regulados por voltaje son proteínas críticas para el establecimiento del potencial de reposo de la membrana muscular y la habilidad de ésta para generar potenciales de acción. En el funcionamiento normal del potencial de acción muscular los canales de sodio regulados por voltaje generan el potencial de acción, el efecto simultáneo al proceso de la despolarización es la apertura de los canales de potasio regulados por voltaje, a la vez que se inactivan los canales de sodio y así se produce la repolarización de la membrana. El canal de cloruro es responsable de la mayor parte de la polaridad de la membrana en reposo y así tiene la función de frenar la excitabilidad de la membrana y estabilizar el potencial de reposo^{10,24,26}. CIC-1 es el principal canal de cloruros de músculo esquelético y es esencial para el mantenimiento del potencial de membrana y con ello de la excitabilidad muscular. Las mutaciones en

CIC-1 son mutaciones de pérdida de función que reducen por tanto la conductancia de cloruro y su papel estabilizante¹¹.

Para entender los efectos patogénicos que producen las mutaciones en el gen *CLCN1* es necesario conocer algunas propiedades generales de los canales de cloruro CIC-1. Los canales CIC-1 funcionan como homodímeros, en los que cada monómero alberga un poro²⁸. Cada poro individual (protoporo) del canal mantiene sus propiedades individuales, tales como selectividad iónica y conductancia, y cada protoporo puede abrirse o cerrarse de manera individual (apertura rápida)²⁵. Además de la apertura individual, existe también un mecanismo común que acciona ambos poros en paralelo (apertura lenta)^{29,30}. Tanto la apertura del protoporo como la apertura común se activan con la despolarización^{26,31}.

Cada subunidad de CIC-1 contiene 17 dominios α -hélice intramembrana y uno, el dominio A, citoplasmático. Cada subunidad tiene una estructura interna que se repite dos veces y las dos mitades tienen una disposición simétrica y antiparalela, de forma que, la hélice B se corresponde con la hélice J, la hélice C con la hélice K y así sucesivamente (Figura 3). Además de estar unidas las dos mitades de la proteína mediante la unión I-J, ambas mitades de cada monómero están en contacto mediante las hélices C y K, H y P respectivamente³¹.

Los dos monómeros que forman el canal se disponen formando un ángulo de 45° y entre ellos existe una zona de interfase en la que se enfrentan e interaccionan ambas subunidades, formada por las hélices H, P, I y Q.

Las regiones marcadas en rojo regulan el paso del ión cloruro en el poro; son regiones muy conservadas situadas en los extremos iniciales de la hélice D, hélice F y sus equivalentes simétricos en la hélice N y el inicio de la hélice R³¹.

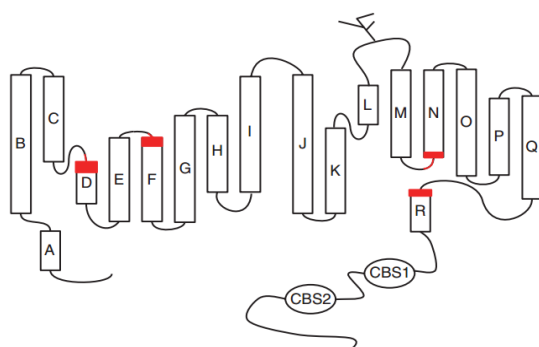


Figura 3. Estructura del canal CIC-1. Las α -hélices se representan como rectángulos. La mayoría de los canales de mamífero tienen sitios de N-glicosilación consenso entre las hélices L y M, indicado mediante el símbolo ramificado. Las zonas rojas señalan las zonas que coordinan el paso de iones a través del poro³¹.

Esta arquitectura del canal tiene importantes consecuencias en el efecto que producen las mutaciones en *CLCN1*. Las mutaciones que reducen la conductancia a través de uno de los 2 protoporos no tendrán, por lo general, efecto dominante negativo sobre los protoporos silvestres. El efecto dominante vendrá dado en situaciones en las que, una

mutación afecte al cierre común del canal, o bien cuando el homodímero mutado, conservando su capacidad de dimerización con una subunidad silvestre, provoque la disposición incorrecta o degradación del dímero resultante²⁶.

Las proteínas truncadas en los dominios transmembrana generalmente no tienen un efecto dominante negativo, lo que sugiere que estas proteínas son incapaces de formar dímeros.

La estructura dimérica del canal implica que, una mutación con efecto dominante negativo podrá disminuir la corriente a través del canal hasta un 25% como máximo en un estado heterocigoto. Esa fracción se corresponde con el 25% de dímeros silvestre-silvestre cuando se expresan un alelo normal y uno mutado en individuos heterocigotos. Este hecho explica porque las mutaciones con efecto dominante-negativo en miotonía congénita tienen un efecto generalmente menos grave y con menor penetrancia que la forma recesiva en la cual ambos alelos están mutados y puede haber una pérdida total de función²⁶.

Los canales CIC carecen de un sensor de voltaje similar al que se ha descrito en otros canales catiónicos dependientes de voltaje. La dependencia de voltaje para la apertura del protoporo se cree que resulta del movimiento de aniones a través del poro^{32,33}, de modo que dicha apertura depende de la concentración de cloruros y del voltaje²⁵. La estructura cristalina de los canales CIC bacterianos reveló que en el lugar de unión del ion cloruro en el poro intervienen cuatro hélices provenientes de ambos lados de la membrana. Ha sido propuesto que un residuo de glutamato sobresaliente dentro del poro (glu232 en CIC-1 ó glu148 en CIC-0) participa en el cierre/apertura del canal. De hecho, se ha demostrado que mutaciones en este residuo alteran de forma importante la apertura del canal^{26,34}

1.5. Mutaciones en *CLCN1*

El gen *CLCN1* está localizado en el brazo largo del cromosoma 7 (7q34) y tiene un único transcrito codificante con referencia ENST00000343257 en la base de secuencias ENSEMBLE (www.ensembl.org/index.html) y con referencia NM_000083.2 en la base de secuencias de GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Se compone de 23 exones codificantes formados por 3172 nucleótidos y codifica una proteína de 988 aminoácidos³⁵.

Hasta el momento de escribir esta Memoria se han descrito más de 200 mutaciones en *CLCN1* según la base de datos Human Gene Mutation Database (www.hgmd.org), siendo en su mayoría mutaciones puntuales (cambio de sentido, sin sentido, pequeñas deleciones, inserciones, indels y mutaciones de *splicing*) y dentro de éstas, las más abundantes son mutaciones de cambio de sentido o sin sentido (200 mutaciones descritas).

El diagnóstico genético de MC se establece en un probando cuando se detecta una mutación patogénica en heterocigosis en el caso de la enfermedad de Thomsen o bien una mutación en homocigosis o dos mutaciones en heterocigosis compuesta en el caso de enfermedad de Becker. El abordaje del diagnóstico molecular comienza por la

secuenciación del gen *CLCN1*, seguida del estudio de grandes deleciones/duplicaciones mediante la técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) en caso de no identificar mutaciones patogénicas asociadas. Se estima que mediante la secuenciación del gen se pueden detectar más del 95% de los casos de miotonía congénita, mientras que el análisis de grandes deleciones/duplicaciones detectaría entre un 1%-5% de los casos^{10,36,2}.

La mayor parte de las mutaciones en *CLCN1* se asocian a la forma recesiva de la enfermedad. Entre ellas están las mutaciones que generan proteínas truncadas incapaces de formar dímeros con los monómeros silvestres o que generan una ausencia de proteína debido a la disminución del ARNm por un deterioro del mismo (*nonsense-mediated decay*). Asimismo, las mutaciones que afectan al protoporo de un canal, raramente pueden ejercer un efecto negativo sobre el otro protoporo en los dímeros mutante-silvestre, por lo que normalmente estarán relacionadas con miotonía de herencia recesiva. Otro tipo de mutaciones asociadas a la herencia recesiva son aquellas que alteran el procesamiento y localización de la proteína en la membrana de la célula, por lo que se observa una total ausencia de corriente en estos mutantes³⁷.

Las mutaciones asociadas a miotonía congénita de forma dominante son principalmente mutaciones que dan lugar a proteínas truncadas cerca del extremo C terminal de la proteína y mutaciones de cambio de sentido. Frecuentemente, el efecto de estas mutaciones se refleja en un cambio en el voltaje medio (V_{50}) en el cual se produce la apertura del canal. De forma que, los canales pasan a abrirse a voltajes más positivos, voltajes en los que se retrasa la apertura del canal y con ello la repolarización de la membrana³⁸. Según Duffield y colaboradores, la mayor parte de las mutaciones con efecto dominante tienen su efecto en la puerta común del canal y se localizan principalmente en las regiones que forman la interfase entre las 2 subunidades (hélices G, H, I, P y Q)^{39,26}. En relación con esta hipótesis, en el artículo de Fialho y colaboradores se hace referencia a la región de unión entre las hélices H-I y la región de la hélice I (codificadas por el exón 8), como una región *hot-spot* para mutaciones dominantes. En este trabajo los autores encontraron que en una cohorte de 22 familias, 7 de las 8 familias diagnosticadas de miotonía congénita autosómica dominante tenían mutaciones en el exón 8 de *CLCN1*²².

Las mutaciones que afectan a la dependencia de voltaje de sólo uno de los monómeros tienen diferentes efectos en los dímeros mutante-silvestre, y esto explica en parte la variabilidad en la penetrancia de algunas de estas mutaciones.

Otras mutaciones en *CLCN1* se han asociado a herencia dominante en algunas familias y a herencia recesiva en otras. Este fenómeno podría deberse a una expresión alélica preferencial^{26,40}. Por lo tanto, aunque se habla tradicionalmente de las formas dominante y recesiva de miotonía el límite entre estas dos formas de herencia no está totalmente definido.

1.6. Utilidad de los ensayos funcionales

El ensayo funcional permite estudiar los efectos de mutaciones sobre la apertura del canal CIC-1 y, además, observar su efecto sobre la actividad de la subunidad silvestre para así poder clasificarlas como mutaciones causantes de las formas dominante o recesiva de la enfermedad.

Los ensayos funcionales en los que se procede al análisis electrofisiológico del canal CIC-1 mutado son la herramienta fundamental para establecer la patogenicidad de las mutaciones en *CLCN1*, y particularmente en este gen son útiles en la predicción y establecimiento del tipo de herencia. Así, la co-expresión de canales formados por una subunidad mutante junto a una subunidad silvestre nos ayuda a discernir, en función de su comportamiento, entre mutaciones dominantes y recesivas. Se ha observado que en la expresión de canales formados por el dímero mutante-silvestre en el que la subunidad mutante alberga una mutación recesiva, la función de la subunidad silvestre no se ve alterada. Por el contrario, cuando se co-expresa un mutante dominante con la proteína silvestre sí que se observa un efecto adverso en el funcionamiento de la subunidad silvestre²²

Esta exploración de las consecuencias funcionales de variantes patogénicas en *CLCN1* se suele investigar mediante la expresión heteróloga de ADN mutante en oocitos de *Xenopus* o en células de mamífero (HEK293) en las que se llevan a cabo los correspondientes registros de corriente en experimentos "clamp de voltaje"¹⁰. La construcción de los genes mutantes de *CLCN1* se realiza mediante experimentos de mutagénesis dirigida⁴¹.

2. OBJETIVOS

- Diagnóstico molecular de miotonía congénita. Análisis del gen *CLCN1*: secuenciación del gen y detección de grandes deleciones/duplicaciones por MLPA.
- Diagnóstico diferencial de miotonía congénita con paramiotonía congénita y parálisis periódica hiperpotasémica: análisis del gen *SCN4A*.
- Construcción mediante mutagénesis dirigida de genes *CLCN1* mutantes. y caracterización electrofisiológica de los canales codificados por ellos mediante experimentos de "clamp de voltaje".
- Análisis del probable efecto fundador de la mutación c.180+3A>T en *CLCN1*, mediante la comparación de los haplotipos presentes en pacientes y en población control.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. *Pacientes y recogida de datos*

En este trabajo se ha estudiado una cohorte de 99 individuos compuesta de 71 pacientes (casos índice) y 28 familiares.

El grupo de casos índice está compuesto por pacientes con diagnóstico clínico de MC, derivados desde consultas de neurología de distintos hospitales, situados principalmente en la comunidad de Madrid; siendo la mayoría de la cohorte de nacionalidad española y atendida durante el periodo 2011-2013. En ella se incluyeron todos aquellos pacientes con signos y síntomas compatibles con la enfermedad, incluyendo algunos de los siguientes: miotonía clínica, hipertrofia muscular, datos electromiográficos compatibles con fenómeno miotónico, fenómeno *warm-up* positivo e historia familiar compatible; también se estudiaron los familiares de dichos pacientes a los que se les recomendó el estudio molecular como parte del asesoramiento genético.

La edad de la cohorte está comprendida entre los 5 y los 80 años, siendo la media de edad de 33,5 años y presentando una distribución por sexos de 33% mujeres y 67% hombres. Mediante la anamnesis se recogió información relevante de los pacientes y sus familiares, considerando los siguientes aspectos: nombre y apellidos, número identificativo de la muestra de ADN, condición de paciente o familiar sano, edad de inicio de la enfermedad, edad a la que se produce el diagnóstico de la enfermedad y características clínicas. Se facilitaron cuestionarios a completar por el neurólogo o solicitante del estudio genético con la descripción de los principales síntomas y hallazgos relacionados con la enfermedad, con el objeto de recabar información útil para la caracterización clínica de los pacientes. Se incluyeron los siguientes ítems: fecha de nacimiento, historia familiar, edad de aparición de los síntomas, presencia/ausencia de fenómeno *warm-up*, presencia/ausencia de debilidad muscular, presencia/ausencia de miotonía, empeoramiento de los síntomas con el frío, datos electromiográficos, información relativa al diagnóstico diferencial (en caso de haberse realizado), datos de biopsia muscular, presencia/ausencia de hipertrofia muscular y otros síntomas concomitantes.

3.2. *Diagnóstico molecular*

En todos los casos índices de este estudio se realizó inicialmente la secuenciación del gen *CLCN1*. En caso de detectar mutaciones en el gen *CLCN1* que justificasen la clínica del paciente, se procedió al estudio de sus progenitores y/u otros miembros de la familia en situación de riesgo que pudieran beneficiarse del consejo genético.

En los casos en los que únicamente fue detectada una mutación patogénica descrita previamente y asociada a herencia recesiva, y por lo tanto insuficiente para provocar la aparición de los síntomas, se completó el estudio con el análisis de grandes deleciones/duplicaciones del gen *CLCN1* mediante MLPA.

Por último, cuando no fueron detectadas mutaciones en *CLCN1* asociadas a miotonía congénita se procedió al análisis parcial del gen *SCN4A*, causante de paramiotonía congénita, estudiando para ello los 4 exones en los que se concentran, según la literatura científica, el 80% de las mutaciones en este gen (exones 9, 13, 22 y 24); los exones 22 y 24 del gen *SCN4A* son reconocidos como regiones “*hot-spot*”^{42,16,43}.

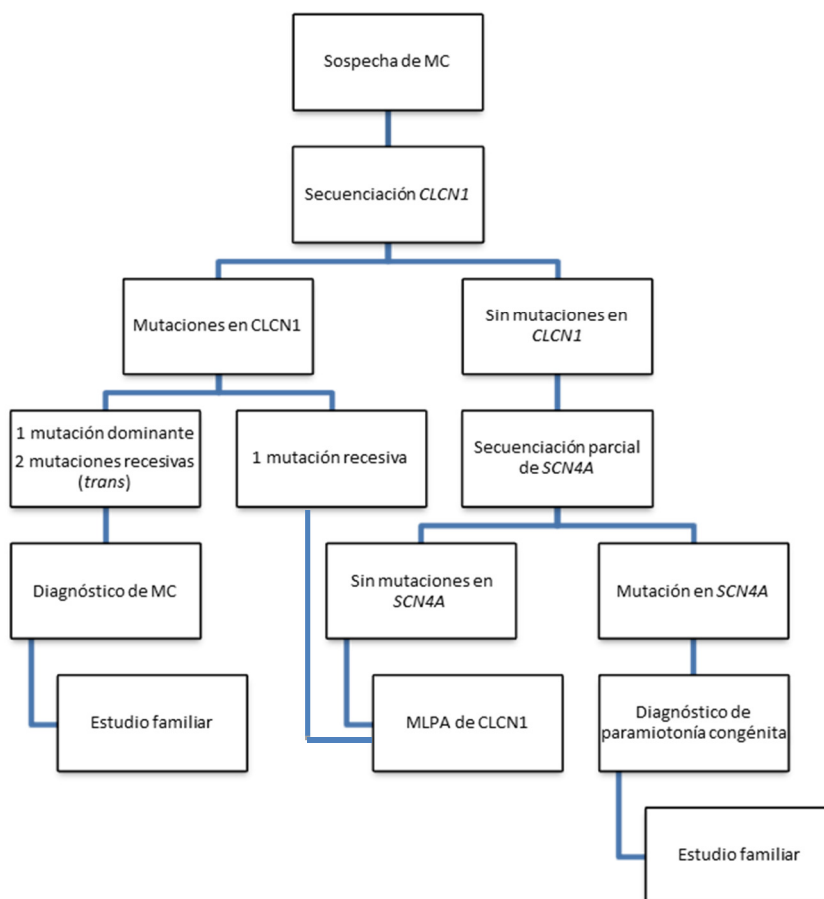


Figura 4. Algoritmo de estudio de secuenciación y MLPA de genes candidatos ante la sospecha clínica de miotonía congénita.

El diagnóstico molecular de miotonía congénita se realizó por secuenciación Sanger bidireccional de los 23 exones del gen *CLCN1* incluyendo las regiones intrónicas flanqueantes.

Se procedió a la extracción de ADN de leucocitos de sangre periférica según el procedimiento estándar usando para ello el kit Gentra Puregene Blood® (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) basado en la lisis celular mediante choque osmótico y digestión con proteinasa K, precipitación de las proteínas a elevada concentración de sal y precipitación final del ADN con isopropanol.

Se utilizaron cebadores intrónicos (Tabla 3), para amplificar cada uno de los 23 exones del gen *CLCN1*, diseñados con las siguientes herramientas bioinformáticas: *Primer3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3>)^{44,45} y *OligoAnalyzer3.1* (<http://www.idtdna.com/Scitools>)⁴⁶ según la secuencia de referencia: NM_000083.2. Para descartar la existencia de

polimorfismos en las zonas de hibridación de los cebadores se usó la herramienta SNPCheck3 (<https://secure.ngrl.org.uk/SNPCheck/snpcheck.htm>).

Tabla 3. Cebadores empleados para la amplificación del gen *CLCN1*.

Exón	Secuencia del cebador (5'→3')	Tm (°C)	pb	GC (%)
1	F-GAGGCTTAAGGAGCTACACTGG	60,2	349	54,5
	R-CCCTCTTTTCACCCAATTCCTC	58,9		50,0
2	F-AGTCTGTCTGCTGGCCTCTG	61,5	294	60,0
	R-GAGTACGTACGTGCAATGGG	58,7		55,0
3	F-TGACTCGTTAGCTGCTTTTCTC	58,7	400	45,4
	R-AGTCCCACCTGATCCCTCTC	60,0		60,0
4	F-CTGCTCAGCCATGTTCTGC	59,2	250	57,9
	R-GCTGGATGATGGGGGAGAC	59,5		63,2
5	F-CCCACCACTGCCTTTCAGC	63,1	320	65,0
	R-GAGCTCCCTCTAGAGTTGGTGC	62,1		59,1
6	F-TGAGGGCAGGACCTCTGTG	60,9	347	63,2
	R-TGGATTAGTGCGATGCTGCT	59,8		50,0
7	F-CCTTATCCCCATCCCTGC	57,2	260	57,9
	R-CTGGTAATACCAGCACTTGTG	56,6		47,6
8	F-TCCTTAGGTCCAAGCAGT	54,6	279	50,0
	R-AGAGTTTTCTCTGCACC	54,1		50,0
9	F-CACCTCTGTTCCCTGTTGG	58,4	220	55,0
	R-GGTCCCTTCCAATCTACAGC	57,7		55,0
10	F-CCAAGAGATGAGGATTCATGTC	57,0	224	43,5
	R-AAGGGAGGAACTCTTGGA	54,1		50,0
11	F-ATGAGCCACCGCACTCGGC	65,5	415	68,4
	R-GAGAACTTATCCCCAGCCTC	57,8		52,4

Tabla 3. (Continuación)

Exón	Secuencia del cebador (5'→3')	Tm (°C)	pb	GC (%)
12	F-GAGACCCTTGAATAATGAGGC	56,1	440	47,6
	R-CAGCCTGCCAAAGTGGTGG	61,6		63,2
13	F-GCAGAAAGGAGGATAGTGGG	57,4	257	55,0
	R-AAACTCCCAGCATCCCGGGC	65,0		65,0
14	F-GGGGTCTGACTGAGAGTTGC	60,0	359	60,0
	R-TGAAGATCCAATGGGAGAGTTT	57,1		40,9
15	F-CATCCCATCCCCATATGTCC	57,2	351	55,0
	R-TCAGCCTCAGAACCTCCCAC	61,2		60,0
16	F-TTATGGGAGGAATGGAAGGG	56,2	280	50,0
	R-CACCATGGGGCCTCCTCTAC	61,7		65,0
17	F-CCTGTTCTTCTCAGGAGTG	57,3	400	55,0
	R-CCAGCCCAGCCCAGACGACG	67,6		75,0
18	F-ACCAACTGGTAAAGGCAGTG	58,0	289	50,0
	R-CCCCGCATAGGAATTGCATG	59,4		55,0
19	F-CAAATGTTAGGCACTGGGTG	57,0	268	50,0
	R-CTCCTCCTTGGTGGGGTCTC	61,3		65,0
20	F-GGAGGCATCGGTGGTCCTGGCC	69,4	270	72,7
	R-AACACTTCCCATCCAGACC	56,6		52,6
21	F-CCCAGATTCTGGGCAGCGG	63,1	276	68,4
	R-CATGTTCTTGCCCCACAGC	61,9		60,0
22	F-CTCAGGGCTGTGGGAAGGC	65,0	240	70,0
	R-TATTCCTTCTGTCCCCACTG	56,2		50,0
23	F-TCTGTGTCCTCACTGCCCCGTC	67,7	622	62,5
	R-CTCCTCCCTGCCTAAATGCTG	60,5		57,2

Tm: Temperatura de fusión (del inglés *melting temperature*). F: Cebador directo. R: Cebador reverso.

%GC: Contenido de GC. Pb: Tamaño en pares de bases del amplicón.

Para la reacción de amplificación se usó la siguiente mezcla de reactivos:

Tabla 4. Mezcla de reacción para amplificación de los exones de *CLCNI*.

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración final
Master Mix (*)	12,5	-
Mg ²⁺ (25 mM)	1	1 mM
Cebador Directo (20 µM)	0,5	0,4 µM
Cebador Reverso (20 µM)	0,5	0,4 µM
H ₂ O	1,5	-
ADN (250 ng/µL)	2	20 ng/µL
Volumen final	25	

*Master Mix (Promega), solución que contiene una mezcla de 1 mM dNTPs, 5 UI/µL Taq ADN polimerasa, 1 mM MgCl₂ y tampón de reacción a pH 8.

La amplificación se llevó a cabo en termocicladores BIO-RAD (DNA Engine Tetrad 2. Peltier Thermal Cycler. BIO-RAD Laboratories Inc. California, Estados Unidos). Para aumentar la especificidad en la amplificación de los distintos fragmentos en la reacción de PCR se llevó a cabo una optimización de la temperatura de fusión (T_m) para cada par de cebadores mediante la realización de un gradiente de temperaturas. Con el fin de conseguir un producto de PCR único, la temperatura de hibridación del primer ciclo se fijó entre 5 y 10°C por encima de la temperatura óptima para la unión de los cebadores. En ciclos sucesivos y hasta el ciclo 16 se bajó la temperatura de hibridación medio grado cada ciclo (PCR *touch-down*). Durante los 16 ciclos finales se mantuvo fija la temperatura de hibridación alcanzada en el ciclo 16. Las temperaturas y los tiempos del programa empleado en amplificar todos los exones fueron las mismas y se detallan a continuación:

1 ciclo a 95 °C durante 3 minutos; 16 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 30 segundos a 64 °C (disminuyendo 0,5 °C cada ciclo) y 1 minuto a 72 °C; 16 ciclos más de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 56 °C y 1 minuto a 72 °C; finalmente un ciclo de 10 minutos 72 °C.

Para visualizar los productos de amplificación obtenidos se realizó electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% con tinción de ADN, SYBR® Safe (Thermo Fisher Scientific Inc.).

El ADN amplificado obtenido se purificó mediante ExoSAP-IT® (Affymetrix), reactivo enzimático que contiene una exonucleasa que hidroliza los cebadores empleados en la PCR previa y una fosfatasa que desfosforila la dNTPs no incorporados durante la reacción de amplificación. El tratamiento con ExoSAP-IT se realizó mezclando 5 µl producto de PCR y 2 µl de ExoSAP-IT e incubando a 37 °C durante 15 min. Finalmente la reacción se detuvo incubando la mezcla a 80 °C durante 15 min.

El producto obtenido se secuenció con el método de terminadores di-deoxiNTPs fluorescentes (Sanger) y la mezcla de secuenciación, una vez purificada, se analizó en un secuenciador automático ABI3130.

La reacción de secuenciación se hizo usando el reactivo BigDye® Terminator v3.1 (Thermo Fisher), que contiene tampón, ADN polimerasa y la mezcla de los 4 dNTPs (deoxiadenosintrifosfato, deoxiguanosintrifosfato, deoxicitosintrifosfato y deoxitimidintrifosfato) y los 4 dideoxiNTPs fluorescentes en la proporción adecuada (10:1) (Tabla 5). El ciclo de temperaturas empleadas para la reacción de secuenciación fue: 1 ciclo de 96 °C durante 1 minutos; 25 ciclos de 96 °C durante 10 segundos, 57 °C durante 5 segundos y 60°C durante 4 minutos.

Tabla 5. Mezcla de reacción para secuenciación de los exones de *CLCN1*.

Reactivo	Volumen (µL)
BigDye	0,25
Buffer de secuenciación	1,75
Cebador (2 µM)	2
Producto de PCR	1
H ₂ O	5

Por último, los productos de secuenciación se purificaron mediante el kit CleanSeq Beckman Coulter (Agencourt Bioscience) para eliminar el exceso de terminadores fluorescentes no incorporados. Las muestras se resuspendieron en ddH₂O.

Las secuencias purificadas se procesaron en un secuenciador capilar automático ABI3130. Las secuencias de ADN obtenidas fueron alineadas frente a la secuencia de referencia mediante los programas bioinformáticos: BLAST (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?>) y Sequencher (Gene Codes Corporation) para su análisis.

Las variantes identificadas en la secuenciación fueron cotejadas en bases de datos (Ensembl³⁵; The Human Gene Mutation Database²⁰) y valoradas en base a la literatura relacionada disponible.

En aquellos casos en los que resultó negativa la secuenciación del gen *CLCN1* se estudiaron 4 exones seleccionados del gen *SCN4A* (NM_000334); para ello se amplificaron y secuenciaron los exones 9, 13, 22 y 24, donde se localizan las mutaciones más frecuentes asociadas a paramiotonía congénita¹⁸.

Los exones seleccionados del gen *SCN4A* se amplificaron con cebadores específicos (Tabla 6) diseñados con los programas Primer3 y Oligo Analyzer3.1 y empleando la mezcla de reacción de amplificación detallada anteriormente para los exones de *CLCN1*. El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: 1 ciclo a 95 °C durante 3 minutos; 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 57°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto; finalmente 1 ciclo 72°C 10 minutos. El producto de PCR resultante se purificó y secuenció según las condiciones descritas previamente para *CLCN1*.

Tabla 6. Cebadores empleados para la amplificación del gen *SCN4A*.

Exón	Secuencia del cebador (5'→3')	T _m (°C)	pb	% GC
9	F-GGGCAATGGATGTATGGAAA	55,7	416	45,0
	R-CTCAAAACCCCTACCCCTGT	58,9		55,0
13	F-TAAGGCTGGGGCTGCCTTG	62,3	519	63,2
	R-AGGATGTGTTGGGGAGATAG	56,0		50,0
22	F-GTGAGGTGCCCCACTGAG	59,6	308	66,7
	R-CTAACCTCACCCAGGGACAC	59,4		60,0
24	F-GACTTGAGCAGAGCACACCAG	61,2	707	57,1
	R-GGGTCGAACTTCTCCCATGT	59,4		55,0

T_m: Temperatura de fusión (del inglés *melting temperature*). F: Cebador directo. R: Cebador reverso.
%GC: Contenido de GC. Pb: Tamaño en pares de bases del amplicón.

Todos los cambios nucleotídicos encontrados considerados de interés en cualquiera de los genes estudiados fueron verificados mediante una nueva amplificación y secuenciación en ambas direcciones.

En aquellos casos en los que fueron detectadas mutaciones nuevas de cambio de sentido, sin sentido, cambio del marco de lectura y de *splicing*, no descritas con anterioridad en la literatura científica, se emplearon herramientas bioinformáticas para predecir un posible efecto a nivel funcional de las mismas (PolyPhen2⁴⁷, MutationTaster⁴⁸, MutPred⁴⁹, SIFT⁴⁹, LRT⁵⁰, MutationAssessor⁵¹, Human Splicing Finder (HSF)⁵²). Así mismo, se estudió la conservación a nivel evolutivo de los aminoácidos afectados mediante alineamiento con la secuencia de la proteína de siete especies de vertebrados (*Macaca mulatta*, *Mus musculus*, *Canis lupus familiaris*, *Loxodonta africana*, *Gallus gallus*, *Xenopus tropicalis* y *Danio rerio*). Se emplearon las herramientas bioinformáticas GERP+⁵³, PhyloP⁵⁴ y Siphy⁵⁵ para el estudio de conservación de nucleótidos. Por último, se empleó el programa bioinformático ConSurf⁵⁶ para el estudio de conservación de los residuos afectados por mutaciones de cambio de sentido así como su potencial papel estructural o funcional dentro de la proteína. Este programa web sirve para la identificación de residuos biológicamente importantes dentro de una secuencia proteica; para ello emplea alineamientos múltiples de proteínas homólogas y estima la tasa de sustitución de aminoácidos en cada posición, asumiendo que los residuos estructurales y funcionales importantes son conservados evolutivamente. Además la accesibilidad de los residuos y su potencial interacción con solutos en la estructura proteica se usa para predecir un efecto funcional o estructural.

El estudio de grandes deleciones/duplicaciones en el gen *CLCN1*, se realizó mediante la técnica de MLPA, usando para ello el reactivo SALSA-P350-B1 CLCN1-KCNJ2 y el

software de análisis Coffalyser.Net, ambos de la casa comercial MRC-Holland B.V. ® (Amsterdam, Holanda). El reactivo utilizado contiene sondas específicas de cada uno de los 23 exones del gen *CLCN1*, además de dos sondas flanqueantes del gen, una de ellas en el gen *CASP2* (corriente arriba) y otra en el gen *FAM131B* (corriente abajo). Esta técnica está diseñada para detectar grandes deleciones/duplicaciones en una o más secuencias en el gen de interés. De manera que las deleciones/duplicaciones en heterocigosis darán lugar a una reducción/aumento del 35%-50% del área relativa del pico de amplificación de la sonda⁵⁷.

3.3. Construcción de genes *CLCN1* mutantes para su análisis funcional

Para la caracterización funcional de las nuevas mutaciones se estudiaron las propiedades electrofisiológicas de los canales mutantes expresados en células embrionarias de riñón humano (HEK293). Se eligieron las células HEK293 debido a que las características de sus canales de cloruro endógenos son distintas de las del canal *ClC-1* y no interfieren en el ensayo funcional¹².

Se incluyeron en el ensayo funcional las siguientes mutaciones detectadas en nuestra serie de pacientes: c.536G>T (p.Gly188Val), c.653C>T (p.Ala218Val), c.809G>A (p.Gly270Asp), c.890T>A (p.Phe297Tyr), c.1649C>G (p.Thr550Arg) y c.2551G>A (p.Val851Met).

Los mutantes se crearon por mutagénesis dirigida sobre el gen *CLCN1* silvestre humano clonado previamente en el vector pcDNA3 y obtenido de la casa Invitrogen. Se trata de un vector bacteriano para expresión en células de mamífero, con promotor del citomegalovirus (CMV) y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH) para la terminación de la transcripción; además, el vector confiere resistencia bacteriana a ampicilina y marcador de resistencia a neomicina (Figura 5).

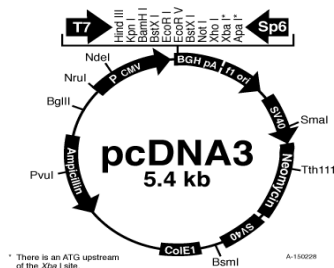


Figura 5. pcDNA3

Para llevar a cabo la mutagénesis dirigida se utilizó el método desarrollado por Stratagene y modificado por Zheng et al, que emplea cebadores solapantes complementarios en el extremo 5'⁵⁸. Las secuencias de los oligonucleótidos para generar los genes mutantes mediante amplificación del ADN del clon pcDNA3-*CLCN1* se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Secuencias de cebadores específicos empleados en el proceso de mutagénesis dirigida.

Mut	Secuencia del cebador (5' → 3')	T _m (°C)	pb	% GC
G188V	F-CCCAGGCTGTTGTCTCTGGAATCCCCGAAATGAAGAC	79,9	37	54,1
	R-GGATTCCAGAGACAACAGCCTGGGGAGAGATGAGGTGGC	82,2	39	59,0
T550R	F-GCTTCGAATTAAGGGGTCAGATTGCTCACATCCTGCC	78,4	37	51,4
	R-TCTGACCCCTTAATTCGAAGCAAATCACAGCTGTGGAG	77,6	38	47,4
V851M	F-CCTCGCTTACATGACCAGCATGGGGAAGCTCAGGGGCGTCC	85,0	41	63,4
	R-GCTGGTCATGTAAGCGAGGTGGAGGCCAAGGAGTGAAAAC	81,1	40	55,0
A218V	F-CCAAGGTTGTCGTCCTGACTGCGGGCCTGGGCAGTG	86,3	36	66,7
	R-GCAGTCAGGACGACAACCTTGGCCACAAAGGCTTTCATTG	82,3	40	52,5
G270D	F-CCTGACGGTGGACTGTGCTGTGGGAGTCGGCTGTTGTTTTG	85,3	41	58,5
	R-CACAGCACAGTCCACCGTCAGGATATCAGAGTAGTAGTATG	74,2	41	48,8
F297Y	F-TCCACCTACTATGCTGTTTCGGAACACTGAGAGGATTC	74,5	39	48,7
	R-CGAACAGCATAGTAGGTGGAGGTGACCTCGATGCTAAATAG	75,7	41	48,8

Mut: Mutante. T_m: Temperatura de fusión (del inglés *melting temperature*). F: Cebador directo. R: Cebador reverso. %GC: Contenido de GC. Pb: Tamaño en pares de bases.

La reacción de mutagénesis se llevó a cabo mediante un kit comercial siguiendo el protocolo de QuikChange II Site-directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies), que permite introducir mutaciones puntuales en plásmidos de doble cadena. La reacción de síntesis de la cadena mutante se hizo en un volumen final de 50 µL conteniendo 40 ng de plásmido pcDNA3-CLCN1, 125 ng totales de cada cebador (directo y reverso), 1 µL de *PfuUltra* HF DNA polimerasa (2 U/µL), 1 µL de mezcla de dNTPs (10mM), 5 µL de buffer 5x, 2 µL de DMSO y ddH₂O hasta alcanzar el volumen final.

Tabla 8. Mezcla de reactivos para la reacción de mutagénesis.

Reactivo	Volumen (µL)
pcDNA3-CLCN1 (20 ng/µL)	2
Cebador directo (10 µM)	1
Cebador reverso (10 µM)	1
PfuUltra HF (2 U/µL)	1
Buffer 10x	5
dNTP (10 mM)	1
DMSO	2
ddH ₂ O	37
Volumen final (µL)	50

Los ciclos de temperatura empleados para el método de mutagénesis dirigida fueron: 1 ciclo a 95 °C durante 30 segundos; 16 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 1 minuto y 68 °C durante 8,24 minutos; 1 ciclo a 68 °C durante 5 minutos y un periodo de incubación de 15 minutos a 15 °C.

Para visualizar los productos de amplificación obtenidos se realizó un gel de agarosa al 0.7% con tinción de ADN SYBR® Safe, utilizando el marcador de peso molecular de la casa Invitrogen 1 Kb ladder.

Una vez comprobada la amplificación de cada uno de los mutantes se procedió a la digestión de los productos de amplificación con la endonucleasa *DpnI* para eliminar el ADN parental metilado o hemimetilado (no mutado). Para ello, se añadieron 10 U de la enzima *DpnI* directamente a cada producto de amplificación, incubando a 37 °C durante 1 hora.

A continuación, se llevó a cabo la transformación de células competentes de la cepa de *E. coli* DH5 α . Se incubaron 100 μ L de bacterias competentes con 5 μ L del producto de la mutagénesis durante 30 minutos en hielo. Posteriormente se sometió la mezcla a choque térmico de 42°C durante 1 minuto. A continuación, otra vez en hielo se añadieron 9 volúmenes de medio de cultivo LB (Luria Bertani), que contiene péptidos y peptonas de caseína y extracto de levadura que proporcionan al medio los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de las bacterias; de nuevo se incubó durante 1 hora a 37 °C.

Se sembraron 200 μ L de bacterias transformadas en placas de agar con LB y ampicilina. Se usó un control negativo con células competentes no transformadas.

Se eligieron 5 colonias de cada mutante para crecer en medio de cultivo LB: Ampicilina (10:1) *overnight* a 37 °C y con agitación a 300 rpm.

Se aisló el ADN de 2 de las 5 colonias de cada mutante. Se usó para ello el kit comercial Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Este kit permite aislar el ADN plasmídico. El procedimiento de purificación empieza con una lisis alcalina de las células; posteriormente, se pasa el producto resultante por una columna de sílice en presencia de una alta concentración de sales donde queda adsorbido el ADN, finalmente el ADN plasmídico es eluido en agua.

La concentración de ADN y ratio de pureza ($A_{260/280nm}$) obtenida para cada uno de los clones fue medida en un espectrofotómetro UV-VIS (NanoDrop, Thermo Fisher).

Una vez obtenido el ADN plasmídico aislado y purificado se procedió a su secuenciación mediante la técnica de Sanger para corroborar la presencia de la mutación de interés y descartar mutaciones y alteraciones adicionales debidas a errores de la polimerasa a lo largo de la secuencia codificante de *CLCNI*. Previamente se digirió el ADN plasmídico con la enzima de restricción *EcoRI* (Roche Life Sciences) como comprobación del tamaño de la secuencia nucleotídica; usando para ello 8 μ L de ADN plasmídico junto con 1 μ L de enzima y 1 μ L de tampón B durante 2 horas a 37 °C. La visualización del producto digerido se realizó en un gel de agarosa al 1% con marcador de 1 Kb y tinción SYBR® Safe.

Se diseñaron cebadores específicos para la secuenciación del ADNc, mediante las herramientas bioinformáticas indicadas anteriormente. Los cebadores utilizados se recogen en la Tabla 9. Para secuenciar el ADN plasmídico se emplearon la mezcla de reacción y ciclos de temperatura estándar.

Tabla 9. Cebadores utilizados para secuenciar el ADNc de *CLCN1*.

Cebador	Secuencia cebador (5'→3')	T _m (°C)	pb	% GC
rCLCN1 1F	GCGCCCTCTTCTGCCACCTC	65,5	20	70,0
rCLCN1 1Fbis	AGGCTGTTGGCTCTGGAAT	58,9	19	52,6
rCLCN1 1B	TTGTTCCACACTGCCAGCAC	61,3	20	55,0
rCLCN1 1Bbis	AGGTCAAAGGGGAAATCCAT	56,3	20	45,0
rCLCN1 2F	GTGTCCGAAAGCACAAGGCC	62,1	20	60,0
rCLCN1 2B	GCCAAGGTCAGGCAAGTAGG	60,6	20	60,0
rCLCN1 3F	CCTGGCTGGAACCAGCTCAG	63,2	21	61,9
rCLCN1-3B	GGGACAGAGGGGCAGTAGTA	60,0	20	60,0
rCLCN1 3bisF	GGGAGTTGCGAACCTGCTC	63,4	20	65,0
rCLCN1 4F	CACTGCTTGCTGGGCAGAGC	64,3	20	65,0
rCLCN1 4B	AGGAGATGGCACAGGGGTCT	62,4	20	60,0

Temperatura de fusión (T_m, del inglés *melting temperature*). Cebador directo (F). Cebador reverso (R). Contenido de GC (%GC). Tamaño en pares de bases (pb).

Una vez secuenciados y seleccionados los clones positivos para cada mutación deseada se procedió a una última transformación de células competentes con el fin de aislar y purificar una cantidad de ADN plasmídico suficiente para su posterior transfección (3-5µg).

Se transformaron 50 µL de células competentes *E. coli* DH5α con 2 ng de pcDNA3-CLCN1. Procedimos con el choque térmico como se ha explicado anteriormente. Añadimos 5 volúmenes en este caso de LB y se sembraron en placa de agar LB-Ampicilina. Se seleccionaron clones para crecer en cultivos de 25 mL del LB:A. Los cultivos se dejaron crecer 12 horas con objeto de obtener las bacterias en fase de crecimiento exponencial. Se centrifugaron los cultivos durante 10 minutos a 3300 rpm. El sedimento resultante fue resuspendido y sometido al proceso de purificación del ADN plasmídico indicado anteriormente. Las concentraciones resultantes y ratio de pureza del ADN extraído fueron medidos en espectrofotómetro, tal como fue indicado anteriormente.

3.4. Expresión del gen silvestre y de los genes mutantes en células HEK293

Para llevar a cabo el trabajo de expresión del gen silvestre y de los genes mutantes y los registros iónicos se contó con la colaboración de los doctores Francisco Barros y Pilar de la Peña del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Oviedo.

Para el análisis funcional de los genes mutados se utilizó la expresión heteróloga en células humanas renales embrionarias (HEK293). En este sistema celular se analizaron los posibles efectos de las diferentes mutaciones sobre varios aspectos funcionales del canal, como la magnitud de la corriente que transporta, las alteraciones de sus características de apertura y cierre, su posible modulación o la eficiencia de su expresión en la superficie celular.

Las células HEK293 fueron cultivadas y transfectadas con 3-5 μ g de ADNc plasmídico conteniendo los diferentes genes mutantes y silvestre para su expresión transitoria, según se describe en la referencia de Miranda y col⁵⁹.

Para ello se cultivaron las células a 37 °C en atmósfera húmeda de 95% aire y 5% CO₂ y se sembraron en placas de 35mm de diámetro para cultivo tisular con cubreobjeto de cristal tratado con poli-L-lisina. El medio de cultivo estaba compuesto por medio *Eagle* modificado de Dulbecco y medio F12 de Ham, (DME/F12 1:1) suplementado con 100 U/ml penicilina, 0.1 mg/mL estreptomycin y 10% suero fetal bovino.

Las células tripsinizadas 24 horas antes de la transfección, sembradas sobre cubreobjetos tratados con poli-L-lisina fueron transfectadas de manera transitoria usando el método de polímeros catiónicos con Lipofectamine 2000 (Invitrogen). La mezcla de ADNc con Lipofectamine se incubó en medio libre de suero durante 20 minutos y posteriormente se adicionó a las placas en medio con suero sin antibióticos. La adquisición de registros iónicos se hizo 24-48h después de la transfección. Como indicador de la eficiencia de la transfección las células HEK293 se co-transfectaron con el plásmido pEGFP-N3, que codifica la proteína verde fluorescente (eGFP) en un ratio pcDNA3-CLCN1: pEGFP-N3 de 5:1.

3.5. Registros iónicos

Los registros iónicos se realizaron en célula entera según se describe en la referencia⁵⁹. Sólo se utilizaron para el registro electrofisiológico células verdes que co-expresaban eGFP. La medición de las corrientes se llevó a cabo a temperatura ambiente, en condiciones de "clamp de voltaje" con célula entera. La solución salina extracelular estándar estaba compuesta de: NaCl 137 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1 mM, glucosa 10 mM y HEPES 10 mM, ajustado a pH 7,4 con NaOH. La solución interna de la micropipeta estaba compuesta de: KCl 140 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 0,7 mM, EGTA 1,1 mM, y HEPES 10 mM, ajustado a pH 7,4 con KOH. Se usó un amplificador *patch-clamp* EPC-7 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany) para el registro de las corrientes de membrana. El estímulo y la adquisición de datos se controlaron con el

software Pulse+ PulseFit (HEKAElektronic). Las corrientes iónicas tomadas a 1 kHz fueron obtenidas usando protocolos de estimulación consistentes en pulsos de voltaje despolarizantes de diferente magnitud, tal como se indica en la figura 6:

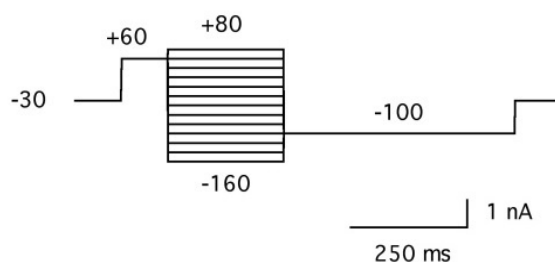


Figura 6. Protocolo de pulsos de voltaje. Desde un potencial “de mantenimiento” de -30mV (cercano al potencial de equilibrio de cloruros y al potencial de reposo), se dan pulsos de voltaje de 250 ms entre valores de + 80 a -160 mV en incrementos de 20mV previo pulso de preconditionamiento a +60 mV. El potencial de mantenimiento se aplica durante los intervalos entre cada pulso de voltaje individual. Las corrientes de cola se miden a -100 mV.

La probabilidad total de apertura (P_0) se calculó a partir de las corrientes de cola normalizadas a voltajes de -100 mV obtenidas tras la aplicación de los pulsos de voltaje indicados en la figura, desde +80 a -160 mV. Los datos obtenidos se ajustaron a una distribución de Boltzmann para obtener las curvas P_0 ⁵⁹.

Para estudiar el efecto funcional dominante negativo se realizó la co-transfección de las células HEK293 con *CLCN1* silvestre y *CLCN1* mutante (relación de DNAs 1:1) o con una cantidad equivalente de vector pcDNA3 DNA. Se comparó la densidad de corriente de cola I (pA/pF) obtenida a -100mV del canal silvestre frente al canal silvestre co-transfectado con una cantidad equivalente de ADN mutante en cada caso.

3.6. Estudio del posible efecto fundador de la mutación CLCN1: c.180+3A>T. Análisis de SNPs

Para el estudio del posible efecto fundador de la mutación c.180+3A>T, especialmente prevalente en población española⁶⁰, se analizaron 6 polimorfismos SNPs intragénicos: rs6962852, rs2272253, rs2272252, rs2272251, rs13438232 y rs56680997; todos ellos dialélicos. Los marcadores polimórficos seleccionados se eligieron en base a su informatividad ($MAF > 0.20$)⁶¹.

Para el estudio e identificación de haplotipos se utilizó el software Haploview⁶², basado principalmente en la definición de bloques de haplotipos de Gabriel y col, 2001⁶¹.

Se utilizaron datos de genotipado de estos 6 polimorfismos en individuos portadores de la mutación c.180+3A>T (incluyendo 4 individuos homocigotos para la mutación c.180+3A>T y 14 individuos heterocigotos) e individuos de población control (datos procedentes del Proyecto 1000 Genomas). Se obtuvieron datos estadísticos de calidad de los marcadores empleados a fin de determinar su idoneidad para el análisis. Se establecieron bloques de haplotipos y frecuencias poblacionales de haplotipos usando el formato de haplotipos en fase (Phased haplotypes en Haps Format).

Además, se realizó un estudio de asociación por comparación de haplotipos entre grupo de casos (portadores heterocigotos y homocigotos de la mutación c.108+3A>T) y grupo control (17 genotipos obtenidos del Proyecto 1000 Genomas de población española procedente de la península Ibérica) con la opción de formato de asociación (Linkage format).

4. RESULTADOS

4.1. Distribución de mutaciones en *CLCN1* en la cohorte de pacientes con miotonía congénita

La cohorte de pacientes de MC estudiada en esta Memoria se compone de 99 individuos, de los cuales 71 corresponden a casos índices que cumplen criterios clínicos y electromiográficos de MC (Figura 7).

Se detectaron mutaciones en el gen *CLCN1* en 32 pacientes, lo que supone un 45% de los pacientes estudiados; de los cuales 23 son mujeres (33%) y 48 hombres (67%). Con vistas a realizar consejo genético, se estudiaron 28 familiares de los casos positivos para mutaciones en *CLCN1* (progenitores y/u otros familiares de primer grado); en este grupo se incluyen tanto individuos asintomáticos como clínicamente afectados.

De los 39 casos negativos para mutaciones en *CLCN1*, 4 de ellos resultaron positivos para mutaciones en el gen *SCN4A*, aproximadamente un 6% de los casos estudiados en esta cohorte y un 10% aproximadamente de los casos negativos para mutaciones en el gen *CLCN1*.

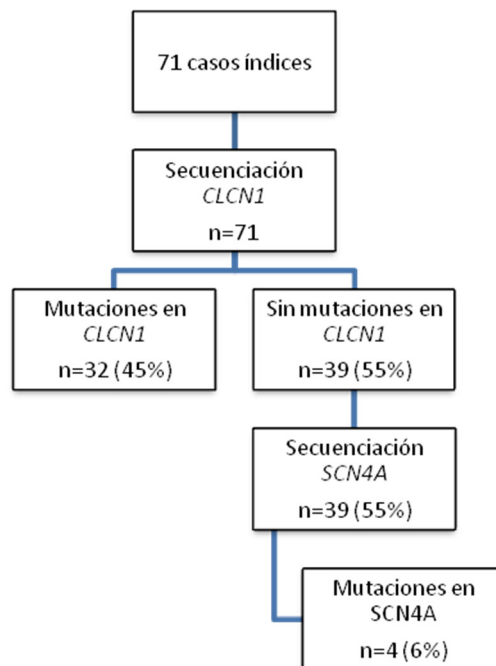


Figura 7. Diagrama mostrando los resultados del diagnóstico molecular de MC: secuenciación de genes candidatos *CLCN1* y *SCN4A*.

En 71 casos índices se detectaron 27 mutaciones diferentes distribuidas a lo largo del gen *CLCN1* (Figura 8). No se han detectado mutaciones en los exones 1, 2, 3, 9, 10, 16, 20 y 21.

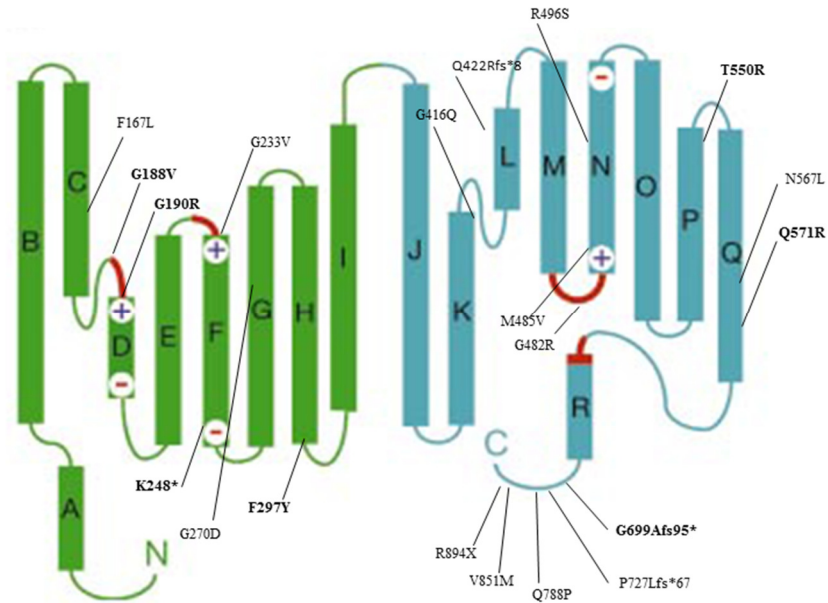


Figura 8. Estructura de CIC tomada del artículo Dutzler et al. 2002. Las α -hélices están representadas con cilindros. Las dos mitades de la subunidad están coloreadas en verde y azul y las regiones que forman el filtro de selectividad de Cl^- se representa en rojo. La carga parcial en los extremos de las hélices que participan en la unión de Cl^- se indican con el símbolo + y -. La localización aproximada de las mutaciones detectadas en la cohorte se indica en la figura. En negrita se indican las mutaciones nuevas. No se indican en el esquema las mutaciones en zonas de *splicing*.

De las 27 mutaciones diferentes detectadas en *CLCN1*, 19 mutaciones habían sido descritas previamente en la literatura científica (70%) y 8 mutaciones son caracterizadas por primera vez en este trabajo (30%): c.432-5insGCA, c.563G>T (p.Gly188Val), c.568G>A (p.Gly190Arg), c.742A>T (p.Lys248*), c.890T>A (p.Phe297Tyr), c.1649C>G (p.Thr550Arg), c.1712A>G (p.Gln571Arg) y c.2096delG (p.Gly699Alafs*95) (Tabla 10). Todas las mutaciones caracterizadas por primera vez en esta Memoria han sido incorporadas en la base de datos *Leiden Open Variation Database 3.0*⁶³.

Tabla 10. Mutaciones detectadas en *CLCN1* en la cohorte estudiada de miotonía congénita.

Mutación	Dominio	Exón/ intrón	Fenotipo	Ref.	Frec.
180+3A>T	N terminal	i1	Becker	64	7
c.302-1G>A	N terminal	i2	?	17	1
c.434-5insGCA	Hélice B	i3		Esta Memoria	2
c.501C>G; p.Phe167Leu	Hélice C	4	Becker	65	1
c.563G>T; p.Gly188Val	Hélice D (Filtro de Selectividad parte 1)	5		Esta Memoria	2
c.568G>A; p.Gly190Arg	Hélice D (Filtro de Selectividad parte 1)	5		Esta Memoria	1
c.696+1G>T	Hélice E (Filtro de Selectividad parte 2)	i5	Becker	60	1
c.698G>T; p.Gly233Val	Hélice F (Filtro de Selectividad parte 2)	6	?	60	1
c.742A>T; p.Lys248*	Hélice F	6		Esta Memoria	1
c.809G>A; p.Gly270Asp	Hélice G	7	?	60	1
c.890T>A; p.Phe297Tyr	Unión H-I	8		Esta Memoria	1
c.1167-10T>C	Hélice K	i10	Becker	17	2
c.1247G>A; p.Gly416Glu	Unión K-L	11	?	60	2
c.1262insC; p.Glu422Argfs*8	Hélice L	12	Becker	66	2
c.1444G>A; p.Gly482Arg	Unión M-N	13	Becker	66	3
c.1453A>G; p.Met485Val	Hélice N	13	Becker	66	9

c.1471+1G>A	Hélice N	i13	Becker	66	3
c.1488G>T; p.Arg496Ser	Hélice N	14	Becker	41	1
c.1649C>G; p.Thr550Arg	Hélice P	15		Esta Memoria	1
c.1701C>A; p.Asp567Lys	Hélice Q	15	Thomsen	60	3
c.1712A>G; p.Gln571Arg	Hélice Q	15		Esta Memoria	1
c.2096delG; p.Gly699Alafs*95	C terminal	17		Esta Memoria	1
c.2178delT; p.Pro727Leufs*67	C terminal	18	?	60	1
c.2284+5C>T	C terminal	i18	Becker	67	3
c.2363A>C; p.Gln788Pro	C terminal	19	?	60	1
c.2551G>A; p.Val851Met	C terminal	22	?	60	3
c.2680C>T; p.Arg894*	C terminal	23	Becker/ Thomsen	65	2

El dominio donde se localizan las mutaciones ha sido tomado de citas bibliográficas y en el caso de las mutaciones nuevas ha sido deducido a partir de la estructura de CIC-1 propuesta por Dutzler et al. 2002 y UniProt ^{68,69}. En negrita, las mutaciones nuevas. Frec: Frecuencia, número de veces que aparece la mutación en la serie de casos índice estudiados

4.2. Mutaciones nuevas en *CLCN1*

Entre las mutaciones caracterizadas por vez primera en esta Memoria se identifican 5 variantes de cambio de sentido, 1 mutación sin sentido, una delección de un nucleótido y una inserción de tres nucleótidos en zona de *splicing*.

En la Tabla 11 se recogen las características clínicas más relevantes junto con el genotipo identificado en los 9 casos en los que se detectaron las mutaciones nuevas descritas en esta Memoria. Sólo en dos de estos casos fue posible estudiar a otros miembros de la familia (familias D y G). En la figura 9 se recogen los pedigrís de ambas familias.

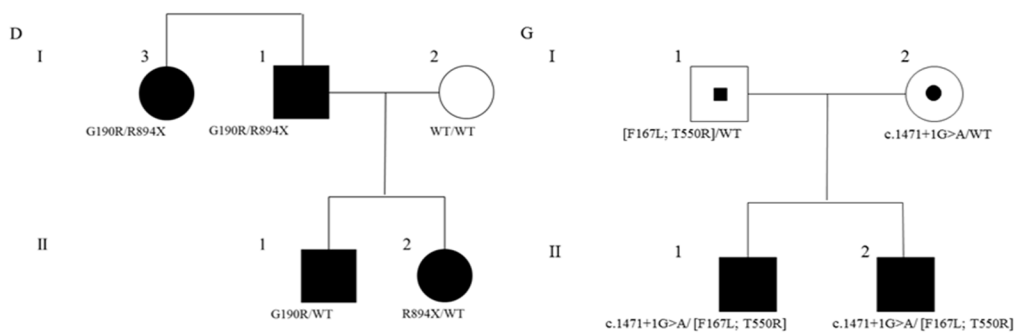


Figura 9. Árbol familiar de las familias D y G. Familia D: los hermanos II:1 y II:2 de 5 y 7 años respectivamente, ambos afectados, portan cada uno una mutación diferente heredada por vía paterna. Las mutaciones familiares están en el padre I:1 y en la tía I:3 en heterocigosis compuesta. Ambas mutaciones c.568G>A (p.Gly190Arg) y c.2680C>T (p.Arg894*) se comportan como dominantes en la descendencia. Familia G: los dos hermanos afectados II:1 y II:2 de 9 y 10 años respectivamente portan dos mutaciones de origen paterno en uno de los alelos c.[501C>G; 1649C>G] (p.[Phe167Leu; Thr550Arg]) junto con una mutación de origen materno c.147+1G>A en heterocigosis compuesta. Los progenitores son ambos asintomáticos.

Tabla 11. Genotipo y características clínicas presentes en los pacientes o familias portadoras de mutaciones nuevas descritas en esta Memoria. Datos fenotípicos estandarizados según términos HPO⁷⁰.

Paciente/ Familia	Mutación	2º Mutación	3º Mutación	Tipo de herencia en la familia	Edad de presentación	AF	Datos clínicos relevantes
A	c.432-5insGCA	-	-	Esporádico	12	No	Rigidez muscular. Fenómeno <i>warm-up</i> . Hipertrofia muscular. Sin relación con frío o calor
B	c.432-5insGCA	c.1488G>T (p.Arg496Ser)	-	Esporádico	Juvenil	No	Rigidez muscular. Fenómeno <i>warm-up</i> . EMG: descargas miotónica. Cansancio. Miotonía a la percusión. Hipertrofia muscular (proximal y gemelos)
C	c.563G>T (p.Gly188Val)	c.563G>T (p.Gly188Val)	-	-	7	-	Miotonía a la percusión. EMG: descargas miotónicas
D	c.568G>A (p.Gly190Arg)	-	-	Dominante	5	Si	Fenómeno <i>warm-up</i> . Hipertrofia muscular generalizada. No miotonía a la percusión

Paciente/ Familia	Mutación	2º Mutación	3º Mutación	Tipo de herencia en la familia	Edad de presentación	AF	Datos clínicos relevantes
E	c.742A>T (p.Lys248*)	c.1453A>G; (p.Met485Val)	-	Recesiva	Juvenil	Si	Fenómeno <i>warm-up</i> . Miotonía sensible al frío. Hipertrofia muscular generalizada. Miotonía a la percusión. EMG: descargas miotónicas
F	c.890T>A (p.Phe297Tyr)	c.1453A>G; (p.Met485Val)	-	-	-	-	Miotonía-
G	c.1649C>G (p.Thr550Arg)	c.1471+1G>A	c.501C>G (p.Phe167Leu)	Recesiva	9	Si	Miotonía clínica. EMG: descargas miotónicas.
H	c.1712A>G (p.Gln571Arg)	-	-	Dominante	Juvenil	Sí	EMG: descargas miotónicas. Fenómeno <i>warm-up</i> . Miotonía a la percusión. Debilidad muscular. Miotonía sensible al frío. Hipertrofia muscular.
I	c.2096delG (p.Gly699Alafs95*)	c.2284+5C>T	c.1453A>G (p.Met485Val)	Esporádico	Infantil	No	Miotonía a la percusión. Fenómeno <i>warm-up</i> . Ligera elevación CK. No hipertrofia muscular. EMG: fenómeno miotónico.

4.3. Predicción mediante herramientas bioinformáticas del efecto funcional de las nuevas mutaciones caracterizadas en CLCN1

Los resultados de los análisis *in silico* realizados para predecir un posible efecto a nivel funcional en la proteína de las nuevas mutaciones se detallan en la Tabla 12. Dichos predictores se basan principalmente en homología de secuencia (Mutation Assessor, SIFT), además algunos de ellos incorporan datos de estructura tridimensional (PolyPhen2) o datos de frecuencia poblacional y conservación evolutiva (MutationTaster). En el caso del predictor MutPred, la base de sus algoritmos es la secuencia proteica, teniendo en cuenta dominios estructurales y sitios funcionales. LRT usa datos de genómica comparada de 32 especies de vertebrados, usando un test de ratio de probabilidad (Likelihood Ratio Test) para identificar mutaciones deletéreas que alteran regiones aminoacídicas altamente conservadas. Por último Human Splicing Finder (HSF) calcula valores consenso de potenciales sitios de *splicing* y localiza puntos de ramificación

Según el predictor HSF, la mutación c.432-5insGCA podría alterar el mecanismo de *splicing* mediante dos efectos: la activación de un sitio críptico aceptor de *splicing* intrónico y la creación de un sitio activador del *splicing* exónico (exonic *splicing* enhancer, ESE).

Para las mutaciones de cambio de sentido/ sin sentido se encuentra coincidencia en cuanto al efecto predicho por las herramientas *in silico* para las mutaciones c.563G>T (p.Gly188Val), c.568G>A (p.Gly190Arg) y c.1649C>G (p.Thr550Arg), donde todos los predictores coinciden en un efecto patogénico de las mismas. Además, para la mutación c.563G>T (p.Gly188Val) se ha empleada la herramienta HSF, que no predice probable impacto en el *splicing* al no alterar significativamente ninguno de los motivos de *splicing*. En el caso de las mutaciones c.890T>A (p.Phe297Tyr) y c.1712A>G (p.Gln571Arg) se predice un efecto deletéreo (todos los predictores son coincidentes en un efecto patogénico excepto uno: MutationAssessor y SIFT, respectivamente). La mutación c.742A>T (p.Lys248*) se predice como benigna por algunos de los análisis *in silico* realizados (SIFT y LRT), mientras para otros representa un cambio potencialmente patogénico (MutationTaster), poniendo de manifiesto las diferencias entre las herramientas de predicción utilizadas. Por último, la herramienta MutationTaster infiere para la mutación p.Gly699Alafs*95 un carácter patogénico (es la única herramienta aplicable para casos de deleciones de un nucleótido).

Tabla 12. Resultados de análisis *in silico* realizados para las mutaciones nuevas de cambio de sentido, sin sentido, *splicing* y delección.

Mutación	SIFT	Poly Phen2	LRT	Mutation Taster	Mutation Assessor	Mut Pred	HSF
c.432-5insGCA	-	-	-	-	-	-	Potencial alteración del <i>splicing</i>
c.563G>T (p.Gly188Val)	-	P (1.00)	P	P (1.00)	H	P (0.99)	Sin impacto probable en <i>splicing</i>
c.568G>A (p.Gly190Arg)	P (0)	P (1.00)	P	P (1.00)	H	P (0.95)	NA
c.742A>T (p.Lys248*)	T (1.00)	-	N	P (1.00)	-	-	NA
c.890T>A (p.Phe297Tyr)	P (0.03)	P (0.99)	P	P (1.00)	L	P (0.88)	NA
c.1649C>G (p.Thr550Arg)	P (0.00)	P (1.00)	P	P (1.00)	H	P (0.92)	NA
c.1712A>G (p.Gln571Arg)	T (0.10)	P (0.99)	P	P (1.00)	M	P (0.59)	NA
c.2096delG (p.Gly699Alafs*95)	NA	NA	NA	P (1.00)	NA	NA	NA

Se indican los resultados para cada predictor bioinformático. P: Patogénico; T: Tolerado; N: Neutral. En el caso de Mutation Assessor, H/M es indicativo de un efecto en la función y L/N de un efecto que no altera a la función (H: Elevado, M: Medio, L: Bajo y N: Neutral). La puntuación comprendida entre 0 y 1 asignada por cada predictor se indica entre paréntesis y su significado varía en cada caso. Para el predictor SIFT, las mutaciones patogénicas toman valores ≤ 0.05 y los cambios tolerados > 0.05 . Para PolyPhen2, las mutaciones patogénicas tienen puntuaciones ≥ 0.909 . Para MutationTaster y MutPred el valor p indica la “fiabilidad” de la predicción, tal que a mayor valor mayor fiabilidad de la predicción.

NA: Herramienta no aplicable al caso de estudio.

4.4. Conservación de los residuos aminoacídicos afectados por las nuevas mutaciones de cambio de sentido en CLCN1

Se han empleado herramientas bioinformáticas basadas en alineamiento múltiple para el estudio de “conservación” de las bases mutadas en cada caso (Tabla 13). Todas las herramientas dan valores positivos para los cambios estudiados indicando la alta conservación de los residuos.

Tabla 13. Tabla de conservación..

Mutación	GERP++	PhyloP	Siphy
c.432-5insGCA	5.02	9.869	18.413
c.563G>T (p.Gly188Val)	5.02	9.869	18.413
c.568G>A (p.Gly190Arg)	3.09	4.646	10.945
c.742A>T (p.Lys248*)	4.57	6.161	13.936
c.890T>A (p.Phe297Tyr)	5.91	7.811	20.313
c.1649C>G (p.Thr550Arg)	6.04	9.331	16.576
c.1712A>G (p.Gln571Arg)	5.02	9.869	18.413

Se muestra la puntuación para cada herramienta bioinformática de conservación. La puntuación es mayor, cuanto mayor es la conservación del nucleótido mutado en cada caso, pudiendo tener valores negativos y positivos. PhyloP se basa en alineamientos múltiples en genomas de vertebrados, mientras GERP++ y SiPhy están basados en alineamientos múltiples en genomas de mamífero. El rango de puntuación para GERP++ varía entre un máximo de 6.18 a puntuaciones con valor negativo

Así mismo, en la figura 10, se puede observar la elevada conservación de los aminoácidos mutados en cada una de las mutaciones de cambio de sentido caracterizadas por vez primera en esta Memoria. Se han seleccionado para ello siete especies de vertebrados a modo de ejemplo (*Macaca mulatta*, *Mus musculus*, *Canis lupus familiaris*, *Loxodonta africana*, *Gallus gallus*, *Xenopus tropicalis* y *Danio rerio*). En todos los casos el residuo aminoacídico que cambia en el mutante es un residuo conservado, lo que apoya el posible efecto patogénico de las mutaciones detectadas. Además se ha empleado el programa ConSurf⁵⁶ para predecir adicionalmente la conservación y a su vez el posible papel estructural o funcional del aminoácido en la proteína; esta herramienta utiliza una estimación de la tasa evolutiva de los residuos aminoacídicos, así como predicciones de accesibilidad relativa a solutos. De esta manera, se predice que los residuos de lenta evolución (con valores entre 8 y 9 en una escala del 1 al 9) y “expuestos” en la estructura serán funcionales; mientras que cuando estos residuos de lenta evolución están “menos accesibles” se predicen como estructuralmente importantes.

G188V y G190R

Mutante	V R
Homo sapiens	GSGIPEMKTILRGVVLKEYLTMKAFVAKVVALTAGLGSGIPVGKE
Macaca mulatta	GSGIPEMKTILRGVVLKEYLTIKAFVAKVVALTAGLGSGIPVGKE
Mus musculus	GSGIPEMKTILRGVVLKEYLTLKAFVAKVVALTAGLGSGIPVGKE
Canis lupus familiaris	GSGIPEMKTILRGVILKEYLTLKAFVAKVVALTAGLGSGIPVGKE
Loxodonta africana	GSGIPEMKTILRGVVLKEYLTIKAFVAKVVALTAGLGSGIPVGKE
Gallus gallus	GSGIPELKTIMRGVVLKEYLTLQAFVAKVGLTAGLGSGMPVGKE
Xenopus tropicalis	GSGIPEMKTILRGVVLKEYLTLKTFIAKVIGLTCALGSGPLPGKE
Danio rerio	GSGIPEMKTILRGVVLKEYLTLKAFVAKVGLTAGLGSGMPVGKE

F297Y

Mutante	Y
Homo sapiens	VLFSIEVTSTYFAVRNYWRGFFAATFSAFVFRVLAVWNKDA
Macaca mulatta	VLFSIEVTSTYFAVRNYWRGFFAATFSAFVFRVLAVWNKDA
Mus musculus	VLFSIEVTSTYFAVRNYWRGFFAATFSAFVFRVLAVWNKDA
Canis lupus familiaris	VLFSIEVTSTYFAVRNYWRGFFAATFSAFVFRVLAVWNKDA
Loxodonta africana	VLFSIEVTSTYFAVRNYWRGFFAATFSAFVFRVLAVWNKDA
Gallus gallus	VLFSIEVTSTYFAVRNYWRGFFAATFSAFIFRVLAVWNKDA
Xenopus tropicalis	VLFSIEVTSSYFAVRNYWRGFFAATFSAFMFRVFAVWNKDA
Danio rerio	VLFSIEVTSTYFAVRNYWRGFFAATFSAFIFRVLAVWNKDA

(*) subrayada la secuencia de aminoácidos del lazo intracitoplásmico HI (aa 293 a 300)

T550R

Mutante	R
Homo sapiens	AAALTGAVSHTVSTAVICFELTGQIAHILPMMVAVILANMVAQSLQ
Macaca mulatta	AAALTGAVSHTVSTAVICFELTGQIAHILPMMVAVILANMVAQSLQ
Mus musculus	AAALTGAVSHTVSTAVICFELTGQIAHILPMMVAVILANMVAQSLQ
Canis lupus familiaris	AAALTGAVSHTVSTAVICFELTGQIAHILPMMVAVILANMVAQSLQ
Loxodonta africana	AAALTGAVSHTVSTAVICFELTGQIAHILPMMVAVILANMVAQSLQ
Gallus gallus	AAALTGAVSHTVSTAVICFELTGQISHILPMMVAVILANMVAQSLQ
Xenopus tropicalis	AAALSGAVTHTVSTAVIVFELTGQISHILPVMIAVILANAVAQSLQ
Danio rerio	AAALSGAVTHTVSTAVIVFELTGQISHILPVMIAVILANAVAQSLQ

Q571R

Mutante	R
Homo sapiens	ILPMMVAVILANMVA Q SLQPSLYDSIIQVKKLPYLPDLGWNQL
Macaca mulatta	ILPMMVAVILANMVA Q SLQPSLYDSIIQVKKLPYLPDLGWNQL
Mus musculus	ILPMMVAVILANMVA Q SLQPSLYDSIIQVKKLPYLPDLGWNQL
Canis lupus familiaris	ILPMMVAVILANMVA Q SLQPSLYDSIIQVKKLPYLPDLGWNQL
Loxodonta africana	ILPMMVAVILANMVA Q SLQPSLYDSIIQVKKLPYLPDLGWNQL
Gallus gallus	ILPMMVAVILANMVA Q SLQPSLYDSIIQVKKLPYLPDLGWNHI
Xenopus tropicalis	ILPVMIAVILANAVA Q SLQPSLYDSIIRIKKLPYLPPELGWGH
Danio rerio	ILPMMVAVILANMVA Q GLQPSLYDSIIQVKKLPYLPPELG

Figura 10. Alineamiento múltiple de secuencias proteicas de CIC-1 entre distintas especies de vertebrados. Sombreados y en negrita se muestran los residuos aminoacídicos que cambian en cada mutación de cambio de sentido. Todos ellos se localizan además en dominios conservados, en concreto en el dominio CIC-1 like⁷².

Tabla 14. Valores de conservación

Residuo	Valor de conservación	Predicción
Gly188	Conservado (9)	Funcional
Gly190	Conservado (9)	Funcional
Thr550	Conservado (9)	Funcional
Phe297	Conservado (9)	Estructural
Gln571	Conservado (8)	Funcional

Entre paréntesis se indica el valor numérico en una escala del 1 al 9, además se indica el papel potencial (funcional o estructural) de los residuos afectados por las mutaciones de cambio de sentido, datos obtenidos con el servidor ConSurf.

4.5. Mutaciones detectadas en SCN4A

En los pacientes en los que no se detectaron mutaciones en *CLCN1* (n=39), se identificaron mutaciones en el gen *SCN4A* en 4 de las familias (Tabla 15). Todas las mutaciones identificadas causantes de paramiotonía congénita estaban descritas en la literatura excepto la mutación c.4300T>C (p.Ser1434Pro), caracterizada por primera vez en esta Memoria. La mutación p.Ser1434Pro se identificó en un paciente con electromiograma e historia familiar positiva con varios miembros afectados (padre, hijas, hermanas, sobrinos). La secuenciación del exón 24 en las dos hijas (III:11, III:12) y su sobrino (III:6) demostró la segregación de la mutación con la enfermedad (Figura 11).

Tabla 15. Mutaciones detectadas en *SCN4A* en la cohorte de MC.

Mutación	Exón	Referencia	Nº familias
c.3917G>T (p.Gly1306Val)	22	73	1
c.3917G>A (p.Gly1306Ala)	22	74	1
c.4300T>C (p.Ser1434Pro)	24	Esta Memoria	1
c.4342C>T (p.Arg1448Cys)	24	42	1

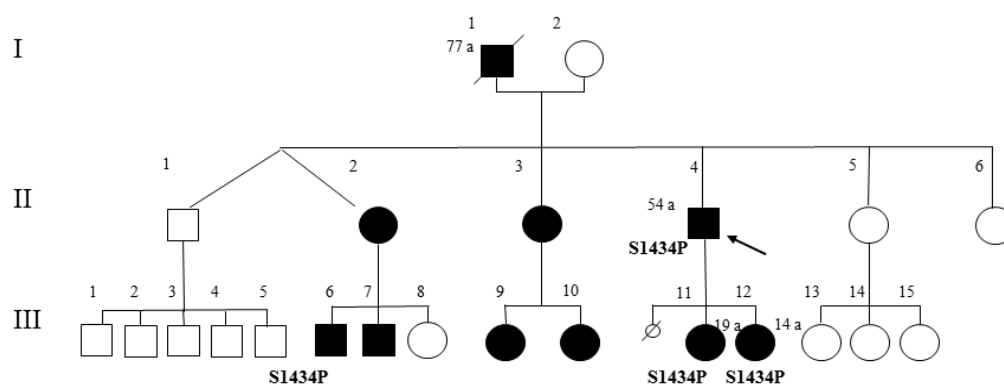


Figura 11. Pedigrí de familia portadora de mutación en *SCN4A*. Se indica la edad y genotipo de los pacientes I:1, II:4, III:6, III:11, III:12.

4.6. Predicción mediante herramientas bioinformáticas del efecto funcional de la mutación p.Ser1434Pro detectada en *SCN4A*

El estudio de posible patogenicidad de la mutación p.Ser1434Pro, evaluado con la ayuda de herramientas bioinformáticas se muestra a continuación (Tabla 16). El resultado del análisis *in silico* es congruente con un efecto patogénico de la variante exceptuando el predictor SIFT, que estima un carácter benigno o tolerado de la misma.

Tabla 16. Resultados de análisis *in silico* realizado para la mutación de cambio de sentido S1434P.

Mutación	SIFT	Poly Phen2	LRT	MutationTaster	Mutation Assessor	Mut Pred
c.4300T>C	T (0.35)	P (0.971)	P	P (1.00)	M	P (0.541)

Se indican los resultados para cada predictor bioinformático. (Ver tabla anterior (Tabla 12) de análisis *in silico* para interpretación).

4.7. Conservación del residuo aminoacídico afectado por la mutación de cambio de sentido p.Ser1434Pro en SCN4A

En cuanto a la conservación del aminoácido serina en posición 1434, se trata de un aminoácido conservado evolutivamente, como se puede observar en la figura 12, lo que apoya el posible carácter patogénico de la mutación. Así mismo, la tabla 17 muestra la conservación del nucleótido mutado y la puntuación asignada por cada una de las herramientas bioinformáticas que evalúan la conservación.

Tabla 17. Tabla de conservación.

Mutación	GERP++	PhyloP	Siphy
c.4300T>C	3.71	4.536	12.029

Se muestra la puntuación para cada herramienta bioinformática de conservación. (Para la interpretación de los valores ver notas en tabla 12).

S1434P

Mutante	P
Homo sapiens	GLAL S DLIQKYFVSPTLFRVIRLARIGRV
Macaca mulatta	GLAL S DLIQKYFVSPTLFRVIRLARIGRV
Mus musculus	GLAL S DLIQKYFVSPTLFRVIRLARIGRV
Canis lupus familiaris	GLAL S DLIQKYFVSPTLFRVIRLARIGRV
Loxodonta africana	GLAL S ELIQKYFVSPTLFRVIRLARIGRV
Gallus gallus	GIVL S DIIEKYFVSPTLFRVIRLARIGRV
Xenopus tropicalis	GIVL S DIIEKYFVSPTLFRVIRLARIGRV
Danio rerio	GLML S DIIEKYFVSPTLFRVIRLARIGRV

Figura 12. Alineamiento múltiple de secuencias proteicas de SCN4A entre distintas especies de vertebrados. Sombreado y en negrita se muestran el residuo aminoacídico mutado S1434P.

4.8. Análisis de grandes deleciones/duplicaciones en el gen CLCN1 mediante MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

Se realizó el estudio para la detección de grandes deleciones/duplicaciones en pacientes con una única mutación en CLCN1 asociada a herencia autosómica recesiva (por lo tanto insuficiente para justificar un fenotipo de MC), o bien en pacientes en los que no se detectó ninguna variante patogénica asociada a miotonía en los genes CLCN1 y SCN4A. En ninguno de los pacientes estudiados se detectaron alteraciones del tipo de grandes deleciones/duplicaciones.

Se muestra el resultado de uno de los casos a modo de ejemplo (Ver figura 13).

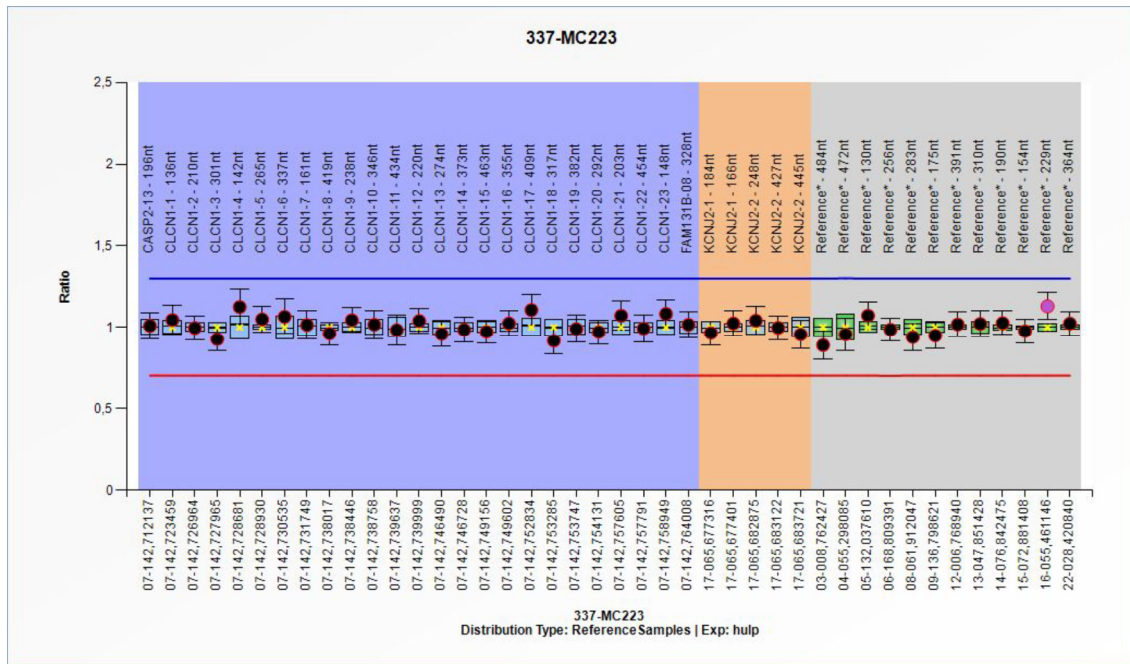


Figura 13. Gráfico obtenido mediante Coffalyser.Net. Se observa que el valor de todas las sondas se encuentra dentro del intervalo considerado como normal (0.7-1.3); donde un número normal de copias (2 copias) para cada sonda generaría un ratio igual a 1.

4.9. Resultado del análisis funcional de mutaciones

El análisis funcional electrofisiológico se realizó en algunas de las mutaciones de cambio de sentido descritas por primera vez en esta Memoria (p.Gly188Val, p.Phe297Tyr y p.Thr550Arg) o descritas con anterioridad en el artículo de Mazón et al. (p.Ala218Val, p.Gly270Asp y p.Val851Met).

En la figura 14 se muestra una típica familia de corrientes obtenidas en condiciones de "clamp de voltaje" con célula entera (ver métodos), en una célula representativa transfectada con un ADNc codificante para el CIC-1 silvestre. Las corrientes son generadas por el protocolo de pulsos mostrado en la parte de arriba de la figura. A fin de evitar un continuo flujo del anión que pudiese alterar los gradientes del mismo a lo largo del experimento, el potencial basal fue fijado a un valor (-30 mV), cercano al potencial de equilibrio del cloruro en las condiciones experimentales empleadas. Se puede observar que durante el pulso a distintos voltajes las corrientes iniciales detectadas a voltajes hiperpolarizantes decaen rápidamente y, de hecho, durante los pulsos a voltajes más negativos de -100 mV las corrientes sufren una rápida desactivación en los primeros 50 ms. La velocidad de la desactivación se incrementa con la hiperpolarización. Por otra parte, dado que los pulsos a los distintos voltajes son precedidos de un prepulso a +60 mV que sitúa los canales en el estado abierto, el nivel de corriente durante dichos pulsos muestra una saturación a potenciales despolarizantes.

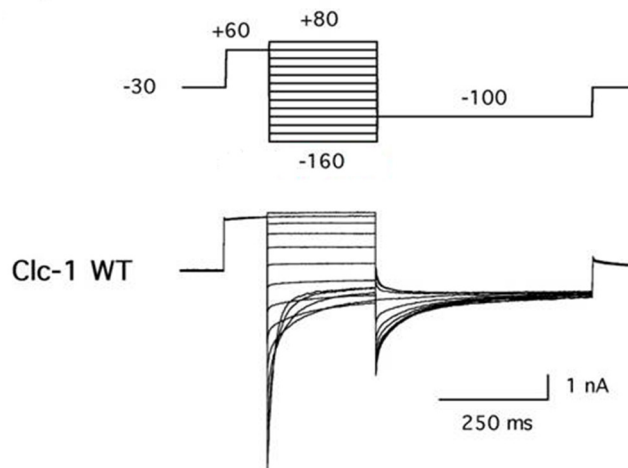


Figura 14. Análisis electrofisiológico de la expresión de Clc-1 silvestre en células HEK293. El protocolo de pulsos comienza con un primer pulso a +60 mV desde un voltaje basal de -30 mV, a fin de conseguir la apertura completa de los canales. A continuación el voltaje es situado durante 250 ms a distintos valores entre -160 y +80 mV en incrementos de 20 mV. El nivel de apertura al final de ese periodo es subsiguientemente estimado midiendo la magnitud de las corrientes de cola presentes al inicio de un último pulso a un voltaje constante de -100 mV. WT: "wild-type" o silvestre.

Como se aprecia en la Figura 15, cuando se analizaron canales homodiméricos expresados por las células como resultado de su transfección con Clc-1 mutante, sólo se detectaron corrientes con características propias de Clc-1 en células transfectadas con los mutantes p.Phe297Tyr y p.Val851Met. No ha sido posible detectar expresión funcional (ninguna corriente dependiente de voltaje) de los mutantes p.Gly188Val, p.Gly270Asp, p.Thr550Arg y p.Ala218Val en el rango de voltajes de -200 a +80 mV, para los que las únicas corrientes registradas corresponden a corrientes capacitivas o meramente óhmicas en dicho rango de voltajes. Esto sugiere una completa abolición de la actividad del canal en estos mutantes.

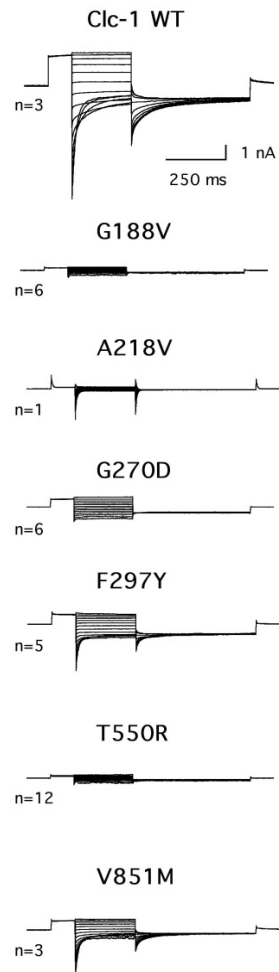


Figura 15. Caracterización electrofisiológica de canales Clc-1 mutantes expresados en células HEK293 sometidas a pulsos de voltaje entre -180/-200 y + 80 mV en intervalos de 20 mV, siguiendo el protocolo esquematizado en la Figura 13. Se indica el número de células analizadas procedentes de al menos dos transfecciones independientes en cada caso.

A continuación se muestran en la figura 16 las curvas que relacionan la probabilidad de apertura (P_0) del canal con el voltaje para las homodímeros Clc-1 silvestre, p.Phe297Tyr y p.Val851Met. Dicha probabilidad es calculada a partir de los datos de corrientes de cola normalizadas, tomadas a -100 mV después de aplicar los diferentes pulsos de voltaje. Los datos se han ajustado a una distribución de Boltzman para la obtención de dichas curvas⁷⁵.

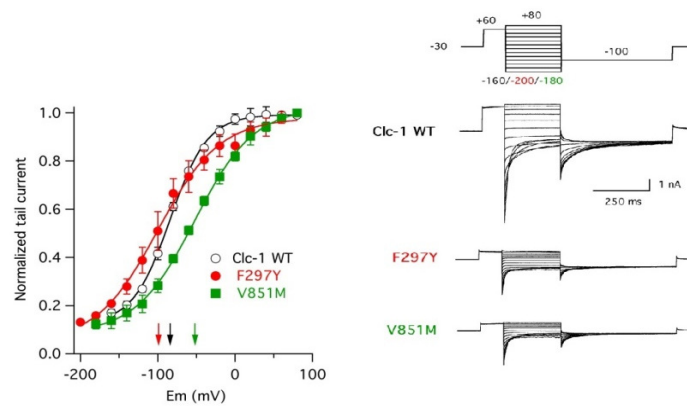


Figura 16. Dependencia de voltaje del proceso de activación (apertura) del canal, obtenida del cociente entre las corrientes correspondientes del estado estacionario y las corrientes instantáneas, como una medida de la probabilidad de apertura. Las líneas representan el ajuste de la curva de activación a la distribución de Boltzman. Las flechas indican los valores V_{50} en cada caso. A la derecha se observa el protocolo de pulsos empleado junto a las corrientes obtenidas en los experimentos de transfección con ADNc codificante para el CIC-1 silvestre y para los mutantes F297Y y V851M.

En la figura se observa que la probabilidad de apertura relativa para el canal CIC-1 silvestre alcanza un valor mínimo distinto de cero a potenciales hiperpolarizantes cercanos a -150 mV. La probabilidad de apertura se incrementa a valores de voltaje más despolarizados y alcanza el valor máximo a un voltaje de unos +60 mV, con un valor de 50% de activación (V_{50}) de aproximadamente -85 mV.

En el caso del mutante p.Phe297Tyr, se observa una dependencia de voltaje ligeramente desplazada hacia potenciales más negativos que la del CIC-1 silvestre, con una V_{50} de unos -100 mV. Es decir, la apertura de este canal no necesitaría tanto estímulo de voltaje por lo que se activaría antes ante un proceso de despolarización. Como también se observa en la figura, la curva sigmoidal está ligeramente más inclinada, es decir la pendiente es menor, lo que indicaría que la influencia del voltaje se da en un rango más amplio de valores de voltaje y que, por lo tanto, el canal responde de forma menos eficiente a los cambios de voltaje a través de la membrana puesto que para llevarlo a la "máxima probabilidad de apertura" a potenciales positivos desde que se empieza a abrir a potenciales negativos se necesita un rango más amplio de voltajes. En este caso, la máxima probabilidad de apertura, muy próxima a uno, se obtendría en torno a los +80 mV.

En la expresión del mutante p.Val851Met se obtuvieron también patrones típicos de corriente de CIC-1. En este caso la dependencia de voltaje está desplazada unos 35 mV hacia potenciales más positivos, por lo que el canal necesitaría para abrirse un estímulo o despolarización más intensa, con una V_{50} de aproximadamente -50 mV. Por lo tanto, mientras en condiciones de potencial de reposo de la célula muscular (-90 mV) el canal silvestre estaría prácticamente abierto al 50%, tan solo se alcanzaría una activación del 30% en el canal homodímero mutante p.Val851Met. En este caso la pendiente de la curva sigmoidal es similar a la del canal silvestre, alcanzándose la probabilidad máxima

de apertura a aproximadamente +80 mV al igual que en el caso del mutante p.Phe297Tyr.

Para los canales homodiméricos p.Phe297Tyr y p.Val851Met la densidad de corriente por unidad de área de membrana (pA/pF, o lo que es lo mismo, la cantidad de corriente por faradio de capacidad, la cual es directamente proporcional a la superficie de la membrana a través de la que fluye dicha corriente) es muy pequeña, aproximadamente de solo un 20-30% de la registrada en las mismas condiciones en células transfectadas con el CIC-1 silvestre, indicando un reducido nivel de expresión de estos mutantes (Figura 17).

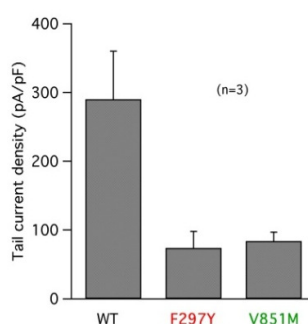


Figura 17. Densidad de corriente por unidad de área de membrana medida a -100 mV en células transfectadas con CIC-1 silvestre, F297Y y V851M.

Para estudiar el posible efecto dominante de las mutaciones, que se manifiesta como un efecto o interacción dominante negativa de la subunidad mutante sobre la silvestre en individuos heterocigotos, se llevó a cabo la co-transfección de las células HEK293 con *CLCN1* silvestre y *CLCN1* mutante (relación de DNAs 1:1) o con una cantidad equivalente de vector pcDNA3 DNA.

Los datos de densidad de corriente obtenida en cada caso están detallados en la siguiente tabla:

Tabla 18. Densidades de corriente obtenidas en los experimentos de co-transfección para cada mutante y para el silvestre (wt, del inglés *wild type*).

ADNc de trasfección	Densidad de corriente (pA/pF)
WT	254± 45
WT+ G188V	108± 28
WT+ A218V	269± 67
WT+ G270D	115± 48
WT+ V851M	125± 35
WT+ T550R	110± 35
WT+ F297Y	292± 62

Como se observa en la figura 18, en todos los casos se registraron corrientes dependientes de voltaje. Sin embargo, la densidad de corriente obtenida en estos experimentos de co-transfección (silvestre + mutante) para p.Gly188Val, p.Gly270Asp, p.Thr550Arg y p.Val581Met aparece disminuida como resultado de un efecto dominante negativo débil (reducción cercana al 50%) sobre la subunidad silvestre, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

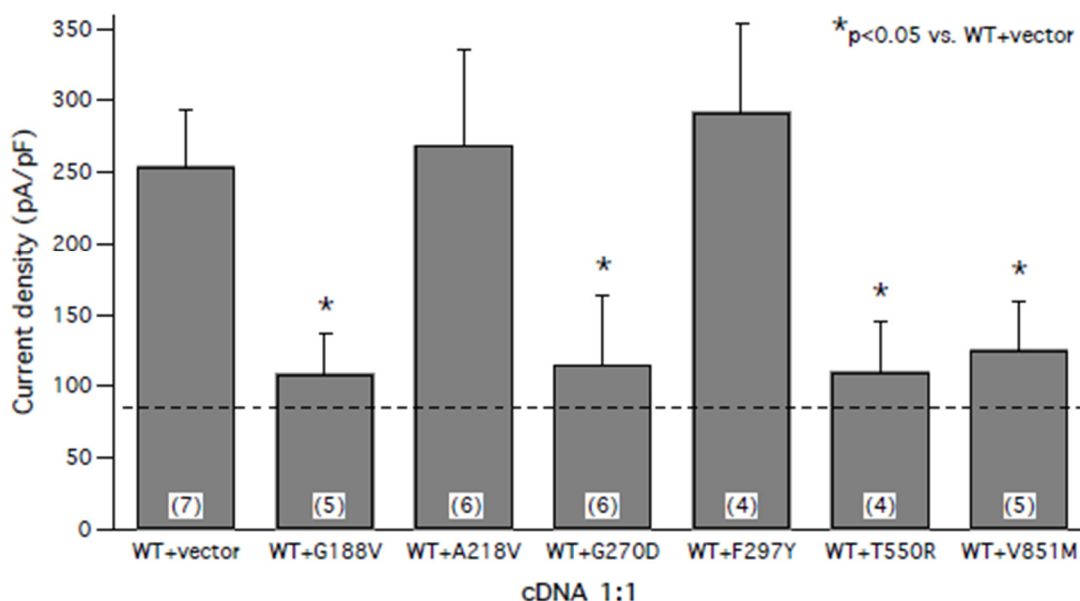


Figura 18. Comparación cuantitativa de la densidad de corriente de cola medida a -100 mV para el canal silvestre (wt + vector) y para el canal silvestre co-transfectado con una cantidad equivalente de ADN de los mutantes G188V, A218V, G270D, F297Y, T550R y V851M. El número de células estudiadas se indica entre paréntesis. Para la evaluación estadística de los datos se empleó el test t de Student, tomando como significativo el valor $p < 0.05$. Con los mutantes G188V, G270D, T550R y V851M se obtienen diferencias significativas respecto a las células transfectadas únicamente con canal silvestre. La línea de puntos indica el umbral de 33% de densidad de corriente respecto al canal silvestre y representaría el nivel de corriente esperado para un efecto dominante negativo del canal mutado, en el cual sólo los homodímeros que expresasen el canal silvestre retendrían actividad.

No obstante, esta débil reducción de la conductancia probablemente sea insuficiente para causar síntomas clínicos de MC en estado de heterocigosis. Así, la reducción en torno al 50% de la conductancia en experimentos de co-transfección (CIC-1 silvestre: CIC-1 mutante) es compatible con un comportamiento recesivo de estas mutaciones^{41,66,76,77}. Se espera que las mutaciones puramente dominantes den lugar a una reducción del 75-80% de la conductancia que coincidiría con la reducción propuesta del 80% necesaria para causar miotonía⁵. En ninguno de los casos aquí analizados se ha detectado una densidad de corriente inferior al 30% respecto del canal silvestre, por lo que no se llegaría al umbral, propuesto por algunos autores, para las mutaciones dominantes⁷⁸. El efecto dominante negativo débil de dichas mutaciones puede sin

embargo dar lugar a descargas miotónicas en la exploración electromiográfica de los pacientes, pero serían insuficientes para causar los síntomas típicos de la enfermedad.

En el caso de las mutaciones p.Ala218Val y p.Phe297Tyr se obtienen densidades de corrientes indistinguibles de las obtenidas con el canal silvestre en las condiciones de voltaje empleadas experimentalmente, por lo que se trataría de mutaciones puramente recesivas que no tendrían influencia sobre la subunidad silvestre.

4.10. Efecto fundador:

Para abordar el estudio de un probable efecto fundador de la variante patogénica c.180+3 A>T, frecuente en población española, se utilizó el programa Haploview para estudio de haplotipos. Se estudiaron 6 polimorfismos informativos localizados a lo largo del gen *CLCN1*: rs6962852, rs2272253, rs2272252, rs2272251, rs13438232 y rs56680997. Estos 6 marcadores polimórficos se estudiaron en los pacientes de la cohorte portadores de la variante patogénica c.180+3 A>T tanto en estado de homocigosis (4 casos, ver figura 19) como de heterocigosis compuesta (14 casos). En la tabla 19 se muestra el código dbSNP para cada polimorfismo junto con la frecuencia poblacional MAF tomada del Proyecto 1000 Genomas y específica de población española.

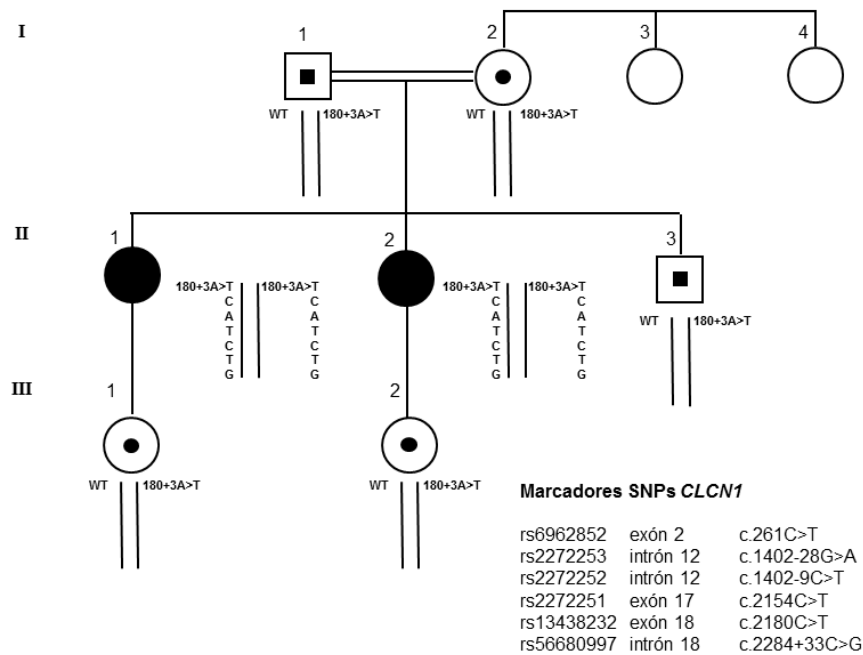


Figura 19. En la figura se representa una de las familias utilizadas para el estudio del efecto fundador. En esta familia hay dos individuos homocigotos para la mutación c.180+3A>T y homocigotos para los marcadores estudiados. Presentan uno de los haplotipos más comunes encontrados: CATCTG.

Tabla 19. Frecuencias poblacionales de los polimorfismos estudiados; datos tomados del Proyecto 1000 Genomas específico de población española procedente de la península Ibérica. Se indican las coordenadas genómicas absolutas según GRCh38.p7.

SNPs	dbSNP	Coordenadas genómicas absolutas	MAF (Población Ibérica) ⁷⁹
1	rs6962852	143319835	T: 0,3037
2	rs2272253	143339225	A: 0,4393
3	rs2272252	143339244	T: 0,4393
4	rs2272251	143345744	T: 0,4782
5	rs13438232	143346147	T: 0,4486
6	rs56680997	143346284	G: 0,4486

Usando el software Haploview⁶² se comprobó la idoneidad de los marcadores seleccionados para el estudio de haplotipos. Todos los marcadores estudiados superaron los criterios de calidad básicos analizados por el programa y por tanto fueron óptimos para realizar un estudio de haplotipos (Tabla 20).

Tabla 20. Datos de calidad de los marcadores estudiados.

N	Nombre	Posición	Obs HET	Pred HET	HW pval	%Geno	MAF	Alelo
1	rs6962852	143319835	0,235	0,291	0,822	100,0	0,176	C:T
2	rs2272253	143339225	0,235	0,484	0,074	100,0	0,412	G:A
3	rs2272252	143339244	0,235	0,484	0,074	100,0	0,412	C:T
4	rs2272251	143345744	0,353	0,498	0,395	100,0	0,471	T:C
5	rs13438232	143346147	0,235	0,484	0,074	100,0	0,412	C:T
6	rs56680997	143346284	0,235	0,484	0,074	100,0	0,412	C:G

Posición: Posición genómica en coordenadas absolutas; ObsHET: Heterocigosidad observada para el marcador; PredHET: Heterocigosidad predicha para el marcador; HWpval: p valor del equilibrio Hardy-Weinberg; %Geno: Porcentaje de genotipos presentes para este marcador; MAF: Frecuencia alélica poblacional del alelo menor en la muestra de estudio; Alelos: Alelo mayor y menor para el marcador.

El estudio de ligamiento, basado en la definición de bloques de Gabriel y col., 2002, reveló un bloque haplotípico formado por los polimorfismos 2, 3, 4, 5 y 6 en los que se asume un fuerte desequilibrio de ligamiento y un porcentaje menor del 5% de eventos de recombinación entre pares de SNPs informativos⁶¹; además, para considerar que los marcadores forman un bloque se debe cumplir la premisa de que el 95% de los marcadores estén en situación de fuerte ligamiento. Es decir, se asume que la región formada por los SNPs rs2272253, rs2272252, rs2272251, rs13438232 y rs56680997 ha sido heredada sin que haya habido fenómenos de recombinación histórica sustanciales. En este bloque de 7 kb aproximadamente se calcula una D' (medida normalizada de asociación alélica) de 1.0; siendo aceptado el valor superior del intervalo de confianza $D' > 0.98$ consistente con un fenómeno de no recombinación y $D' < 0.9$ (valor superior del intervalo de confianza) con un fenómeno de recombinación histórica.

Por tanto se consideran dos bloques diferenciados: uno formado por el polimorfismo rs6962852 y otro formado por los polimorfismos rs2272253, rs2272252, rs2272251, rs13438232 y rs56680997.

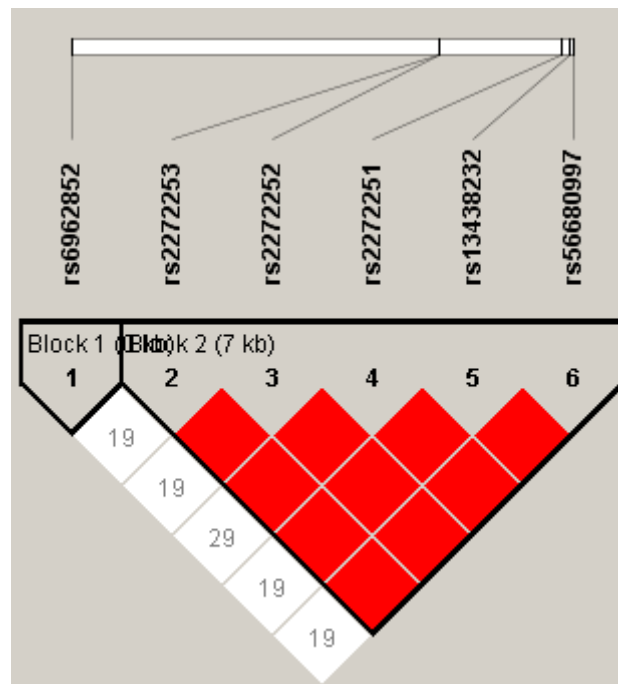


Figura 20. Esquema del patrón de desequilibrio de ligamiento generada con Haploview para los polimorfismos estudiados en el gen *CLCN1*. La asociación alélica o tasa de desequilibrio D' es representada en rojo cuando $D'=1$ y LOD (LOD score) ≥ 2 , rojo sombreado si $D' < 1$ y $LOD \geq 2$ y blanco cuando $D' < 1$ y $LOD < 2$. Se indica el valor numérico de D' cuando éste es menor a la unidad.

En el análisis de haplotipos se detectaron 8 haplotipos diferentes, siendo dos de ellos claramente mayoritarios: C-GCTCC (47% del total de haplotipos) y C-ATCTG (37%).

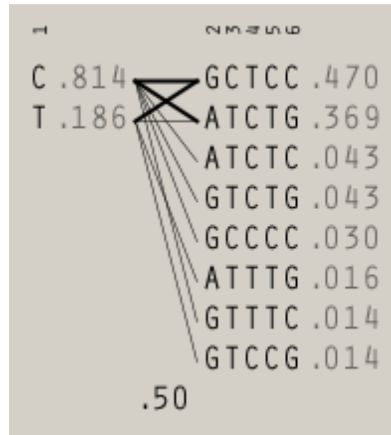


Figura 21. Haplotipos generados con el programa Haploview. Se muestran los haplotipos de los dos bloques separados junto a su frecuencia poblacional y las conexiones entre bloques; con línea gruesa indicando aquellas conexiones más frecuentes. En las zonas de unión se muestra el valor de D' multialélico, que representa el nivel de recombinación entre bloques.

Para el estudio de asociación entre haplotipos de casos y controles se utilizó como población control una serie de genotipos de individuos del Proyecto 1000 Genomas procedente de la península Ibérica. Dicho análisis de asociación no mostró diferencias significativas entre los dos grupos para los marcadores de manera individual (Tabla 21) ni para ninguno de los bloques de haplotipos (Tabla 22).

Tabla 21. Se indica la frecuencia de aparición del alelo para cada grupo (casos y controles), junto a los estadísticos chi cuadrado y p valor.

Nº	Nombre	Alelo	Frecuencias Caso, Control	Chi cuadrado	P valor
1	rs6962852	T	0.194, 0.176	0.037	0.8467
2	rs2272253	A	0.471, 0.412	0.239	0.6252
3	rs2272252	T	0.618, 0.412	2.885	0.0894
4	rs2272251	C	0.500, 0.471	0.057	0.8112
5	rs13438232	T	0.556, 0.412	1.447	0.229
6	rs56680997	G	0.472, 0.412	0.259	0.6108

Tabla 22. Estudio de asociación de haplotipos.

Bloque	Haplotipo	Freq.	Frecuencias Caso, Control	Chi cuadrado	P Valor
1	C	0,814	0,806; 0,824	0,037	0,8467
	T	0,186	0,194; 0,176	0,037	0,8467
2	GCTCC	0,470	0,415; 0,529	0,914	0,3389
	ATCTG	0,369	0,330; 0,411	0,501	0,479
	ATCTC	0,043	0,083; 0,000	2,96	0,0853
	GTCTG	0,043	0,083; 0,000	2,96	0,0853
	GCCCC	0,030	0,002; 0,059	2,007	0,1566
	ATTTG	0,016	0,031; 0,000	1,052	0,3051
	GTTTC	0,014	0,028; 0,000	0,958	0,3277
	GTCCG	0,014	0,028; 0,000	0,958	0,3277

Se representan los haplotipos divididos en bloque 1 y bloque 2 junto a la frecuencia poblacional, además de las frecuencias diferenciadas para el grupo de casos y controles. Se indican los valores estadísticos de Chi cuadrado y p valor

Por lo tanto, se observan diferentes haplotipos asociados a la variante patogénica c.180+3A>T y en ningún caso se identifica un marcador o bloque de marcadores asociados al alelo mutado con mayor frecuencia y de una manera estadísticamente significativa.

5. DISCUSIÓN:

En esta Memoria se estudia a nivel genético la serie de pacientes afectos de MC más extensa descrita en población española; compuesta de 71 casos índice y familiares, alcanzando un total de 99 individuos. El diagnóstico genético de estos pacientes se llevó a cabo mediante el análisis de variantes en el gen *CLCN1* con técnicas de secuenciación Sanger y MLPA. También se realizó el análisis del gen *SCN4A* (secuenciación de exones seleccionados) causante de paramiotonía congénita, una enfermedad clínicamente similar a MC, con el fin de llegar a un diagnóstico diferencial de ambas enfermedades.

La proporción de casos índice diagnosticados con el algoritmo de estudio descrito anteriormente (ver métodos) fue de un 51% en total (36/71 casos), alcanzando un tasa de diagnóstico genético similar a la de otros grupos^{80,17}; en nuestra serie, el 45% de los pacientes eran portadores de variantes patogénicas en *CLCN1* y un 6% en *SCN4A*. Un abordaje similar de análisis en tándem de estos dos genes ya había sido utilizado previamente por otros grupos para mejorar el diagnósticos molecular en familias con miotonías no distróficas¹⁷. En la cohorte de 54 pacientes estudiada por Trip y col 2008, el porcentaje de pacientes con sospecha de MC y mutaciones en *CLCN1* supuso el 80% de los casos, mientras que los portadores de mutaciones en *SCN4A* alcanzaron el 20%, un resultado similar al nuestro. El análisis del gen *SCN4A* en este grupo de pacientes permitió aumentar considerablemente la tasa de detección de mutaciones y pone de manifiesto cómo las características clínicas de ambas enfermedades pueden ser muy similares. Sin embargo, aun incluyendo el análisis del gen *SCN4A* de manera rutinaria en el estudio molecular de esta enfermedad, el número de pacientes en los que no se detecta variantes patogénicas es importante. Esto podría ser debido a la no especificidad de los síntomas, a la dificultad de interpretar el significado de las variantes detectadas en el ADN, y/o a la existencia de mutaciones localizadas en zonas no analizadas (zonas intrónicas o reguladoras del gen *CLCN1* o exones no analizados de *SCN4A*).

El análisis mediante MLPA se llevó a cabo en pacientes en los que el análisis previo de *CLCN1* y *SCN4A* no reveló ninguna variante patogénica asociada a la enfermedad (o una única variante patogénica recesiva en *CLCN1*). No se detectaron grandes deleciones ni duplicaciones en ninguno de los pacientes estudiados. Raja Rayan y col³⁶, en un estudio sobre 60 pacientes encontraron que este tipo de mutaciones pueden suponer hasta el 2% de los casos, siendo una causa importante de MC recesiva. Otros grupos como el de Skalova y col. 2013⁸¹ no hallaron duplicaciones o deleciones mediante MLPA (se desconocen datos de número de pacientes analizados).

En esta cohorte se detecta una mayor proporción de hombres afectos (67% de varones frente a 33% de mujeres afectas). Se ha sugerido por algunos autores que, si bien no existe una mayor frecuencia de hombres afectados que de mujeres, los síntomas de la enfermedad sí que pueden ser más pronunciados en el género masculino⁸². Resultados similares y concordantes con una frecuencia mayor de MC en varones se han obtenido

por otros grupos^{82,83}. Es posible que ciertas hormonas puedan tener efecto en la excitabilidad muscular y en ciertas canalopatías. Por ejemplo, se han descrito cambios en la magnitud de los síntomas durante el embarazo en pacientes afectas de MC o de parálisis periódica^{22,2,84}. Incluso se han descrito casos de mujeres con variantes patogénicas en *CLCN1* que sólo desarrollan síntomas durante el embarazo⁸⁵, lo que se ha llamado fenotipo Thomsen fluctuante. Aunque los mecanismos de acción de un efecto prolongado o agudo de ciertas hormonas en la excitabilidad muscular no están establecidos por el momento, parece que altas concentraciones de progesterona y estradiol actuando sobre canales CIC-1 pueden desplazar la curva de activación del canal hacia potenciales más positivos, lo que produciría una reducción en la conductancia de cloruros a potenciales de reposo⁸⁶.

Para el análisis epidemiológico se valoraron los resultados de esta Memoria junto con los resultados de un estudio similar realizado en nuestro laboratorio sobre 48 pacientes con probable MC provenientes también de todo el territorio español; los datos de este estudio ya fueron publicados en el artículo citado en el apartado Bibliografía de esta Memoria (Mazón y col. ⁶⁰). El conjunto de todos los datos haría un total de 220 individuos entre casos índice y familiares. Teniendo en cuenta toda la cohorte de pacientes estudiada en nuestro laboratorio se identificaron 35 mutaciones diferentes distribuidas a lo largo de todo el gen *CLCN1*, reflejo de una gran heterogeneidad genética (Tabla 22).

Tabla 22. Mutaciones detectadas en *CLCN1* en la cohorte estudiada de MC.

Mutación	Dominio	Exón	Fenotipo	Referencia	Nº familias
c.180+3A>T	N terminal	i1	Becker	64	20
c.1453A>G; p.Met485Val	Hélice N	13	Becker	66	14
c.2680C>T; p.Arg894*	C terminal	23	Becker/ Thomsen	65	5
c.501C>G; p.Phe167Leu	Hélice C	4	Becker	65	5
c.1471+1G>A	Hélice N	i13	Becker	66	4
c.2284+5C>T	C terminal	i18	Becker	67	4
c.1247G>A; p.Gly416Glu	Unión K-L	11	?	60	3
c.1488G>T; p.Arg496Ser	Hélice N	14	Becker	41	3
c.1701C>A; p.Asn567Lys	Hélice Q	15	Thomsen	60	3
c.302-1G>A	N terminal	i2	?	17	3
c.1167-10T>C	Hélice K	i10	Becker	17	3
c.1262insC; p.Glu422Argfs*8	Hélice L	12	Becker	66	2
c.1444G>A; p.Gly482Arg	Unión M-N	13	Becker	66	2
c.432-5insGCA		i3		Esta Memoria	2
c.698G>T; p.Gly233Val	Hélice F (Filtro de Selectividad parte 2)	6	Thomsen	60	2
c.904T>C; p.Tyr302His	Hélice I	8	Becker/ Thomsen	60	2
c.1261C>T; p.Arg421Cys	Unión L-M	12	?	60	2
c.2178delT; p.Pro727Leufs*67	C terminal	18	?	60	2
c.2551G>A; p.Val851Met	C terminal (CBS 2)	22	?	60	2
c.563G>T; p.Gly188Val	Filtro de Selectividad parte 1	5		Esta Memoria	1
c.689G>T; p.Gly230Val	Unión E-F (Filtro de Selectividad parte 2)	5	?	60	1
c.313C>T; p.Arg105Cys	N terminal	3	Becker	66	1
c.411C>G; p.Tyr137Asp	Hélice B	3	Becker	17	1
c.568G>A; p.Gly190Arg	Hélice D (Filtro de Selectividad parte 1)	5		Esta Memoria	1
c.653C>T; p.Ala218Val	Hélice E	5	Thomsen	60	1
c.696+1G>T	Hélice E (Filtro de Selectividad parte 2)	i5	Becker	60	1

Tabla 22. (Continuación)

Mutación	Dominio	Exón	Fenotipo	Referencia	Nºfamilias
c.742A>T; p.Lys248*	Hélice F	6		Esta Memoria	1
c.809G>A; p.Gly270Asp	Hélice G	7	?	60	1
c.890T>A; p.Phe297Tyr	Unión H-I	8		Esta Memoria	1
c.1592C>T; p.Ala531Val	Hélice O	15	Becker/ Thomsen	23	1
c.1649C>G; p.Thr550Arg	Hélice P	15		Esta Memoria	1
c.1712A>G; p.Gln571Arg	Hélice Q	15	?	Esta Memoria	1
c.1938G>A; p.Met646Ile	C terminal (CBS 1)	17	?	17	1
c.2096delG; p.Gly699Alafs*95	C terminal	17		Esta Memoria	1
c.2363A>C; p.Gln788Pro	C terminal	19	?	60	1

El dominio donde se localizan las mutaciones ha sido tomado de citas bibliográficas y en el caso de las mutaciones nuevas ha sido deducido a partir de la estructura de CIC-1 propuesta por Dutzler et al. 2002 y UniProt⁶⁹. En la última columna se indica el número de casos índice/familias portadores de la mutación en la cohorte total. Con fondo sombreado se indican las mutaciones detectadas en el estudio de los 71 casos índice de esta Memoria.

Se han detectado mutaciones a lo largo de todo el gen, excepto en el extremo N-terminal, las α -hélices J, M y R y parte del filtro de selectividad (exones 1, 2, 9, 10, 16, 20 y 21). No se identificaron regiones calientes (*hot-spot*). Brugnani y col. 2013 indicaron recientemente que los exones 4, 5 eran un posible punto caliente en una cohorte de pacientes de origen italiano; según estos autores el 37% de 106 pacientes diagnosticados, no relacionados entre sí, portaban mutaciones en esta región⁸⁰. Fialho y col. 2007 había descrito previamente el exón 8 como región *hot-spot* para mutaciones con efecto dominante⁸⁷. En nuestra cohorte se han detectado 10 pacientes con mutaciones en los exones 4 y 5 y 3 pacientes con mutaciones en el exón 8.

De las 35 mutaciones diferentes, la mayoría son de cambio de sentido (64%), seguidas de mutaciones de tipo *splicing* (19%), sin sentido (6%), pequeñas deleciones (6%) e inserciones (3%). Las mutaciones asociadas a fenotipo Thomsen son sobre todo de cambio de sentido. Las mutaciones asociadas a fenotipos Becker son mayoritariamente de cambio de sentido, seguidas por mutaciones de *splicing*, pequeñas deleciones e inserciones. La única variante patogénica sin sentido, p.Arg894*, detectada en 5 familias de esta serie, se detecta tanto en fenotipos Becker como Thomsen.

Se identificaron dos mutaciones especialmente prevalentes en población española: la variante patogénica de *splicing* c.180+3A>T asociada a herencia recesiva (identificada en 20 casos índice) y la variante patogénica de cambio de sentido c.1453A>G (p.Met485Val), también asociada a herencia recesiva (identificada en 14 casos índice).

En cuanto a las mutaciones nuevas, se detectan 5 cambios de sentido, 1 mutación sin sentido, una delección y una inserción intrónica. Dos de las mutaciones de cambio de sentido se localizan en dominios especialmente relevantes para el funcionamiento del canal, p.Gly188Val y p.Gly190Arg afectan a los residuos de glicina que forman parte del dominio altamente conservado que da lugar al filtro de selectividad de iones Cl^{-88} , además, el nucleótido guanina en posición 563 que muta a timina en el caso de p.Gly188Val es el primer nucleótido del exón 5. Las mutaciones sin sentido p.Lys248* y de cambio del marco de lectura p.Gly699Alafs*95 darían lugar a proteínas truncadas. En el primer caso, p.Lys248* generaría una proteína carente de una parte del filtro de selectividad iónica y de los dominios CBS1 y CBS2, mientras que p.Gly699Alafs*95 daría lugar a una proteína carente del dominio CBS2.

Estas mutaciones nuevas se han detectado en pacientes o familias de manera privada (“*private mutations*”), a excepción de la variante patogénica c.432-5insGCA detectada en dos casos no relacionados entre sí, apareciendo en estado de heterocigosis en uno de los casos y en heterocigosis compuesta en otro de ellos.

Entre todos los casos índices diagnosticados molecularmente se detectó un fenotipo de enfermedad de Becker en el 80% de los casos (herencia autosómica recesiva), representado mayormente por genotipos heterocigotos compuestos en un 57% de los casos. Un 30% de casos son homocigotos, mientras que en un 13% sólo se detectó una variante patogénica en heterocigosis.

En tres casos se han detectado genotipos con tres mutaciones asociadas a enfermedad de Becker: un individuo con genotipo c.501C>G(;);313C>T(;);180+3A>T; dos hermanos con genotipo c.[1471+1G>A];[501C>G;1649C>G] y un paciente con genotipo c.2284+5C>T(;);1453A>G(;);2096delG.

Los casos de enfermedad de Thomsen, (herencia autosómica dominante), están representados en menor medida en nuestra cohorte, suponiendo solamente el 20% de los casos.

Las mutaciones asociadas tanto a miotonía tipo Thomsen como Becker: p.Ala531Val y p.Arg894* se han detectado en pedigrís asociados a herencia recesiva en el caso de p.Ala531Val y en pedigrís asociados a ambos tipos de herencia en el caso de p.Arg894* (en dos familias se comporta como dominante y en tres familias como recesiva).

En esta cohorte la variante patogénica p.Ala531Val sólo se ha detectado en una familia; donde el caso índice tiene un genotipo p.[Ala531Val];[Arg894*]. El paciente, había heredado la variante patogénica p.Arg894* por vía paterna y p.Ala531Val por vía materna, su hermana también era portadora de p.Ala531Val; los padres y hermana del caso índice son asintomáticos, si bien al realizarles un EMG mostraron descargas miotónicas. Dicho fenómeno podría ser debido a una dominancia incompleta, como se verá más adelante. La variante patogénica p.Arg894* fue detectada en cuatro familias más. En dos de ellas con una herencia autosómica recesiva, formando parte de genotipos heterocigotos compuestos y en los que los familiares portadores eran asintomáticos. En otras dos familias se comporta con una herencia autosómica

dominante. Pedigrís inequívocamente dominantes y recesivos se han descrito previamente para estas dos mutaciones. Algunas de las posibles explicaciones para este fenómeno de mutaciones que se asocian a ambos tipos de herencia son: penetrancia reducida de las variantes patogénicas dominante-negativas^{89,90,91}, dominancia incompleta (individuos heterocigotos muestran un fenotipo menos grave que los homocigotos)⁹², detección incompleta de variantes patogénicas, diferencias en la expresión alélica^{91,93}, influencia del *background* genético, factores epigenéticos, u otros factores hormonales y ambientales².

Las mutaciones caracterizadas por primera vez en esta Memoria se han detectado formando parte de genotipos heterocigotos compuestos con otras mutaciones recesivas (p.Gly190Arg, p.Lys248*, c.2096delG, p.Thr550Arg, p.Phe297Tyr, p.Gln571Arg). Sin embargo, la variante patogénica p.Gly188Val ha sido detectada en homocigosis en una paciente de 7 años de origen marroquí, de padres consanguíneos. Por último, la variante patogénica c.432-5insGCA ha sido detectada en un caso en heterocigosis y en otro caso en heterocigosis compuesta como se indicó anteriormente.

Generalmente, se siguen aceptando los datos de prevalencia de la enfermedad estimados por Becker en 1977, que corresponden con 1:23000 para la forma dominante y 1:50000 para la forma recesiva, con una frecuencia de portadores para la forma recesiva de 1 en 108⁸ (dato de población alemana). No existen datos actualizados de prevalencia global de esta enfermedad. Algunos grupos han estimado datos de prevalencia en poblaciones concretas como Horga y col., que estiman una prevalencia de MC en población inglesa de 1:192300 habitantes²⁴; prevalencias mucho mayores se detectaron en países nórdicos: 1:10600 en Noruega⁶⁷ o 1:13700 en Finlandia⁹⁴.

En cuanto al modo de herencia mayoritario en la enfermedad, dominante o recesivo, existe controversia en la literatura. Según el estudio inicial de Becker, el modo de herencia dominante sería mayoritario. No obstante numerosos grupos han encontrado en sus cohortes de estudio una representación mayoritaria de fenotipos recesivos^{10,22}. En el artículo de Fialho y col. se hace una estimación de un 16% de familias de MC con mutaciones dominantes, tomando en cuenta para ello una combinación de datos procedentes de diversas cohortes publicadas^{21,66,23,67}; en el estudio de Horga y col. han encontrado sin embargo un porcentaje similar de pedigrís dominantes y recesivos de MC en familias inglesas²⁴. En la cohorte de estudio de esta Memoria se detecta una mayoría de fenotipos Becker (herencia autosómica recesiva), 80% de los casos; sólo el 20% restante presenta un fenotipo Thomsen (herencia autosómica dominante). Esto hecho podría explicarse por la mayor gravedad del fenotipo Becker, de forma que los pacientes con fenotipo Thomsen puedan ser infradiagnosticados debido a la levedad de los síntomas.

Como ya se ha dicho anteriormente en un 3.5% de los casos se detectan genotipos heterocigotos compuestos con tres mutaciones asociadas a enfermedad de Becker; solo en uno de ellos se pudo estudiar a los progenitores para discernir la disposición de estas mutaciones, encontrando las mutaciones c.[501C>G;1649C>G] en *cis* entre ellas y en *trans* con c.1471+1G>A. En esta familia, se observó que el alelo doblemente mutado,

que había sido heredado del padre del caso índice sólo producía síntomas aparentes en combinación con una tercera variante patogénica en *trans*. Tanto c.501C>G como c.1471+1G>A se comportan de manera recesiva y son patogénicas tanto en estado de homocigosis como de heterocigosis compuesta; en cuanto a c.1649C>G, según los datos electrofisiológicos de este trabajo tendría también un comportamiento recesivo (ver más adelante). Los otros dos genotipos compuestos con tres mutaciones fueron: c.501C>G(;);313C>T(;);180+3A>T y c.2284+5C>T(;);1453A>G(;);2096delG, de los cuales se desconoce la disposición *cis/trans*. Este fenómeno no usual de tres mutaciones en genotipos heterocigotos compuestos ya ha sido descrito varias veces en MC^{82,81,60,83}. Curiosamente, en tres de los ocho casos reportados en la literatura de individuos con tres mutaciones, se daba el alelo c.[501C>G;313C>T]^{83,82,81}; esto nos hace pensar que probablemente el paciente detectado en esta cohorte con genotipo c.501C>G(;);313C>T(;);180+3A>T pueda portar las mutaciones c.[501C>G;313C>T] en un alelo y c.180+3A>T en el otro.

Por otra parte, esta peculiaridad de genotipos compuestos con tres mutaciones nos indica que: 1) especialmente en MC debemos comprobar siempre que sea posible la disposición *cis/trans* de las mutaciones encontradas y 2) siempre que sea posible y especialmente en los casos en los que se detecten comportamientos anómalos de segregación es necesario el análisis completo del gen *CLCNI*, debido a la posibilidad de detectar genotipos complejos con más de dos mutaciones.

En esta cohorte se identifican algunas mutaciones especialmente prevalentes en población española, esencialmente las mutaciones c.180+3A>T (20 casos) y c.1453A>G (p.Met485Val) (14 casos), ambas asociadas a herencia recesiva. Estos datos ponen de manifiesto que, a pesar de que la enfermedad tiene una gran variabilidad de mutaciones, un número limitado de ellas podría explicar un amplio porcentaje de casos. De manera que, c.180+3A>T está presente en el 32% de los casos con variantes patogénicas en *CLCNI* de la cohorte y c.1453A>G (p.Met485Val) en un 22%. Por lo tanto, este sería un dato importante para el diseño de un algoritmo diagnóstico en los laboratorios de genética y diagnóstico molecular. La variante patogénica más frecuente detectada en esta cohorte asociada a herencia dominante c.1701C>A (p.Asn567Lys), fue mucho menos frecuente, y se detectó en cuatro casos índice.

El estudio molecular de esta cohorte ha permitido poner de manifiesto que el perfil de mutaciones en MC es distinto en la población española respecto a otros países europeos. De manera que, si bien la variante patogénica c.180+3A>T es relativamente frecuente en Italia, y se ha detectado en un 12% de pacientes italianos de MC⁸⁰, la variante patogénica c.1453A>G en cambio, no es una mutación recurrente en ninguna de las cohortes estudiadas hasta el momento (República Checa, Países Bajos, Reino Unido, Italia, Rusia y Países Nórdicos). Prácticamente en todas las otras cohortes se repiten como mutaciones frecuentes al menos dos de las tres mutaciones siguientes: c.2680C>T (p.Arg894*), c.1437_1450del (p.Pro480Hisfs*24) y c.1238T>G (p.Phe413Cys), llamando la atención que ninguna de las dos últimas se ha detectado en nuestra cohorte^{67,81,23,37,80,17}. Algunos autores han sugerido un posible efecto fundador de algunas de estas mutaciones^{92,23}. De forma similar, esto nos llevó a pensar en la posibilidad de un

efecto fundador de la variante patogénica c.180+3A>T altamente prevalente en población española o del sur de Europa. Para investigar esta posibilidad se llevó a cabo un estudio de haplotipos para discernir la presencia del posible efecto fundador de la variante patogénica c.108+3A>T en población española. El genotipado de 6 polimorfismos intragénicos del gen *CLCN1* (rs6962852, rs2272253, rs2272252, rs2272251, rs13438232 y rs56680997) de nucleótido único (SNPs) en la muestra poblacional formada por pacientes (portadores de la variante patogénica 180+3A>T, tanto en homocigosis como en heterocigosis) junto con un grupo control, nos permitió identificar los haplotipos posibles y presentes en la población. Se identificaron dos bloques haplotípicos diferenciados, el primer bloque formado por el polimorfismo 1, y un segundo bloque formado por los polimorfismos 2, 3, 4, 5 y 6; dentro de los bloques se asume que no ha habido procesos sustanciales de recombinación y por tanto estos marcadores se heredarían juntos. Se observa que existen dos haplotipos claramente mayoritarios: C-GCTCC y C-ATCTG. Ambos haplotipos están presentes tanto en el grupo de controles como de casos. Estos dos haplotipos mayoritarios se han identificado en homocigosis incluso en pacientes homocigotos para el cambio c.180+3A>T. En una siguiente aproximación al estudio del efecto fundador, se incluye un estudio de asociación caso-control de haplotipos; los dos haplotipos mayoritarios: C-GCTCC y C-ATCTG están representados por igual en el grupo de casos y controles, siendo ambos mayoritarios y sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Según estos datos, se concluye que la variante patogénica c.180+3A>T, tan prevalente en España no está asociada a un único haplotipo, como cabría esperar de un alelo común derivado de un efecto fundador. Además al estar los polimorfismos 2-6 contenidos en un único bloque, no se espera que haya habido fenómenos de recombinación en el alelo del efecto fundador. Finalmente, el estudio de asociación tampoco encuentra una representación estadísticamente significativa de ningún haplotipo entre los alelos mutados.

Según datos del Proyecto 1000 Genomas la frecuencia alélica del cambio c.180+3A>T (rs202217420) es del 0.04% para la población global, datos similares se han encontrado en otras fuentes de datos como ExAC donde la frecuencia para el cambio es de aproximadamente 0.03% tanto en población europea (incluyendo población de origen finlandés y del resto de países europeos) como en población latina y Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS>), donde se detecta esta variante patogénica en un 0.04% de los alelos de americanos de origen europeo. Nuestro grupo, ya estudió la frecuencia de este cambio en 340 individuos sanos de población española, y detectó una frecuencia del 0.3%⁶⁰; según estos datos, la frecuencia sería aproximadamente un 10% mayor en población española respecto a la población global (tomada de la base de datos Proyecto 1000 Genomas, ExAC y EVS), hecho consistente con la elevada frecuencia de esta variante patogénica en población española. Existen contradicciones no obstante en la base de datos del Proyecto 1000 Genomas en cuanto a la frecuencia del cambio rs202217420 tanto en población española de la península ibérica (0%) como en población mejicana (1.5%), frecuencia llamativamente elevada para una variante patogénica. Probablemente estos datos estén distorsionados debido al pequeño tamaño

muestral de estas sub-poblaciones (107 individuos españoles de la península y 67 individuos de Los Ángeles de origen mejicano).

Por lo tanto, a raíz de todos estos datos, si bien sí que existe una frecuencia elevada de esta variante patogénica en España e Italia, no parece ser causado por un efecto fundador de esta variante o al menos no queda demostrado a la vista de estos datos.

El estudio molecular de los pacientes en este trabajo nos ha permitido caracterizar por primera vez las siguientes mutaciones (resultados mostrados en comunicación al XXVII Congreso Nacional de la AEGH, Madrid, 10-12 de Abril 2013): c.432-5insGCA, c.563G>T (p.Gly188Val), c.568G>A (p.Gly190Arg), c.742A>T (p.Lys248*), c.890T>A (p.Phe297Tyr), c.1649C>G (p.Thr550Arg), c.1712A>G (p.Gln571Arg) y c.2096delG (p.Gly699Alafs*95). Todas las mutaciones de cambio de sentido afectan a aminoácidos altamente conservados, y con un papel funcional dentro de la proteína, según predicciones de ConSurf⁵⁶. Además se han realizado estudios bioinformáticos *in silico* que apoyan su patogenicidad. Estos cambios no han sido descritos en población control o se encuentran descritos con frecuencias extremadamente bajas, para ello se han consultado las bases de datos ExAC⁹⁵ y 1000 Genomas⁷⁹.

La mutación c.568G>A (p.Gly190Arg), con una frecuencia alélica de 0.008% rs369773321 había sido descrita previamente en pedigrís recesivos⁹⁶ y ha sido clasificada como probablemente patogénica en la base de datos HGMD. Esta variante afecta a uno de los residuos de glicina que forman parte del dominio altamente conservado que da lugar al filtro de selectividad de iones Cl⁻. En esta cohorte, se ha detectado este cambio de sentido en la familia D (Figura 9), poniendo de manifiesto un modo de herencia compatible con un efecto dominante de esta variante patogénica. Además el estudio de segregación de esta familia es particularmente interesante ya que esta variante patogénica fue heredada por vía paterna por el caso índice (II:1), siendo el padre (I:1) heterocigoto compuesto para las mutaciones c.[2680C>T];[568G>A] al igual que la tía paterna (I:3) del caso índice. Por lo tanto, la variante patogénica c.568G>A se presenta en este caso con un pedigrí dominante y recesivo en la misma familia.

La mutación c.742A>T (p.Lys248*) se detectó en un paciente con presentación juvenil de la enfermedad en heterocigosis compuesta: c.[742A>T];[1453A>G]. Curiosamente el padre del paciente (no diagnosticado) presentaba también clínica sugestiva, con una muy leve miotonía clínica, aspecto musculado, dolores musculares y EMG con patrón miopático. Generalmente, las mutaciones que dan lugar a proteínas truncadas están asociadas a miotonía con modo de herencia recesiva, de manera que se impide la dimerización del canal⁹⁷, excepto cuando se producen muy cerca del extremo C-terminal, en cuyo caso se asocian a la forma dominante de la enfermedad⁹⁸. La variante patogénica sin sentido detectada c.742A>T supone una pérdida importante del dominio CIC (desde la hélice transmembrana F en adelante), perdiendo parte del filtro de selectividad del canal además de los dominios CBS de la proteína. Curiosamente, los predictores *in silico* utilizados no son concluyentes en cuanto a la patogenicidad de la variante, indicando dos de ellos un papel tolerado o neutral para la misma (SIFT, LRT).

Esta mutación ha sido también recientemente reportada como variante patogénica con herencia recesiva asociada a fenotipo leve^{99,100}.

La mutación c.1712A>G (p.Gln571Arg) se ha identificado en heterocigosis en un paciente diagnosticado a los 13 años de edad con historia familiar positiva (madre y tío materno) y clínica clara de MC, compatible con un modo de herencia autosómico dominante a la vista de la historia familiar. Esta variante de cambio de sentido afecta a un residuo conservado, posiblemente con un papel funcional, situado en la última hélice transmembrana de la proteína (Q). Los predictores bioinformáticos se inclinan por un afecto patogénico de la misma y se trata de un cambio que nunca ha sido detectado en población control (lo que apoyaría el carácter patogénico de esta variante aparentemente dominante). No obstante, se necesitan análisis funcionales para confirmar la patogenicidad de esta variante.

La delección c.2096delG (p.Gly699Alafs*95) se detectó en un caso esporádico con presentación infantil de la enfermedad. Se trata de uno de los casos descritos anteriormente en esta Memoria con presencia de tres mutaciones: c.2284+5C>T(;);1453A>G(;);2096delG. Desafortunadamente desconocemos la disposición *cis/trans* de estas mutaciones. La variante patogénica c.2096delG, produciría una proteína truncada, previsiblemente incapaz de formar dímeros y por tanto asociada a herencia recesiva, al igual que las otras dos mutaciones que completan el genotipo de este paciente. Se trata de una proteína que estaría carente del dominio CBS2 y parte del dominio citoplasmático C-terminal, similar al caso de la variante patogénica c.2178delT (p.Pro727leufs*67), también asociada a pedigrís recesivos, que vendría a generar un codón stop en la misma posición (aminoácido 793), aunque con una alteración menor de la secuencia nucleotídica. El único predictor bioinformático aplicable a este tipo de mutaciones sugiere un carácter patogénico de la misma.

La mutación c.432-5insGCA se ha detectado en dos pedigrís de la cohorte: en un paciente heterocigoto compuesto junto a la variante patogénica c.1488G>T (p.Arg496Ser) con presentación juvenil de la enfermedad y en un paciente heterocigoto también diagnosticado a los 12 años. Este cambio se ha detectado en tres individuos en la base de datos de ExAC (frecuencia 0.0002%) y está descrito con el código rs753470655 en dbsnp. El predictor Human Splicing Finder sugiere que es muy probable que esta mutación afecte al proceso de *splicing*, concretamente generando un nuevo sitio aceptor que alteraría la longitud del exón en 3 nucleótidos. Según los datos actuales de frecuencia poblacional, el hecho de ser detectada en *trans* junto a una variante patogénica, la predicción de los estudios *in silico* y teniendo en cuenta que el fenotipo es muy específico de la enfermedad MC y de etiología monogénica, se puede decir que esta variante es probablemente patogénica según criterios del Colegio Americano de Medicina Genética y Genómica¹⁰¹. No obstante, son necesarios estudios de ARN para valorar si esta variante afecta realmente al proceso de *splicing*.

La mutación c.563G>T se detectó en homocigosis en la única paciente de origen marroquí en nuestra serie. Este cambio afecta al residuo 188, que forma parte de la secuencia de cinco nucleótidos que compone la primera parte del filtro de selectividad

del canal. El nucleótido 563 es el primero del exón 5 por lo que además de afectar a la funcionalidad del canal podría tener un efecto a nivel del proceso de *splicing*. Es de reseñar también que todas las secuencias aminoacídicas que forman parte del filtro de selectividad comienzan con una glicina. Los predictores *in silico* son coincidentes en un efecto patogénico de la variante, no así el predictor de *splicing* utilizado. La glicina 188 es además un aminoácido muy conservado. El grupo de Brugnoli y col. ya había descrito previamente el cambio p.Gly188Ala en un paciente en homocigosis⁸⁰. El ensayo funcional de este alelo mutante nos muestra una total ausencia de corriente y por tanto de expresión funcional del canal en los rangos de potencial ensayados en los estudios de transfección con CIC-1 mutante. Por otra parte, el ensayo de co-expresión junto con CIC-1 silvestre, aproximación experimental que intenta simular el estado heterocigoto, refleja un descenso de intensidad de corriente estadísticamente significativo y cercano al 60%; compatible con un comportamiento autosómico recesivo.

La mutación c.1649C>G (p.Thr550Arg) se ha detectado en la familia G. Se trata de una mutación heredada por vía paterna en el caso índice y su hermano formando parte del alelo c.[501C>G;1649C>G], en disposición *trans* con c.1471+1G>A (comentado anteriormente). Ambos hermanos sufrían una presentación juvenil de la enfermedad; diagnosticados a la edad de 9 y 10 años. La mutación, se produce en un residuo conservado formando parte de la α -hélice P. Los estudios *in silico* realizados son todos coincidentes con un efecto patogénico. En el estudio funcional, se observa una ausencia total de corriente cuando la transfección se realiza únicamente con el alelo mutado, compatible con una total abolición de la actividad del canal. El estudio de co-transfección (CIC-1 silvestre: CIC-1 mutante) pone de manifiesto un efecto dominante negativo débil sobre la subunidad salvaje, generando una densidad de corriente similar al efecto de G188V, en torno al 40% respecto a la subunidad silvestre. Este efecto es compatible con un comportamiento autosómico recesivo, tal que la disminución en la densidad de corriente en la co-transfección no es suficiente para generar miotonía; por aproximación podemos decir por tanto que la mutación en estado heterocigoto no sería suficiente para producir síntomas miotónicos (se estima que se necesita un descenso del 80% en la conductancia del canal para generar síntomas miotónicos).

Existe descrita una variante patogénica en la misma posición c.1649C>T (rs762754992), que da lugar al cambio aminoacídico p.Thr550Met (Sejersen y col., referencia no encontrada). El comportamiento funcional y modo de herencia de esta variante patogénica es controvertido; así, algunos autores refieren la asociación de esta variante patogénica a fenotipo Thomsen⁵, Thomsen leve¹² o Becker¹¹. El análisis funcional de la mutación p.Thr550Met, demostró en el estado homodimérico la activación del canal inducida en situación tanto de despolarización como de hiperpolarización. Los canales heterodiméricos mostraron un nivel de apertura dependiente de la concentración interna de $[Cl^-]$ de manera que a concentraciones bajas de $[Cl^-]_{int}$ la curva de activación está ligeramente desplazada a potenciales más positivos, reduciendo la probabilidad de apertura un 23%, mientras que apenas hay desplazamiento en la curva de activación a concentraciones altas de $[Cl^-]_{int}$ ¹⁰². Aunque

con un mutante diferente, estos resultados son distintos a los obtenidos en nuestro trabajo, en los que no se observó apertura del canal en estado homodimérico en el rango de potenciales estudiados en condiciones de alta $[Cl^-]_{int}$ y además se observa una menor conductancia en el estado heterodimérico.

La mutación c.890T>A (p.Phe297Tyr) se detectó en heterocigosis compuesta junto con c.1453A>G (p.Met485Val) en un paciente con sospecha de miotonía congénita. Los estudios *in silico* realizados son mayormente coincidentes en un efecto patogénico, aunque Mutation Assessor predice un efecto leve. El aminoácido Phe297 está conservado a nivel de los vertebrados estudiados y forma parte de la zona de unión de las α -hélices H-I, que intervienen junto con las hélices P y Q en la interfaz del canal; además, este dominio intracelular que conecta las hélices H e I interacciona con el dominio CBS2, lo que sugiere una forma estructural de regulación sobre el mecanismo de apertura lenta del canal mediante cambios conformacionales en el extremo C-terminal¹⁰³. Así mismo, se han descrito varias mutaciones puntuales en residuos localizados en la interfaz de las dos subunidades que afectan al mecanismo común de cierre/apertura¹⁰⁴. En este residuo aminoacídico ya se han descrito previamente cambios patogénicos; en concreto, la variante patogénica p.Phe297Ser, producida por el cambio c.890T>C y asociada a fenotipo Thomsen²². El estudio de las propiedades del canal p.Phe297Tyr homodimérico reveló corrientes características propias de canal CIC-1. La curva de apertura corriente-voltaje (I-V) fue muy similar al canal silvestre. Cabe destacar una pendiente menos pronunciada de la misma, lo que indica que el canal mutante es activado en un rango más amplio de voltaje. La activación V_{50} tiene lugar a potenciales ligeramente más negativos (-100 mV), es decir, el canal mutante se abriría antes en un proceso de despolarización. Si bien la influencia del voltaje es muy similar para el canal p.Phe297Tyr respecto al canal silvestre, la densidad de corriente que fluye por unidad de área de membrana es significativamente menor, lo que podría estar indicando un reducido nivel de expresión de este mutante. En los experimentos con heterodímeros se encontró sin embargo una densidad de corriente similar al canal silvestre, lo que descartaría que esta mutación tenga un efecto dominante negativo cuando se co-expresa con un alelo normal en pacientes heterocigotos. El estudio funcional de la mutación p.Phe297Ser realizado por Fialho y colaboradores mostraba sin embargo un desplazamiento hacia la derecha de la curva I-V, con un valor de V_{50} más positivo²². Además este estudio mostraba un efecto claramente dominante negativo en los estudios de co-expresión, compatible con un modo de herencia dominante de la enfermedad. Por tanto, el comportamiento de estas dos mutaciones p.Phe297Tyr y p.Phe297Ser es marcadamente diferente: p.Phe297Tyr compatible con un comportamiento recesivo, sin efecto dominante negativo y p.Phe297Ser compatible con un comportamiento dominante. Esta diferencia en el comportamiento puede deberse a las distintas propiedades físico-químicas de los aminoácidos Tyr y Ser, siendo el cambio Phe-Tyr más conservativo al tratarse de dos aminoácidos aromáticos, que sólo difieren en el grupo hidroxilo de este último¹⁰⁵. Además según la predicción de ConSurf, el aminoácido Phe297 tendría un papel estructural, función que puede verse menos

alterada en la sustitución por tirosina, pues ambos aminoácidos suelen verse alojados en núcleos proteicos hidrofóbicos poco accesibles.

La variante patogénica c.809G>A (p.Gly270Asp) ya fue publicada anteriormente por nuestro grupo⁶⁰. Esta variante patogénica se detectó en una familia con pedigrí recesivo en combinación con la variante patogénica c.180+3A>T. La paciente presentaba síntomas típicos desde la infancia (fenómeno *warm-up*, miotonía a la percusión, miotonía sensible al frío, EMG con descargas miotónicas e hipertrofia muscular). Por otra parte, esta variante afecta a un aminoácido muy conservado y tendría un efecto patogénico, según los predictores utilizados. El análisis funcional del canal homodimérico de este mutante indica una ausencia de corrientes típicas de CIC-1 en el rango de voltajes estudiados (-200 a + 80 mV). El estudio del canal heterodimérico demostró un descenso de la densidad de corriente estadísticamente significativo, reflejando cierto efecto dominante negativo de la subunidad mutante sobre el alelo silvestre; sin embargo este descenso de la intensidad de corriente es compatible con un comportamiento recesivo en consonancia con la historia familiar de la paciente. Según las bases de datos consultadas (ExAc, dbsnp, 1000 Genomas, ClinVar, Kaviar¹⁰⁶), esta variante no ha vuelto a ser detectada en pacientes con miotonía congénita ni en controles sanos.

La mutación c.2251G>A (p.Val851Met), con código rs74920552 fue descrita también por nuestro grupo, en un paciente homocigoto que presentaba síntomas desde la infancia temprana (miotonia a la percusión, debilidad muscular proximal, y descargas miotónicas en el EMG)⁶⁰. Posteriormente, se ha detectado esta mutación en otra paciente de la cohorte en estado de heterocigosis compuesta con genotipo p.[Gly482Arg];[Val851Met]; esta paciente fue diagnosticada con 23 años y presentaba hipertrofia muscular y fenómeno *warm-up*. El estudio funcional de esta mutación demuestra en el estado homodimérico un desplazamiento de la curva I-V hacia potenciales más positivos, siendo el valor de V₅₀ de aproximadamente -50 mV. Esto hace que en condiciones de potencial de reposo (-90mV) sólo se espere un 30% de activación del canal homodimérico, que necesitaría un estímulo de despolarización mayor que el canal silvestre para que tenga lugar la apertura. Además la densidad de corriente (intensidad de corriente por superficie de membrana) en células transfectadas únicamente con este mutante es de en torno al 20-30% de la registrada en células transfectadas sólo con CIC-1 nativo, compatible con una baja expresión. En el experimento de co-transfección, se observa una reducción de la densidad de corriente estadísticamente significativa cercana al 50%. Estos hechos son compatibles con un comportamiento recesivo en donde los pacientes heterocigotos no alcanzan el umbral de la reducción de la densidad de corriente suficiente para provocar síntomas miotónicos.

La variante patogénica c.653C>T (p.Ala218Val) fue previamente publicada por nuestro grupo en un caso familiar en que el caso índice era portador del genotipo heterocigoto compuesto c.[501C>G];[653C>T]. Previamente a la publicación de este estudio, se había publicado otro estudio en población española en el que detectaban la variante c.652G>A, la cual produce un cambio aminoacídico diferente en la misma posición (p.Ala218Thr)¹⁰⁷; en este caso, se presentaba un pedigrí con varios miembros afectados en

tres generaciones, lo que sugeriría un comportamiento dominante de la mutación; sin embargo, solo el caso índice y su padre, ambos sintomáticos, fueron analizados; curiosamente se encontró que la variante no segregaba con la enfermedad. El cambio p.Ala218Thr se ha descrito en población control (rs189963844) y así figura en la base de datos ExAc y 1000 Genomas con una frecuencia alélica de 0.007 y 0.002 respectivamente (no hay descritos individuos homocigotos). El análisis funcional electrofisiológico de la variante c.653C>T demostró una ausencia total de corriente en la expresión de CIC-1 mutante en los rangos de voltaje estudiados. En los estudios de co-transfección (CIC-1 nativo: CIC-1 mutante) se obtuvieron densidades de corrientes indistinguibles de las obtenidas con el canal silvestre, un comportamiento compatible con el carácter recesivo de esta mutación. Por lo tanto, aunque a priori, y con los datos actuales electrofisiológicos, la variante patogénica c.653C>T pueda parecer asociada a un modo de herencia recesivo, son necesarios otros estudios de segregación más amplios para confirmar dicha hipótesis. Además, hay que tener en cuenta que *in vivo* o en un tejido de un paciente pueden existir condiciones de expresión funcional mucho más restrictivas que en un sistema heterólogo, de hecho, ya se han descrito casos en la literatura en los que variantes patogénicas asociadas a MC no muestran alteración funcional o ésta es menor de lo esperada cuando se expresan en modelos heterólogos⁷⁵.

Finalmente, en el estudio del gen *SCN4A* (exones 9, 13, 22 y 24) se detectaron mutaciones en un 6% de los pacientes. Además se caracterizó la variante patogénica c.4300T>C (p.Ser1434Pro) en una familia con sospecha inicial de miotonía congénita. El estudio de segregación de esta variante en la familia pone de manifiesto que dicha variante co-segrega con el fenotipo en el padre (caso índice), hijas afectas y sobrino del caso índice (únicos individuos afectados estudiados por el momento). El residuo Ser1434 está conservado en vertebrados y forma parte del dominio de transporte iónico a nivel de la hélice transmembrana S3; los predictores *in silico* son en general concluyentes con un efecto patogénico.

6. CONCLUSIONES

1. En este trabajo se ha hecho un estudio genético de 71 pacientes con sospecha de padecer miotonía congénita. En el análisis epidemiológico se han incluido, además, 48 pacientes estudiados anteriormente en nuestro laboratorio. Esta es la serie más amplia de pacientes españoles con MC analizada hasta hoy.
2. El análisis molecular de los pacientes detectó variantes patogénicas en un 51% de los casos. De ellos, el 88% portaban mutaciones en *CLCN1* y un 12% resultaron portadores de mutaciones en *SCN4A*.
3. En ningún paciente se detectó la existencia de grandes deleciones o duplicaciones en el gen *CLCN1* mediante MLPA.
4. Se detectó una mayor proporción de pacientes con fenotipo Becker (80% de los casos) frente a pacientes con fenotipo Thomsen (20% de los casos). En ambos casos, la mutación mayoritaria fue de cambio de sentido.
5. En el estudio de esta cohorte de pacientes se detectaron dos variantes patogénicas especialmente prevalentes: c.180+3A>T (32% de los casos) y c.1453A>G (p.Met485Val), (22% de los casos). Por lo tanto, a pesar de que la enfermedad tiene una gran variabilidad de mutaciones, un número limitado de ellas podría explicar un amplio porcentaje de casos de miotonía congénita.
6. La elevada frecuencia de estas mutaciones en los pacientes de miotonía congénita diferencia notablemente el perfil de mutaciones de la población española del perfil de otras poblaciones europeas.
7. Se ha seleccionado un grupo de SNPs para analizar la presencia de un posible efecto fundador de la mutación c.180+3A>T. Nuestros resultados demuestran que no existe un haplotipo único asociado a esta mutación y que no hay un haplotipo significativamente mayoritario cuando se compara con un grupo de individuos de población control (no portadores de dicha variante). Por tanto, no se ha podido concluir que exista un efecto fundador de la mutación c.180+3A>T.
8. Se han identificado las siguientes nuevas variantes en el gen *CLCN1* asociadas a miotonía congénita: c.432-5insGCA, c.563G>T (p.Gly188Val), c.568G>A (p.Gly190Arg), c.742A>T (p.Lys248*), c.890T>A (p.Phe297Tyr), c.1649C>G (p.Thr550Arg), c.1712A>G (p.Gln571Arg) y c.2096delG (p.Gly699Alafs*95). Todas ellas cumplen criterios de patogenicidad siguiendo las recomendaciones actuales del Colegio Americano de Medicina Genética y Genómica.
9. Mediante el análisis funcional de los mutantes, quedó demostrado el efecto deletéreo sobre la función de las seis variantes estudiadas en esta Memoria: c.563G>T (p.Gly188Val), c.890T>A (p.Phe297Tyr), c.1649C>G

(p.Thr550Arg), c.653C>T (p.Ala218Val), c.809G>A (p.Gly270Asp) y
c.2551G>A (p.Val851Met).

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Matthews, E. *et al.* The non-dystrophic myotonias: molecular pathogenesis, diagnosis and treatment. *Brain* **133**, 9–22 (2010).
2. Suetterlin, K., Männikkö, R. & Hanna, M. G. Muscle channelopathies: recent advances in genetics, pathophysiology and therapy. *Curr. Opin. Neurol.* **27**, 583–90 (2014).
3. Johnson, J. Thomsen and myotonia congenita. *Med. Hist.* **12**, 190–4 (1968).
4. Lipicky, R. J., Bryant, S. H. & Salmon, J. H. Cable parameters, sodium, potassium, chloride, and water content, and potassium efflux in isolated external intercostal muscle of normal volunteers and patients with myotonia congenita. *J. Clin. Invest.* **50**, 2091–103 (1971).
5. Lossin, C. & George, A. L. Myotonia congenita. *Adv. Genet.* **63**, 25–55 (2008).
6. Koch, M. C. *et al.* The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* **257**, 797–800 (1992).
7. Steinmeyer, K. *et al.* Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. *Nature* **354**, 304–8 (1991).
8. Becker, P. E. Heterozygote manifestation in recessive generalized myotonia. *Hum. Genet.* **46**, 325–329 (1979).
9. Trip, J. *et al.* Redefining the clinical phenotypes of non-dystrophic myotonic syndromes. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **80**, 647–52 (2009).
10. Dunø, M. & Colding-Jørgensen, E. Myotonia Congenita. (2015). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1355/>>
11. Pusch, M. Myotonia caused by mutations in the muscle chloride channel gene CLCN1. *Hum. Mutat.* **19**, 423–34 (2002).
12. Colding-Jørgensen, E. PHENOTYPIC VARIABILITY IN MYOTONIA CONGENITA. *Muscle Nerve* **32**, 19–34 (2005).
13. Lehmann-Horn, F., Jurkat-Rott, K. & Rüdell, R. Diagnostics and therapy of muscle channelopathies--Guidelines of the Ulm Muscle Centre. *Acta Myol.* **27**, 98–113 (2008).
14. Meola, G., Sansone, V., Rotondo, G. & Mancinelli, E. Muscle biopsy and cell cultures: potential diagnostic tools in hereditary skeletal muscle channelopathies. *Eur. J. Histochem.* **47**, 17–28 (2003).
15. Mankodi, A. *et al.* Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of ClC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol. Cell* **10**, 35–44 (2002).
16. Jurkat-Rott, K., Holzherr, B., Fauler, M. & Lehmann-Horn, F. Sodium channelopathies of skeletal muscle result from gain or loss of function. *Pflügers*

- Arch. Eur. J. Physiol.* **460**, 239–48 (2010).
17. Trip, J. *et al.* In tandem analysis of CLCN1 and SCN4A greatly enhances mutation detection in families with non-dystrophic myotonia. *Eur. J. Hum. Genet.* **16**, 921–9 (2008).
 18. OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man.
 19. Sherry, S. T. *et al.* dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* **29**, 308–11 (2001).
 20. Stenson, P. D. *et al.* The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum. Genet.* **133**, 1–9 (2014).
 21. Lehmann-Horn, F. & Jurkat-Rott, K. Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol. Rev.* **79**, 1317–72 (1999).
 22. Fialho, D. *et al.* Chloride channel myotonia: exon 8 hot-spot for dominant-negative interactions. *Brain* **130**, 3265–74 (2007).
 23. Papponen, H. *et al.* Founder mutations and the high prevalence of myotonia congenita in northern Finland. *Neurology* **53**, 297–302 (1999).
 24. Horga, A. *et al.* Prevalence study of genetically defined skeletal muscle channelopathies in England. *Neurology* **80**, 1472–5 (2013).
 25. Jentsch, T. J., Friedrich, T., Schriever, A. & Yamada, H. The CLC chloride channel family. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **437**, 783–795 (1999).
 26. Jentsch, T. J., Poët, M., Fuhrmann, J. C. & Zdebik, A. A. Physiological functions of CLC Cl⁻ channels gleaned from human genetic disease and mouse models. *Annu. Rev. Physiol.* **67**, 779–807 (2005).
 27. Ptacek, L. J. & Fu, Y. H. Channelopathies: episodic disorders of the nervous system. *Epilepsia* **42 Suppl 5**, 35–43 (2001).
 28. Ludewig, U., Pusch, M. & Jentsch, T. J. Two physically distinct pores in the dimeric ClC-0 chloride channel. *Nature* **383**, 340–3 (1996).
 29. Saviane, C., Conti, F. & Pusch, M. The muscle chloride channel ClC-1 has a double-barreled appearance that is differentially affected in dominant and recessive myotonia. *J. Gen. Physiol.* **113**, 457–68 (1999).
 30. Accardi, A. & Pusch, M. Fast and slow gating relaxations in the muscle chloride channel CLC-1. *J. Gen. Physiol.* **116**, 433–44 (2000).
 31. Estévez, R. & Jentsch, T. J. CLC chloride channels: correlating structure with function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 531–9 (2002).
 32. Pusch, M., Ludewig, U., Rehfeldt, A. & Jentsch, T. J. Gating of the voltage-dependent chloride channel ClC-0 by the permeant anion. *Nature* **373**, 527–31 (1995).

33. Chen, T. Y. & Miller, C. Nonequilibrium gating and voltage dependence of the ClC-0 Cl⁻ channel. *J. Gen. Physiol.* **108**, 237–50 (1996).
34. Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T. & MacKinnon, R. X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* **415**, 287–94 (2002).
35. Cunningham, F. *et al.* Ensembl 2015. *Nucleic Acids Res.* **43**, D662–9 (2014).
36. Raja Rayan, D. L. *et al.* A new explanation for recessive myotonia congenita: exon deletions and duplications in CLCN1. *Neurology* **78**, 1953–8 (2012).
37. Papponen, H. *et al.* F413C and A531V but not R894X myotonia congenita mutations cause defective endoplasmic reticulum export of the muscle-specific chloride channel CLC-1. *Muscle Nerve* **37**, 317–25 (2008).
38. Pusch, M., Steinmeyer, K., Koch, M. C. & Jentsch, T. J. Mutations in dominant human myotonia congenita drastically alter the voltage dependence of the ClC-1 chloride channel. *Neuron* **15**, 1455–63 (1995).
39. Duffield, M., Rychkov, G., Bretag, A. & Roberts, M. Involvement of helices at the dimer interface in ClC-1 common gating. *J. Gen. Physiol.* **121**, 149–61 (2003).
40. Dunø, M. *et al.* Difference in allelic expression of the CLCN1 gene and the possible influence on the myotonia congenita phenotype. *Eur. J. Hum. Genet.* **12**, 738–43 (2004).
41. Lorenz, C., Meyer-Kleine, C., Steinmeyer, K., Koch, M. C. & Jentsch, T. J. Genomic organization of the human muscle chloride channel ClC-1 and analysis of novel mutations leading to Becker-type myotonia. *Hum. Mol. Genet.* **3**, 941–6 (1994).
42. Matthews, E. *et al.* What causes paramyotonia in the United Kingdom? Common and new SCN4A mutations revealed. *Neurology* **70**, 50–3 (2008).
43. Simkin, D. & Bendahhou, S. Skeletal muscle ion channel disorders. *Front. Pharmacol.* **2**, 63 (2011).
44. Rozen, S. & Skaletsky, H. Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers.
45. Untergasser, A. *et al.* Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* **40**, e115 (2012).
46. PrimerQuest® program, IDT. at <<https://www.idtdna.com/pages/scitools>>
47. Adzhubei, I. A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* **7**, 248–9 (2010).
48. Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M. & Seelow, D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat. Methods* **11**, 361–2 (2014).
49. Li, B. *et al.* Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics* **25**, 2744–50 (2009).

50. Chun, S. & Fay, J. C. Identification of deleterious mutations within three human genomes. *Genome Res.* **19**, 1553–1561 (2009).
51. Reva, B., Antipin, Y. & Sander, C. Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Res.* **39**, e118 (2011).
52. Desmet, F.-O. *et al.* Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* **37**, e67 (2009).
53. Davydov, E. V *et al.* Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++. *PLoS Comput. Biol.* **6**, e1001025 (2010).
54. Pollard, K. S., Hubisz, M. J., Rosenbloom, K. R. & Siepel, A. Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome Res.* **20**, 110–21 (2010).
55. Garber, M. *et al.* Identifying novel constrained elements by exploiting biased substitution patterns. *Bioinformatics* **25**, i54–62 (2009).
56. Berezin, C. *et al.* ConSeq: the identification of functionally and structurally important residues in protein sequences. *Bioinforma. Appl. NOTE* **20**, 1322–1324 (2004).
57. Schouten, J. P. *et al.* Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* **30**, e57 (2002).
58. Zheng, L., Baumann, U. & Reymond, J.-L. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res.* **32**, e115 (2004).
59. Miranda, P. *et al.* FRET with multiply labeled HERG K(+) channels as a reporter of the in vivo coarse architecture of the cytoplasmic domains. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 1681–99 (2008).
60. Mazón, M. J. *et al.* Screening for mutations in Spanish families with myotonia. Functional analysis of novel mutations in CLCN1 gene. *Neuromuscul. Disord.* **22**, 231–43 (2012).
61. Gabriel, S. B. *et al.* The Structure of Haplotype Blocks in the Human Genome. *Science (80-.)*. **296**, (2002).
62. Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J. & Daly, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**, 263–5 (2005).
63. Fokkema, I. F. A. C. *et al.* LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum. Mutat.* **32**, 557–63 (2011).
64. Sloan Brown, K. & George, A. L. Inheritance of three distinct muscle chloride channel gene (CLCN1) mutations in a single recessive myotonia congenita family. *Neurology* **48**, 542–3 (1997).
65. George, A. L. *et al.* Nonsense and missense mutations of the muscle chloride channel gene in patients with myotonia congenita. *Hum. Mol. Genet.* **3**, 2071–2 (1994).

66. Meyer-Kleine, C., Steinmeyer, K., Ricker, K., Jentsch, T. J. & Koch, M. C. Spectrum of mutations in the major human skeletal muscle chloride channel gene (CLCN1) leading to myotonia. *Am. J. Hum. Genet.* **57**, 1325–34 (1995).
67. Sun, C., Tranebjaerg, L., Torbergesen, T., Holmgren, G. & Van Ghelue, M. Spectrum of CLCN1 mutations in patients with myotonia congenita in Northern Scandinavia. *Eur. J. Hum. Genet.* **9**, 903–9 (2001).
68. UniProt Consortium, T. U. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.* **43**, D204-12 (2015).
69. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.* **43**, D204-12 (2014).
70. Köhler, S. *et al.* The Human Phenotype Ontology project: linking molecular biology and disease through phenotype data. *Nucleic Acids Res.* **42**, D966-74 (2014).
71. Landrum, M. J. *et al.* ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res.* **44**, D862-8 (2016).
72. Marchler-Bauer, A. *et al.* CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res.* **43**, D222–D226 (2015).
73. Ptáček, L. J. *et al.* Mutations in an S4 segment of the adult skeletal muscle sodium channel cause paramyotonia congenita. *Neuron* **8**, 891–7 (1992).
74. Ptáček, L. J. *et al.* Identification of a mutation in the gene causing hyperkalemic periodic paralysis. *Cell* **67**, 1021–7 (1991).
75. Simpson, B. J. *et al.* Characterization of three myotonia-associated mutations of the CLCN1 chloride channel gene via heterologous expression. *Hum. Mutat.* **24**, 185 (2004).
76. Wollnik, B., Kubisch, C., Steinmeyer, K. & Pusch, M. Identification of functionally important regions of the muscular chloride channel CIC-1 by analysis of recessive and dominant myotonic mutations. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 805–11 (1997).
77. Burge, J. A. & Hanna, M. G. Novel Insights into the Pathomechanisms of Skeletal Muscle Channelopathies. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **12**, 62–69 (2012).
78. Kubisch, C., Schmidt-Rose, T., Fontaine, B., Bretag, A. H. & Jentsch, T. J. CIC-1 chloride channel mutations in myotonia congenita: variable penetrance of mutations shifting the voltage dependence. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1753–60 (1998).
79. Auton, A. *et al.* A global reference for human genetic variation. *Nature* **526**, 68–74 (2015).
80. Brugnoli, R. *et al.* A large cohort of myotonia congenita probands: novel mutations and a high-frequency mutation region in exons 4 and 5 of the CLCN1 gene. *J. Hum. Genet.* **58**, 581–7 (2013).
81. Skálová, D. *et al.* CLCN1 Mutations in Czech Patients with Myotonia Congenita,

- In Silico Analysis of Novel and Known Mutations in the Human Dimeric Skeletal Muscle Chloride Channel. *PLoS One* **8**, e82549 (2013).
82. Brugnoli, R. *et al.* A large cohort of myotonia congenita probands: novel mutations and a high-frequency mutation region in exons 4 and 5 of the CLCN1 gene. *J. Hum. Genet.* **58**, 581–7 (2013).
 83. Veronica Tan, S. *et al.* Refined Exercise testing can aid DNA-based Diagnosis in Muscle Channelopathies. **69**, 328–340 (2011).
 84. Charles, G., Zheng, C., Lehmann-Horn, F., Jurkat-Rott, K. & Levitt, J. Characterization of hyperkalemic periodic paralysis: a survey of genetically diagnosed individuals. *J. Neurol.* **260**, 2606–13 (2013).
 85. Lacomis, D., Gonzales, J. T. & Giuliani, M. J. Fluctuating clinical myotonia and weakness from Thomsen’s disease occurring only during pregnancies. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **101**, 133–6 (1999).
 86. Burge, J. A., Hanna, M. G. & Schorge, S. NONGENOMIC ACTIONS OF PROGESTERONE AND 17 β -ESTRADIOL ON THE CHLORIDE CONDUCTANCE OF SKELETAL MUSCLE. doi:10.1002/mus.23887
 87. Venance, S. L. *et al.* The primary periodic paralyses: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Brain* **129**, 8–17 (2006).
 88. Fahlke, C., Desai, R. R., Gillani, N. & George, A. L. Residues Lining the Inner Pore Vestibule of Human Muscle Chloride Channels. *J. Biol. Chem.* **276**, 1759–1765 (2001).
 89. Mailänder, V., Heine, R., Deymeer, F. & Lehmann-Horn, F. Novel muscle chloride channel mutations and their effects on heterozygous carriers. *Am. J. Hum. Genet.* **58**, 317–24 (1996).
 90. Zhang, J. *et al.* Mutations in the human skeletal muscle chloride channel gene (CLCN1) associated with dominant and recessive myotonia congenita. *Neurology* **47**, 993–8 (1996).
 91. Plassart-Schiess, E. *et al.* Novel muscle chloride channel (CLCN1) mutations in myotonia congenita with various modes of inheritance including incomplete dominance and penetrance. *Neurology* **50**, 1176–9 (1998).
 92. Koty, P. P. *et al.* Myotonia and the muscle chloride channel: dominant mutations show variable penetrance and founder effect. *Neurology* **47**, 963–8 (1996).
 93. Dunø, M. *et al.* Difference in allelic expression of the CLCN1 gene and the possible influence on the myotonia congenita phenotype. *Eur. J. Hum. Genet.* **12**, 738–43 (2004).
 94. Baumann, P., Myllyla, V. V & Leisti, J. Myotonia congenita in northern Finland: an epidemiological and genetic study. *J. Med. Genet.* **35**, 293–296 (1998).
 95. Consortium, E. A. *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *bioRxiv* (Cold Spring Harbor Labs Journals, 2015).

96. Morrow, J. M. *et al.* Muscle MRI reveals distinct abnormalities in genetically proven non-dystrophic myotonias. *Neuromuscul. Disord.* **23**, 637–46 (2013).
97. Richardson, R. C., Tarleton, J. C., Bird, T. D. & Gospe, S. M. Truncating CLCN1 mutations in myotonia congenita: variable patterns of inheritance. *Muscle Nerve* **49**, 593–600 (2014).
98. Tang, C.-Y. & Chen, T.-Y. Physiology and pathophysiology of CLC-1: mechanisms of a chloride channel disease, myotonia. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 685328 (2011).
99. Gurgel-Giannetti, J. *et al.* Thomsen or Becker myotonia? A novel autosomal recessive nonsense mutation in the CLCN1 gene associated with a mild phenotype. *Muscle Nerve* **45**, 279–283 (2012).
100. Moreira, S. D., Barreto, R. & Roriz, J. M. Becker myotonia—a recently identified mutation in iberian descendants with apparent acetazolamide-responsive phenotype. *Muscle Nerve* **51**, 933–934 (2015).
101. Richards, S. *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **17**, 405–24 (2015).
102. Wu, F.-F. *et al.* Novel CLCN1 mutations with unique clinical and electrophysiological consequences.
103. Strange, K. Putting the pieces together: a crystal clear window into CLC anion channel regulation. *Channels (Austin)*. **5**, 101–5
104. Estévez, R., Pusch, M., Ferrer-Costa, C., Orozco, M. & Jentsch, T. J. Functional and structural conservation of CBS domains from CLC chloride channels. *J. Physiol.* **557**, 363–378 (2004).
105. Betts, M. J. & Russell, R. B. Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions.
106. Glusman, G., Caballero, J., Mauldin, D. E., Hood, L. & Roach, J. C. Kaviar: An accessible system for testing SNV novelty. *Bioinformatics* **27**, 3216–3217 (2011).
107. de Diego, C. *et al.* Novel mutations in the muscle chloride channel CLCN1 gene causing myotonia congenita in Spanish families. *J. Neurol.* **246**, 825–9 (1999).

8. ANEXO

Resultados de MLPA analizados mediante Coffalyser.Net.

