

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

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE
LOS DEFECTOS CONGÉNITOS DE GLICOSILACIÓN.
TERAPIAS ESPECÍFICAS DE MUTACIÓN**

**ANA ISABEL VEGA PAJARES
TESIS DOCTORAL
Madrid, 2009**

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

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE
LOS DEFECTOS CONGÉNITOS DE GLICOSILACIÓN.
TERAPIAS ESPECÍFICAS DE MUTACIÓN**

Tutora:

Prof. Magdalena Ugarte

Directora de tesis:

Dra. Celia Pérez-Cerdá

Directora de tesis:

Dra. Belén Pérez

**Memoria presentada por la Licenciada Ana Isabel Vega Pajares para
optar al grado de Doctor en Ciencias**

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio de la Prof. Magdalena Ugarte, Catedrática del Departamento de Biología Molecular en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” de la Universidad Autónoma de Madrid, con la ayuda de una beca concedida por el Ministerio de Sanidad y Consumo-Instituto de Salud Carlos III (2005-2007) y una beca concedida por la Asociación para el Estudio de las Metabolopatías Congénitas (2008-2009).

AGRADECIMIENTOS

No sé ni como he llegado a este momento...este momento al que he temido tanto, y que si no hubiera sido por el apoyo de la gente de este laboratorio, principalmente de la Profesora Magdalena Ugarte que, desde un principio apostó por mí, jamás hubiera llegado a él.

Quiero agradecer enormemente el apoyo incondicional de mis directoras de tesis, Celia y Belén, porque son geniales, por estar pendientes de mí, por su confianza y por la paciencia que han tenido conmigo. Gracias Celia por la cena de fraternización y por tu sentido del humor, por tu forma de contar las cosas y por creer en mí desde el principio. Gracias Belén por acordarte de mí cada momento, por seguirme las bromas, por saber que mis malos días son “sonados” y por tener en cuenta siempre mi opinión.

Gracias por ser la primera “híbrida” de este gran grupo.

A todo diagnóstico porque han vivido mis inicios. A Bego por cada ensayo de carnitina, por ser tan meticulosa, por sus consejos y simpatía. A Marisé por su familiaridad y calidez. A Pedro por su curiosidad, a Isaac por su tipo de humor y por los brownies de cada cumpleaños, a Celia “la pequeña” porque aunque lleva poco entre nosotros hemos compartido ya bastantes momentos buenos, a Paloma por su efusividad y a Fernando por las fotos de sus viajes. A Marga por compartir sus conocimientos conmigo y por cada café de las mañanas, por los periódicos diarios, por los roscones de nata y sus tartas de queso. A M^a Jesús por ser la primera en conocerme, por su amistad, por su complicidad, por cada ensayo compartido y por su sonrisa incondicional. Gracias a mis chicas, Gemi, Chari y Mary, por tantas cosas..., cuantas comidas y desayunos, por cada vez que me han ayudado sin necesidad de habérselo pedido, por cada aperitivo, por cada broma, cada risa, por animarme en los malos momentos, gracias por ser como sois.

Gracias a la gente que ya no esta en diagnóstico pero sí en mi mente, a Lorena por su franqueza, a Yoli por su originalidad y simpatía, a Julio-HFA por pensar que los peces beben.

A Carmen por enseñarnos a trabajar correctamente, por tantas charlas y penas compartidas en cultivos, gracias por tratar tan bien a mi padre.

Gracias a toda genética por aguantar mi genio. A Lourdes y a Pilar por ser tan amables y por sus buenos consejos. A Eva y Alex por su sencillez, por su paciencia y por compartir su espacio. Gracias Fátima por mis primeros clonajes y PCRs, por compartir poyata. A Rosa y Ascen por vuestra ayuda en todo momento y por vuestros consejos. A mis compañeras de genética. A M^a Angeles y Cristina que aunque ya no se encuentran en el laboratorio físicamente, han dejado su esencia entre nosotros. Gracias M^a Angeles por tu amabilidad y ternura. Gracias Cristina por tu forma de reir, por el congreso a Barcelona, por cada “intercambio de conocimiento” y por tu intento de bailar. Al resto de becarias Patri, Ana Rincón, Ana Jorge, Roci, Sandra y a la más reciente, Paula, por cada momento en el labo, cada congreso, cada

desayuno, cada comida, cada espacio y molécula de oxígeno compartido...por tantos momentos vividos. Gracias Patri por ser tan cercana, por escuchar siempre y por ser tan divertida. Gracias Ana Jorge por compartir conmigo la soledad de la mañana, gracias por cada café matutino y por cada concierto latino, gracias por saber discutir conmigo.

A Abel porque fue corto pero intenso, por cada risa compartida, cada ensayo de HRM y por seguir en contacto conmigo.

A Maja por compartir aficiones, por intentar entenderme y en especial, por presentarme a Alek.

A las secres, Ana, Juli, Eva e Isa, por su gran eficacia y estar siempre dispuestas a ayudar, por su simpatía y sus bromas.

A los bioinformáticos, a Julio por tantos momentos buenos y por los bailes compartidos. A ti Gonzalo, alias "Monzolo", por tu compañía campestre, gracias por ayudarme siempre, por escucharme y animarme, por los malos entendidos.

Gracias Aitor por tu compañía en las mañanas, por tu confianza, por ser mi amigo.

Gracias a Paz Briones y a su grupo, a Esther, por tratarme tan bien en Barcelona, por el Apo-CIII.

Quiero agradecer especialmente a mi grupo de amigos su apoyo y por animarme a no tirar nunca la toalla. A la familia Castrillo, especialmente a M^a Carmen y Javi, por ser mi segunda familia, por ayudarnos siempre. A mis amigas de siempre, Lore y Susi, que aunque nos veamos menos sé que puedo contar con ellas en cualquier momento. A mi reducido y especial grupo salsero, Ines y Alberto por su ímpetu y jovialidad, Alek por su intento fallido de mejorar mis idiomas, a Inesilla por estar siempre dispuesta. Gracias Kaveh, por ser tan buen profesor, por saber que puedo contar contigo siempre, por cada martes de reunión, por tus carcajadas, por tu carácter peculiar, por ser un amigo especial.

Y a mi familia, a quien no le puedo agradecer lo suficiente todo lo que han hecho por mi siempre. Gracias a mi hermana y a Jorge, por estar tan cerca, por nuestras excursiones, nuestras timbas, por nuestros buenos momentos compartidos, por compartir los malos también. A mi Javito, por conocerme y entenderme mejor que nadie, gracias por cuidarme tanto, por tu apoyo incondicional, por tu ternura y paciencia, gracias a sus padres Antonia y Manolo por hacerle como es. A mis padres, por el amor que me han dado siempre, por su apoyo durante todos mis estudios, por sus buenos y fuertemente marcados valores. A ti mamá por tu fortaleza, por hacer que no me rindiera nunca, por ser una madre ejemplar. A ti papá...porque aunque ya no puedas darte cuenta estarías orgulloso de mí, gracias por ser un padre tan especial, por estar siempre de buen humor, por ser siempre mi ejemplo a seguir, por ser tan comprensivo y bondadoso, por cada broma, cada juego, cada acampada, por enseñarme a pescar, por compartir siempre tu tiempo con nosotras y en especial conmigo, por ser tu preferida, gracias por ser tu hija, por ser como TÚ.

En definitiva, MUCHAS GRACIAS A TODOS.

***A mis padres,
Angel y Marta***

“Al otro lado de las nubes... hay un cielo”

Muhammad Al-Fayturi

SUMMARY

Congenital disorders of glycosylation (CDG) are a group of human genetic diseases with a broad spectrum of clinical manifestations affecting multiple organs and tissues which makes difficult the clinical diagnosis. The aim of this work has been the study of the molecular bases of these defects to find new diagnostic tools and new target and therapeutic approaches based on the genotype.

Using three serum biomarkers analyzed by isoelectric focusing (transferrin, α 1-antitrypsin and ApoCIII) and subsequent enzymatic and/or genetics approaches we have diagnosed 19 patients, 14 CDG Ia, 2 CDG Ib, 2 CDG Ie and 1 CDG Ij with mutations in the *PMM2*, *MPI*, *DPM1* and *DPGAT1* genes, respectively.

The mutational spectrum of the *PMM2* gene included 13 different allelic variants, 5 of them are novel (T118S, P184T, D209G, IVS7-9T>G and IVS3-1G>C). The most frequent mutations were R141H and T237M, both identified in 15% of the mutant chromosomes. Three mutations have been identified in the *MPI* gene, one in the *DPM1* gene and two new allelic variants (R301C and L385R) in the *DPGAT1* gene.

The serum proteomic analysis by 2-DE technology of two CDG Ia patients has revealed the differential expression of proteins involved in the immune response, inflammation, coagulation mechanism and tissue protection against oxidative stress, indicating that this technique might be useful for the diagnosis of these defects and for the identification of new therapeutic targets.

The functional analysis of *PMM2* missense mutations in a prokaryotic expression system has demonstrated that all are disease-causing and the results of PMM 2 activity have allowed the classification of these mutations in null mutations, intermediate mutations and mutations with high residual activity. Most of the patients are functional hemizygous of a null mutation and a mutation with intermediate residual activity usually associated with a moderate form of the disease or with a mutation with higher residual activity, usually associated with a milder clinical phenotype. In addition the protein stability assays allowed the identification of at least five changes (V44A, D65Y, F157S, P184T y F207S) with decreased amount of immunoreactive PMM 2 protein and decreased half life compared to wild type opening up therapeutic options by pharmacological chaperones in several patients.

The function analysis by minigenes of three nucleotide changes, IVS7-9T>G and IVS3-1G>C identified in the *PMM2* gene and IVS7-15479C>T previously described, suggest that all are disease-causing mutations. The IVS3-1G>C mutation causes skipping of exons 3 and 4 in fibroblast cell line and in the minigene expression system. The IVS7-9T>G mutation was found to be responsible for the activation of a cryptic intronic splice site in fibroblast cell line and in a hybrid minigene when cotransfected with certain SR proteins. The deep intronic change IVS7-15479C>T was found to be responsible for the activation of a pseudoexon sequence in intron 7. The use of morpholino oligonucleotides allowed the production of correctly spliced mRNA that was efficiently translated into functional and immunoreactive PMM 2 protein. The results suggest a novel mutation-specific approach for the treatment of this genetic disease for which no effective treatment is yet available, and open up therapeutic possibilities for several genetic disorders in which deep intronic changes are identified.

ABREVIATURAS

ADP:	Adenosina difosfato
AMO:	Oligonucleótido antisentido tipo morfolino (<i>Antisense Morpholino Oligonucleotide</i>)
Asn:	Asparagina
α_1-AT:	α_1 -antitripsina
Apo-CIII:	Apolipoproteína CIII
APS:	Persulfato amónico
ATP:	Adenosina trifosfato
BPS:	Secuencia de ramificación (<i>branch point sequence</i>)
BSA:	Albúmina de suero bovino
CDG:	Defectos Congénitos de Glicosilación
cDNA:	DNA complementario
CDT:	Transferrina deficiente en carbohidratos (<i>carbohydrate-deficient transferrin</i>)
CMP:	Citosina monofosfato
Cp:	Punto de corte (<i>crossing point</i>)
2-DE:	Electroforesis bidimensional
DMSO:	Dimetil sulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
dNTP:	Desoxinucleótido trifosfato
DTT:	1,4-ditio-L-treitol
DoIPP:	Dolicol pirofosfato
EDTA:	Ácido etilen-glicol-tetraacético
EJC:	Complejo de unión a exon-exon (<i>exon junction complex</i>)
EPOC:	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ESE:	Secuencia exónica activadora de <i>splicing</i> (<i>exonic splicing enhancer</i>)
FBS:	Suero fetal bovino
Gal:	Galactosa
GDP:	Guanidina difosfato
GlcNAc:	N-acetil-glucosamina
gDNA :	DNA genómico
GST:	Glutation sulfhidrilo transferasa
HEPES:	Ácido N-2-hibrixietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
3H-manosa:	Manosa tritiada
hnRNPs:	Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares
IEF:	Isoelectroenfoque
IgG:	Inmunoglobulina G
IPG:	Gradiente de pH inmovilizado
IPTG:	Isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido
IVS:	Intrón (<i>intervening sequence</i>)
Kb:	Kilobase
LB:	Medio Luria Broth
LLO:	Oligosacárido estándar (<i>lipid linked oligosaccharide</i>)
Man:	Manosa
MEM:	Medio mínimo esencial de Eagle

mRNA:	RNA mensajero
NeuAC:	N-acetil-neuramínico
NMD:	Sistema de vigilancia de mRNA (<i>nonsense mediated decay</i>)
OligodT:	Oligo de deoxitimidinas
OST:	Oligosacariltransferasa
Pb:	Par de bases
PBS:	Tampón fosfato salino
PDB:	Banco de datos de proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
Proteína SR:	Proteína reguladora de <i>splicing</i> (<i>serine-arginine protein</i>)
PI:	Punto isoeléctrico
Pm:	Peso molecular
PMI:	Fosfomanoisomerasa
PMM:	Fosfomanomutasa
PTC:	Codon de parada prematuro (<i>premature terminal codon</i>)
qRT-PCR:	Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RE:	Retículo Endoplásmico
RNA:	Ácido ribonucleico
RQ:	Cuantificación relativa (<i>relative quantity</i>)
rRNA18S:	RNA ribosómico 18S
RT-PCR:	Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa
SDS:	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
Ser:	Serina
Sia:	Ácido siálico
SNP:	Polimorfismo de único nucleótido (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
snRNPs:	Ribonucleoproteínas pequeñas nucleares
SURF:	Complejo de supervigilancia
TCEP:	Tris-2-carboxietil-fosfina
Tf:	Transferrina
Thr:	Treonina
Tris:	Tris (hidroximetil) aminometano
V_{1/2}:	Vida media
WT:	Salvaje o normal (<i>wild type</i>)

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

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Defectos Congénitos de Glicosilación (CDG)	2
1.1.1. Caracterización bioquímica.....	7
1.1.2. Bases moleculares de los CDG Ia.....	9
1.2. Análisis funcional de las variantes alélicas. Nuevas aproximaciones terapéuticas y relación genotipo-fenotipo	10
1.2.1 Mutaciones de cambio de aminoácido.....	11
1.2.2 Mutaciones que afectan al correcto procesamiento del mRNA.....	11
1.2.3 Relación genotipo-fenotipo.....	15
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAL Y MÉTODOS	20
3.1. Materiales	20
3.1.1. Reactivos y aparatos.....	20
3.1.2. Material biológico.....	21
3.1.2.1 Muestras biológicas.....	21
3.1.2.2 Cepas bacterianas.....	22
3.1.2.3 Vectores plasmídicos.....	22
3.2. Métodos	22
3.2.1. Isoelectroenfoque de glicoproteínas séricas.....	22
3.2.2. Medidas enzimáticas PMM 2 y PMI.....	23
3.2.3. Cuantificación de proteínas.....	24
3.2.4. Aislamiento de ácidos nucleicos.....	24
3.2.5. Técnicas de amplificación de DNA.....	24
3.2.5.1. Amplificación de cDNA.....	24
3.2.5.2. Amplificación de DNA genómico.....	25
3.2.6. Purificación de fragmentos de DNA.....	27
3.2.7. Secuenciación de DNA.....	27
3.2.8. Electroforesis bidimensional (2-DE) de proteínas séricas.....	28

3.2.9. Mutagénesis dirigida.....	28
3.2.10. Expresión de mutaciones <i>missense</i> en <i>E.coli</i>	29
3.2.11. Electroforesis, transferencia e inmunodetección de la PMM 2 (<i>Western blot</i>).....	30
3.2.12. Estudios de estabilidad de proteínas <i>in vitro</i>	31
3.2.13. Análisis cuantitativo de la expresión del gen <i>PMM2</i> mediante qRT-PCR.....	31
3.2.14. Clonaje en el vector pSPL3. Minigenes.....	32
3.2.15. Transfección de células primarias y establecidas.....	33
3.2.16. Soporte informático.....	34
4. RESULTADOS.....	36
4.1. Diagnóstico bioquímico y enzimático de los Defectos Congénitos de Glicosilación.....	36
4.1.1. Isoelectroenfoque (IEF) de Transferrina (Tf).....	36
4.1.2. Isoelectroenfoque de α_1 -Antitripsina.....	38
4.1.3. Isoelectroenfoque de Apolipoproteína CIII.....	39
4.1.4. Medida de las actividades PMM 2 y PMI.....	39
4.2. Caracterización molecular de los pacientes.....	41
4.2.1. Estudio genético de los pacientes con Defecto Congénito de Glicosilación Ia: análisis del gen <i>PMM2</i>	41
4.2.2. Estudio genético de los pacientes con Defecto Congénito de Glicosilación Ib: análisis del gen <i>MPI</i>	46
4.2.3. Estudio genético de los pacientes con Defecto Congénito de Glicosilación Ix: análisis de los genes <i>ALG6</i> (CDG Ic), <i>DPM1</i> (CDG Ie) y <i>DPGAT1</i> (CDG Ij).....	47
4.3. Análisis del proteoma sérico de pacientes CDG Ia.....	50

4.4. Caracterización de las líneas de fibroblastos de pacientes CDG Ia.....	54
4.4.1 Niveles de expresión de la proteína PMM 2.....	54
4.4.2 Niveles de expresión del gen <i>PMM2</i>	55
4.5 Análisis funcional de las variantes alélicas identificadas en el gen <i>PMM2</i>.....	56
4.5.1 Análisis funcional de mutaciones <i>missense</i>	57
4.5.2 Análisis funcional de mutaciones de <i>splicing</i>	61
4.6 Estudio de terapias específicas de mutaciones de <i>splicing</i>.....	65
4.6.1 Efecto de la sobreexpresión de factores de <i>splicing</i> sobre mutaciones que afectan al procesamiento del mRNA.....	65
4.6.2 Uso de terapia antisentido tipo morfolino (AMOs) en mutaciones causantes de exonización de secuencias intrónicas.....	67
5. DISCUSIÓN.....	70
5.1 Diagnóstico y caracterización de pacientes con Defectos Congénitos de Glicosilación.....	70
5.2 Análisis funcional de las variantes alélicas identificadas en el gen <i>PMM2</i>	75
5.3 Correlación genotipo-fenotipo y diseño de terapias específicas de mutación.....	80
6. CONCLUSIONES.....	85
7. BIBLIOGRAFÍA.....	88
8. PUBLICACIONES.....	103

1. INTRODUCCIÓN

1.1 DEFECTOS CONGÉNITOS DE GLICOSILACIÓN.

La glicosilación es el proceso en el cual se adicionan enzimáticamente glicanos a proteínas y lípidos. Estos glicanos se unen covalentemente al grupo amino de residuos de asparagina, en la N-glicosilación, o al grupo hidroxilo de residuos de serina, treonina o hidroxilisina, en la O-glicosilación (Marquardt and Denecke 2003).

La ruta de **N-glicosilación** (Fig. 1) tiene lugar en 3 compartimentos celulares distintos: citosol, retículo endoplásmico (RE) y aparato de Golgi. La biosíntesis del glicano comienza en el citosol de la célula con la formación de nucleótidos-azúcar, a partir de monosacáridos obtenidos de la dieta o de rutas endógenas, y con la unión a un dolicol fosfato de la membrana del RE de 2 N-acetilglucosaminas y 5 manosas, provenientes de estos azúcares activados (UDP-GlcNAc y GDP-manosa). Posteriormente, el glicano es trasladado al lumen del RE por una flipasa (Hauptle et al. 2008; Helenius et al. 2002) y allí se continúan añadiendo 4 manosas y 3 glucosas provenientes de azúcares unidos a dolicol-P, formándose el oligosacárido estándar o LLO (*Lipid linked Oligosaccharide*, $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_3\text{-PP-Dol}$). Este LLO se transfiere a la proteína naciente mediante el complejo enzimático Oligosacariltransferasa (OST, EC 2.4.1.119), uniéndose a la asparagina de la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr, siendo X cualquier aminoácido excepto prolina. Finalmente, esta proteína glicosilada es procesada por varias glicosidasas en el RE y por transporte vesicular pasa a Golgi, formándose una estructura más compleja por eliminación de residuos de glucosa y manosa y por la adición de acetilgalactosamina, galactosa, fucosa y residuos de ácido siálico (Freeze and Aebi 2005; Grunewald and Matthijs 2000; Marquardt and Freeze 2001; Sparks 2006).

La **O-glicosilación** difiere de la N- en varios aspectos. La N-glicosilación ocurre simultáneamente a la traducción de la proteína, se basa en un único tipo de unión del glicano a la proteína y posee una estructura común a partir del cual se diferenciarán los N-glicanos. Esto se refleja en una ruta biosintética relativamente sencilla que sólo diverge en los últimos estadios que ocurren en el aparato de Golgi. Sin embargo, la O-glicosilación ocurre después de la oligomerización de la proteína y es una ruta mucho más compleja pues no posee una estructura común a partir del cual se diferencian los distintos glicanos ni una secuencia consenso de unión a la proteína, sino que hay distintos tipos de uniones según sea N-acetilgalactosamina, xilosa, fucosa, manosa, glucosa, galactosa o N-acetilglucosamina el primer azúcar que se une a serina, treonina o hidroxilisina de la proteína, lo que genera gran cantidad de O-glicanos diferentes. Por eso, la clasificación de los O-glicanos se ha realizado en base al primer azúcar que se une a la proteína, existiendo 7 grupos distintos, siendo el más común en humanos el tipo mucina en el que el primer azúcar es la N-acetilgalactosamina (Marquardt and Denecke 2003; Wopereis et al. 2006).

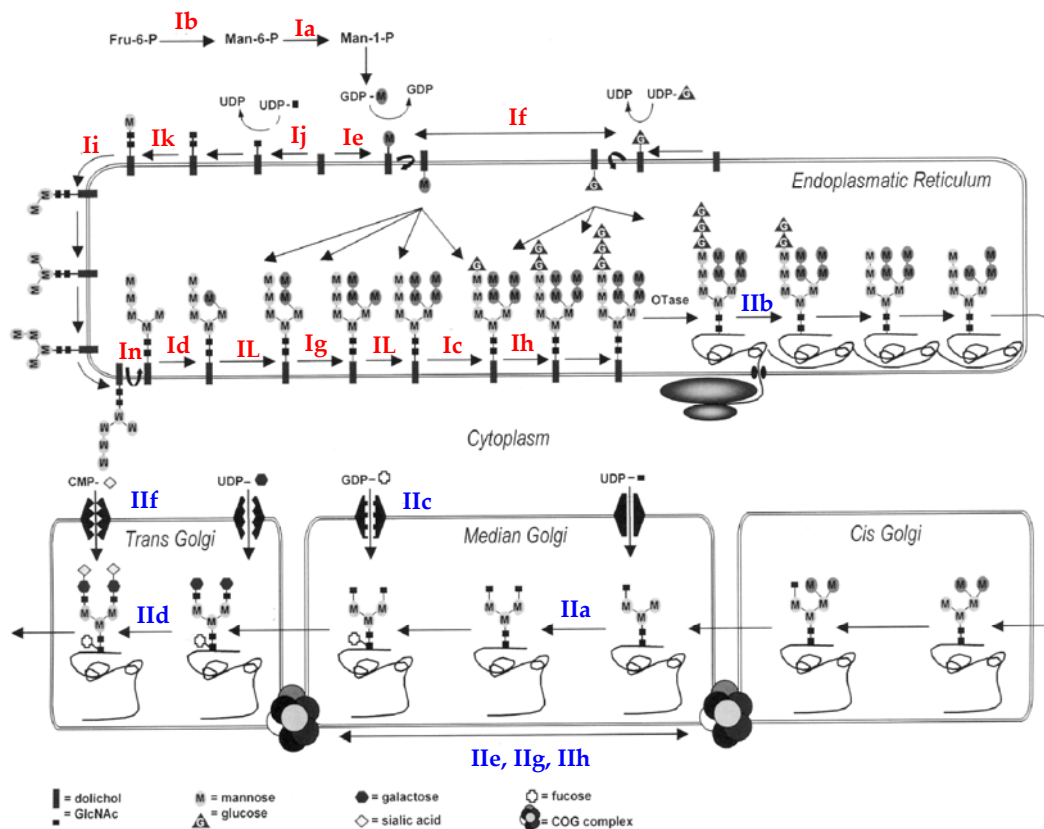


Figura 1. Ruta de N-glicosilación y localización de los distintos CDGs que afectan a esta ruta. Se indican en color rojo los Defectos Congénitos de Glicosilación que afectan a la etapa de síntesis del LLO o a la transferencia de éste a la proteína y en azul aquellos que afectan al procesamiento del glicano unido a la proteína. Los nombres de cada enzima figuran en la tabla 1.

Los Defectos Congénitos de Glicosilación (CDG) son un grupo de enfermedades genéticas, en su mayoría con herencia autosómica recesiva, que afectan al proceso de N-glicosilación y/o O-glicosilación de glicoproteínas y glicolípidos. Numerosos transportadores y proteínas de membrana, mediadores, receptores, enzimas y hormonas son glicoconjugados, por tanto, un defecto en la síntesis de sus glicanos provoca una alteración de su estructura y función. Esto explica que se trate de enfermedades multisistémicas y la alta heterogeneidad clínica de los pacientes (Tabla 1).

Jaeken y colaboradores en 1984 hicieron la primera descripción clínica de un defecto en este metabolismo (Jaeken et al. 1984). Desde entonces se han descrito 22 defectos distintos en la ruta de la N-glicosilación de proteínas (Freeze and Aebi 2005) (Fig.1) (Tabla 1), que se agrupan en dos grandes grupos.

- **CDG I:** defectos que afectan a la etapa de síntesis y transferencia del oligosacárido estándar o LLO a la proteína.
- **CDG II:** defectos que afectan al procesamiento del glicano unido a la proteína.

El **CDG Ia** es, hasta el momento, el defecto en la N-glicosilación más frecuente y está causado por la deficiencia del enzima fosfomanomutasa 2 (PMM 2, EC 5.4.2.8), enzima citosólica que cataliza la conversión de manosa-6-P a manosa-1-P, sintetizándose a continuación el donador de manosa GDP-manosa, esencial para la síntesis del LLO. Existen 2 isoformas de la fosfomanomutasa en humanos con distinta expresión específica de tejido, PMM 1 y PMM 2, pero tan sólo mutaciones en el gen *PMM2*, localizado en el cromosoma 16p13, son responsables de los CDG Ia (Cromphout et al. 2006; Matthijs et al. 2000).

El fenotipo clínico de los CDG Ia se caracteriza por afectación multiorgánica con hipotonía, retraso en el desarrollo, estrabismo, mamilas invertidas y acumulación anómala de grasa. En pacientes mayores la sintomatología incluye retinitis pigmentosa, convulsiones, atrofia cerebelar y malabsorción. Aproximadamente el 20% de los pacientes mueren en el primer año de vida, siendo las infecciones la causa más frecuente (Aronica et al. 2005; Blank et al. 2006; Dinopoulos et al. 2007).

El **CDG Ib** está causado por un defecto del enzima fosfomanoisomerasa (PMI, EC 5.3.1.8), enzima citosólica que cataliza la conversión de fructosa-6-P a manosa-6-P, que será el sustrato para la fosfomanomutasa. Una alteración en el funcionamiento de este enzima provoca una sintomatología muy distinta a los pacientes con CDG Ia. Los pacientes con CDG Ib no presentan alteración neurológica sino afectación hepatointestinal, con enteropatía con pérdida proteica, coagulopatía y fibrosis hepática. El gen responsable de este defecto es el *MPI* localizado en el cromosoma 15q (Niehues et al. 1998; Schollen et al. 2000a).

El CDG Ib es el único defecto en la ruta de N-glicosilación de proteínas que en la actualidad tiene tratamiento eficaz, esto es posible porque el enzima hexoquinasa proporciona una vía alternativa para la síntesis de manosa-6-P a partir de manosa. La aportación en la dieta de manosa es mínima y probablemente en estos pacientes es insuficiente para una correcta N-glicosilación, pero sin embargo, un suplemento con manosa en la dieta promueve esta vía alternativa y parece ser un tratamiento eficaz (Hendriksz et al. 2001; Niehues et al. 1998).

El resto de CDG I tienen un fenotipo clásico caracterizado por presentar hipotonía muscular, anomalías del sistema nervioso, retraso en el crecimiento, problemas de coagulación y hepatopatía, excepto el CDG Ih que presenta sintomatología similar al CDG Ib, es decir, alteraciones hepato-intestinales, coagulopatía, enteropatía con pérdida proteica y sin alteraciones neurológicas. Todos estos CDG están representados por un bajo número de pacientes, excepto el CDG Ic, que es el segundo más frecuente con más de 30 casos descritos. Esta causado por la deficiencia en el enzima glucosiltransferasa I (EC 2.4.1.1.), localizado en el RE y codificado por el gen *ALG6*, situado en la región cromosómica 1p22.3.

Existen algunos defectos que afectan a ambas rutas de glicosilación, son los denominados **Defectos Congénitos Combinados de la N- y O-glicosilación**, aquí estarían incluidos los CDG IIc, IIe, IIg y IIh. Los CDG IIc presentan una alteración en el transportador de fucosa (Lubke et al. 2001; Sturla et al. 2005). Los CDG IIe, IIg y IIh tienen afectación en la subunidad Cog7, Cog1 y Cog 8 (Foulquier et al. 2006; Kranz et al. 2007; Wu et al. 2004), respectivamente, del complejo Cog, complejo oligomérico de Golgi.

Tabla 1. Resumen de los distintos subtipos de los Defectos Congénitos de Glicosilación, enzima, gen implicado en cada defecto y sintomatología clínica asociada.

CDG	ENZIMA/PROTEÍNA	GEN	EntrezGene*	MIM**	CROMOSOMA	SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA
Ia	Fosfomanomutasa II	<i>PMM2</i>	5373	601785	16p13.3-p13.2	Retraso mental, hipotonía, esotropía, lipodistrofia, hipoplasia cerebelar, convulsiones
Ib	Fosfomanosa isomerasa	<i>MPI</i>	4351	154550	15q22-qter	Fibrosis hepática, enteropatía con pérdida proteica, coagulopatía, hipoglucemia
Ic	Glucosiltransferasa I	<i>ALG6</i>	29929	604566	1p22.3	Retraso mental, hipotonía, epilepsia
Id	Manosiltransferasa VI	<i>ALG3</i>	10195	608750	3q27	Retraso mental severo, atrofia del nervio óptico
Ie	Dol-P-Man sintasa I	<i>DPM1</i>	8813	603503	20q13.13	Retraso mental severo, epilepsia, hipotonía, rasgos dismórficos, coagulopatía
If	Dolicol-P-manosa utilización defecto1/Lec35	<i>MPDU1</i>	9526	604041	17p13.1-p12	Pequeña estatura, ictiosis, retraso mental, retinopatía
Ig	Manosiltransferasa VIII	<i>ALG12</i>	79087	607144	22q13.33	Hipotonía, retraso mental, rasgos dismórficos, microcefalia, infecciones frecuentes
Ih	Glucosiltransferasa II	<i>ALG8</i>	79053	608103	11pter-p15.5	Hepatomegalia, coagulopatía, enteropatía con pérdida proteica, fallo renal
Ii	Manosiltransferasa II	<i>ALG2</i>	85365	607905	9q22	Hepatomegalia, coagulopatía, retraso mental, hipomielinización, convulsiones no tratables
Ij	GlcNAtransferasa I	<i>DPAGTI</i>	2875	191350	11q23.3	Retraso mental severo, hipotonía, convulsiones, microcefalia
Ik	Manosiltransferasa I	<i>ALG1</i>	56052	605907	16p13.3	Retraso mental severo, hipotonía, microcefalia, convulsiones no tratables, coagulopatía, síndrome nefrótico
IL	Manosiltransferasa VII	<i>ALG9</i>	79796	606941	11q23	Microcefalia severa, hepatomegalia, hipotonía, convulsiones
Im	Dolicol quinasa	<i>DK1</i>	22845	610768	9q34.11	Microcefalia, ictiosis, nistagmus, hipotonía
In	DolPP-GlcNA ₂ Man ₅ flipasa	<i>RFT1</i>	91869	612015	3p21.1	Retraso en el desarrollo, hipotonía, hepatomegalia, coagulopatía, convulsiones
Ila	GlcNAtransferasa II	<i>MGAT2</i>	4247	212066	14q21	Retraso mental, rasgos dismórficos, convulsiones
Ilb	Glucosidasa I	<i>GLS1</i>	2744	606056	2p13-p12	Dismorfia, hipotonía, convulsiones, hepatomegalia, fibrosis hepática, normal Tf
Ilc	Transportador GDP-fucosa	<i>SLC35C1/FUCT1</i>	55343	266265	11p11.2	Infecciones recurrentes, neutrofilia, retraso mental, microcefalia, hipotonía, normal Tf
Ild	Galactosiltransferasa	<i>B4GALT1</i>	2683	607091	9p13	Hipotonía, miopatía, hemorragias espontáneas
Ile	Cog7	<i>COG7</i>	91949	608779	16p	Dismorfia, hipotonía, convulsiones no tratables, hepatomegalia, ictericia, infecciones recurrentes, fallo cardiaco
Ilf	Transportador CMP-NeuAC	<i>SLC35A1</i>	10559	605634	6	Trombocitopenia, glicoproteínas plaquetarias anormales, no síntomas neurológicos, normal Tf
Ilg	Cog1	<i>COG1</i>	9382	606973	17	Macrocefalia, rasgos dismórficos, hipotonía, hipertrofia ventricular, hepatoesplenomegalia, atrofia cerebelar
Ilh	Cog8	<i>COG8</i>	84342	606979	16	Retraso mental, hipotonía, pseudo-ptosis, atrofia cerebelar

* 16H <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene> ** 17H <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>

Debido al gran incremento de CDGs descritos hasta el momento, 40 tipos distintos incluyendo defectos en la glicosilación de proteínas y lípidos, y la sospecha de que el número de genes implicados continúe aumentando, la clasificación de estos defectos es extremadamente compleja. Como nueva nomenclatura se ha propuesto recientemente (Jaeken et al. 2008) que se use el nombre del gen responsable, pudiéndose indicar, además, el nombre de la proteína, por último, queda como elección personal añadir entre paréntesis la antigua nomenclatura. Ejem: Deficiencia de *PMM2* (CDG Ia).

Existen también defectos de glicosilación secundarios a otras enfermedades genéticas. La galactosemia clásica causada por la deficiencia del enzima galactosa-1-P uridiltransferasa da lugar a N-glicanos truncados deficientes en galactosa. Se postula que la acumulación de galactosa-1-P inhibe a la galactosiltransferasa de la N-glicosilación o que la síntesis de UDP-galactosa se ve afectada (Charlwood et al. 1998; Stibler et al. 1997).

Otro defecto secundario de la ruta de N-glicosilación es la intolerancia hereditaria a la fructosa, causada por la deficiencia del enzima fructosa-1-P aldolasa. Se debe a que el metabolito acumulado en este defecto, la fructosa-1-P, es un potente inhibidor de la fosfomanoisomerasa (Adamowicz and Pronicka 1996; Jaeken et al. 1996).

Otras enfermedades que pueden producir hipoglicosilación de proteínas séricas secundariamente son el alcoholismo (Bean et al. 1995; Helander et al. 2001), la afectación hepática severa (Gravel et al. 1996; Murawaki et al. 1997), y diferentes síndromes infecciosos, como por ejemplo el síndrome hemolítico urémico causado por *Streptococcus pneumoniae* (de Loos et al. 2002) y la meningitis (Quintana et al. 2007).

Además se han visto alteraciones más específicas en la N-glicosilación en la artritis reumatoide con hipoglicosilación de las IgG séricas (Axford et al. 1992; Yagev et al. 1993), en distintos tipos de cáncer como en el adenocarcinoma de pulmón, en el que se expresa una glicoproteína de función desconocida (Motte et al. 1989) o en el coriocarcinoma, donde hay un incremento de oligosacáridos unidos a asparagina (Kobata 1988), y por último, en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), donde se ha observado hipoglicosilación de la transferrina (Nihlen et al. 2001). Del mismo modo hay alteraciones secundarias de la O-glicosilación en la glomerulonefritis con hipoglicosilación de la IgA1 (Allen et al. 1995), en gran variedad de carcinomas que presentan glicosilación incompleta de la estructura base del oligosacárido tipo mucina (Meichenin et al. 2000) y en el síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) que presenta aumento de glicosilación en la superficie de los linfocitos (Durand and Seta 2000; Greer et al. 1989).

También se conocen enfermedades en las que se describe un aumento de la glicosilación sin mediar actividad enzimática, es decir, resultado de la interacción de aldosas como la glucosa con grupos amino en polipéptidos o lípidos. Este fenómeno se denomina **glicación**. Dentro de este grupo se encontraría la *Diabetes mellitus* (Singh et al. 2001), el tabaquismo (Nicholl and Bucala 1998) y la enfermedad de Alzheimer (Munch et al. 1997).

1.1.1 Caracterización Bioquímica

Debido a la gran heterogeneidad clínica de estos pacientes, el diagnóstico de la enfermedad no se basa en un patrón clínico característico sino en una serie de pruebas bioquímicas y genéticas.

Para la detección de los pacientes con CDG, se realiza en primer lugar el análisis de la transferrina sérica mediante isoelectroenfoque (IEF). La transferrina es una glicoproteína plasmática transportadora de hierro que se sintetiza en hígado. Está formada por una única cadena polipeptídica de 698 aminoácidos con 2 sitios de unión a glicanos, cada uno de los cuales tiene al final de su estructura 4 posibles uniones a ácido siálico (Fig. 2.)

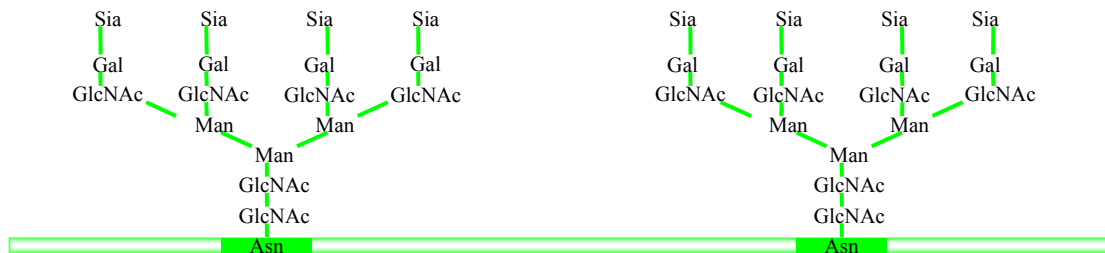


Figura 2. Esquema de la estructura de la transferrina. Los glicanos están unidos a la transferrina covalentemente por sus residuos de asparagina. La estructura del glicano está formada por N-acetilglucosamina (GlcNAc), manosa (Man), galactosa (Gal) y ácido siálico (Sia).

Según el número de grupos siálicos unidos a la proteína, existen 9 isoformas de la transferrina que se diferencian, por lo tanto, en su carga eléctrica. Podemos encontrar desde la forma octosialilada de la proteína (los 8 sitios de unión ocupados por ac. siálico) hasta la forma asialilada de la misma.

El Isoelectroenfoque (IEF) es un método electroforético que permite la separación de estas isoformas según su punto isoeléctrico en un gel con gradiente de pH y mediante la aplicación de una carga eléctrica. Este método permite identificar pacientes con CDG I, que muestran un patrón tipo 1, caracterizado por la disminución de la tetrasialotransferrina, isoforma predominante en individuos sanos, más aumento de las formas di- y asialiladas de la transferrina; y pacientes con CDG II, que muestran un patrón tipo 2, con aumentos variables de cualquiera de las formas hipoglicosiladas de la proteína (tri-, di-, mono- y asialotransferrina).

Existen otras enfermedades, citadas anteriormente, que dan lugar a un defecto de glicosilación de forma secundaria detectable por el análisis de la transferrina sérica, como la galactosemia y la intolerancia a la fructosa. En ambos casos los pacientes presentan un patrón tipo 1 que se corrige tras el tratamiento. También pueden alterar el patrón de la transferrina enfermedades como el alcoholismo, afectación hepática severa y diferentes síndromes infecciosos, como por ejemplo el síndrome urémico causado por *Streptococcus pneumoniae*. En este caso no sólo está alterada la transferrina (patrón tipo 2) sino también la apolipoproteína CIII debido a la excreción de neuraminidasa, enzima que cataliza la hidrólisis de ácidos siálicos de las glicoproteínas (de Loos et al. 2002).

El análisis de otras N-glicoproteínas por IEF, como la **α 1-antitripsina**, es también informativo. Se trata de otra proteína sérica de origen hepático que juega un papel importante en la coagulación, control de la inflamación y reparación de daño tisular. Posee una cadena polipeptídica formada por 418 aminoácidos con 3 puntos de unión a glicanos. Cada glicano acaba en dos o tres ácidos siálicos, lo que genera la existencia de 8 isoformas diferentes que son fácilmente detectables por IEF en función de su punto isoeléctrico (Mills et al. 2003).

El IEF de la **apolipoproteína CIII** de suero permite la detección de pacientes con afectación en la ruta de la O-glicosilación tipo mucina, es decir, aquella que se inicia con la adición de una N-acetilgalactosamina (Wopereis et al. 2003). La apolipoproteína CIII es una O-glicoproteína de origen hepático y su forma glicosilada se encuentra en plasma. En su estructura consta de 99 aminoácidos y porta un único O-glicano con dos posibles puntos de unión a ácido siálico, lo que le proporciona 3 posibles isoformas. Un patrón normal de IEF presenta de forma mayoritaria las formas di- y monosialiladas de la proteína en igual proporción. Mientras que un patrón anómalo se caracteriza por el aumento de la forma mono- o asialilada de la misma. Pacientes con patrones alterados de la Apo CIII y de la transferrina (patrón tipo2), probablemente presentarán un defecto combinado de la N- y O-glicosilación (Wopereis et al. 2005).

Aunque el análisis de la transferrina puede detectar una alteración de la glicosilación, no indica cual es el defecto primario. En última instancia el diagnóstico de certeza lo proporciona el análisis enzimático y/o molecular de los genes que se sospecha responsables del defecto. De hecho, el ensamblaje de N-glicanos es un proceso muy conservado en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y células eucariotas, lo que ha sido de gran utilidad para la identificación de la mayoría de los genes causantes de los CDG I (tabla 1). Las cepas de levadura con defectos de glicosilación individuales o múltiples que tienen un efecto a veces letal sobre la síntesis de las glicoproteínas son un sistema de complementación ideal para analizar el efecto de mutaciones patológicas en los genes humanos ortólogos.

También las técnicas proteómicas pueden ser una herramienta útil para el diagnóstico de pacientes con CDG. Desde que se describió por primera vez, en 1975, la electroforesis bidimensional (2-DE) por O'Farrell and Klose (Ong and Pandey 2001), esta técnica ha sido utilizada en diversas aplicaciones. Con la 2-DE las proteínas se resuelven en la primera dimensión en función de su punto isoeléctrico en un gradiente de pH y en la segunda dimensión según el peso molecular. El análisis proteómico combina la 2-DE con la espectrometría de masas, técnica que permite la identificación de proteínas a partir de la digestión de *spots* obtenidos del gel 2D (Peng and Gygi 2001). La importancia de su aplicación reside en que puede resolver una mezcla de proteínas compleja, pudiendo identificar de forma rápida proteínas desconocidas y sus formas modificadas post-traduccionalmente (Ong and Pandey 2001). Esta técnica aplicada a los CDG podría ayudar a la identificación del defecto enzimático mediante la búsqueda de marcadores específicos de cada defecto, a conocer la gravedad del defecto y que alteraciones fisiológicas presenta cada paciente según la expresión diferencial de las proteínas y a conocer si existe diferencias específicas de tejido (Butler et al. 2003; Sturiale et al. 2008).

1.1.2 Bases Moleculares de los CDG Ia

Hasta el momento sólo se han descrito mutaciones causantes de **CDG Ia** en el gen *PMM2*, localizado en el cromosoma 16, región 16p13. Existe un gen localizado en 22q13, *PMM1*, que codifica para una fosfomanomutasa que se expresa en pulmón y cerebro (Silvaggi et al. 2006), acepta un mayor espectro de sustratos y tiene también actividad fosfoglucomutasa *in vitro* (Pirard et al. 1999). También se conoce la existencia de un pseudogen procesado, *PMM2p*, en el cromosoma 18 (Matthijs et al. 2000). El cDNA del gen *PMM2* (MIM 601785) se clonó en 1997 (Matthijs et al. 1997). Tiene una fase de lectura de 738 nucleótidos codificante para una proteína de 246 aminoácidos. Es un gen altamente conservado (57% de identidad entre humano y levadura) y se expresa en todos los tejidos.

Hasta la fecha se han descrito más de 90 mutaciones diferentes en el gen *PMM2*, siendo en el 95% de los casos mutaciones *missense* (<http://www.euroglycanet.org/>). La mutación más común descrita en pacientes CDG Ia es la R141H, la cual nunca se ha encontrado en homocigosis (Kjaergaard et al. 2001; Schollen et al. 2000b). El análisis de la proteína PMM 2 recombinante portadora de esta mutación revela que este cambio de una Arginina por Histidina en la posición 141 provoca la inactivación completa del enzima (Kjaergaard et al. 1999; Le Bizec et al. 2005). La R141H está presente en más del 37% de pacientes CDG Ia de origen caucásico, lo que daría una frecuencia de homocigotos del 13% en esta serie de pacientes (Matthijs et al. 2000), sin embargo no se han encontrado pacientes con el genotipo R141H/R141H, lo que apoya la hipótesis de que este genotipo probablemente sea letal (Schollen et al. 2000).

Los pacientes CDG Ia son generalmente compuestos heterocigotos de dos mutaciones *missense* en los que al menos una de las proteínas mutadas conserva cierta actividad residual, pues lo contrario parece ser incompatible con la vida. Estudios con ratones *knockout* para *PMM 2* parecen indicar la importancia de esta proteína en el desarrollo embrionario (Thiel et al. 2006), pues la ausencia de actividad es letal en los primeros días de vida intrauterina. Además estos estudios muestran la inexistencia de otra proteína, como podría ser la *PMM 1*, cuya actividad compense la deficiencia de actividad *PMM 2*. Estudios con ratones deficientes en *PMM 1* revelan que la inactividad de esta enzima no parece ser esencial para un desarrollo con fenotipo normal (Cromphout et al. 2006), lo que apoyaría la hipótesis de que es letal sólo la deficiencia en la actividad *PMM 2*.

La estructura tridimensional de la *PMM 2* es un modelo molecular basado en la estructura cristalizada de la *PMM 1*, pues ambas poseen un 65% de homología en su secuencia, y en las coordenadas incompletas de la *PMM 2*. Según este modelo, la *PMM 2* posee dos dominios: un *core* formado por 6 laminas- β y 5 α -helices, y un pequeño *cap* insertado entre $\beta 5$ y $\alpha 7$ del *core*, formado por 4 laminas- β y 3 α -helices. El sitio activo de la proteína se encuentra en la interfase del *cap* con el *core* (Silvaggi et al. 2006)(Fig. 3).

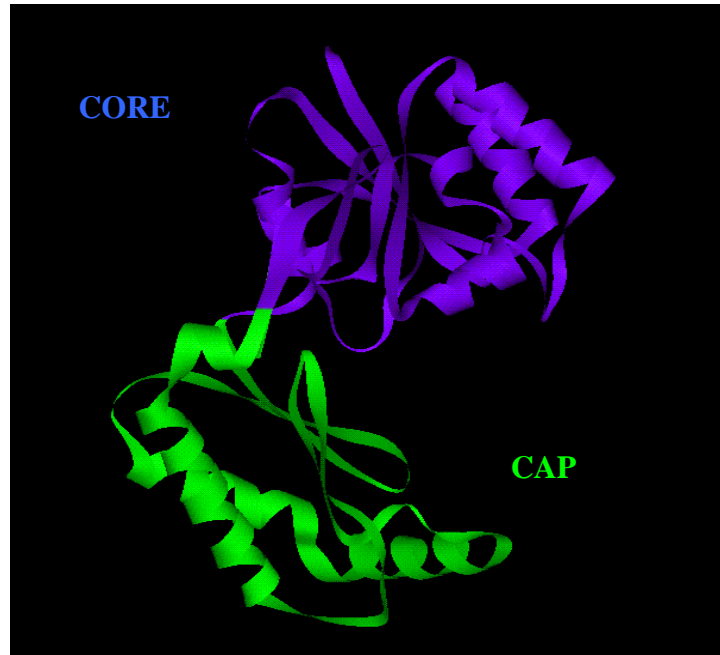


Figura 3. Estructura tridimensional en dominios de un monómero de la PMM 2. Basado en las coordenadas depositadas en el *Protein Data Bank* del Centro de Genómica Estructural de Eucariotas (código de acceso 2AMY). En azul el dominio *core* y en verde el dominio *cap*.

En solución, la PMM 2 está en forma de homodímero interactuando exclusivamente por los dominios *cap*, presentando una conformación abierta debido a las fuerza de repulsión entre el *cap* y el *core*. La unión del sustrato (manosa-1-P) provoca la desaparición de esas cargas y por lo tanto, la conformación cerrada de la proteína, haciéndola funcionalmente activa (Silvaggi et al. 2006).

1.2 ANÁLISIS FUNCIONAL DE VARIANTES ALÉLICAS. NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS Y RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO.

La posibilidad de establecer nuevas aproximaciones terapéuticas a partir del genotipo del paciente, es el motor que impulsa los cada vez más numerosos análisis funcionales de mutaciones en las enfermedades genéticas. Estos análisis funcionales proporcionan información muy relevante sobre el efecto que cada mutación produce, no sólo en referencia a su gravedad sino también en términos de su mecanismo de acción. Además son importantes debido a la existencia de cambios nucleotídicos que aunque hayan sido clasificados previamente como polimorfismos por detectarse en la población normal, pueden tener cierto efecto funcional. Son los denominados SNPs funcionales (Mangoni and Jackson 2002).

1.2.1 Mutaciones de cambio de aminoácido

Aproximadamente, un 85% de los cambios puntuales que causan enfermedades genéticas son mutaciones por cambio de aminoácido o *missense*, manteniéndose esta frecuencia en los pacientes con CDG (Wang et al. 2005). Las variantes causantes de enfermedad no se detectan en los cromosomas normales mientras que los polimorfismos o SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) están presentes en la población general con una frecuencia igual o superior al 0.01%. Sin embargo, aunque esta evidencia puede ser válida para las mutaciones poco frecuentes no es suficiente para concluir que cualquier mutación es causante de enfermedad, especialmente en el caso de enfermedades raras. Por lo tanto, conocidos los cambios nucleotídicos de un paciente, hay que distinguir si dichos cambios son causantes de enfermedad o SNPs mediante el estudio funcional de las diferentes variantes alélicas.

Existen diferentes sistemas de expresión de mutaciones *missense*, todos ellos basados en la expresión de los correspondientes cDNAs clonados en vectores adecuados. Frecuentemente, para la expresión y caracterización de las proteínas mutantes se han empleado sistemas procariotas, fundamentalmente *Escherichia coli*, y eucariotas, tanto células de mamíferos en cultivo como sistemas libres de células. Estos estudios han revelado que son dos los mecanismos más frecuentes a través de los cuales las mutaciones *missense* ejercen sus efectos patogénicos sobre la proteína: los defectos en la estabilidad (**mutaciones estructurales**) (Bross et al. 1999; Pey et al. 2003) o en las propiedades catalíticas (**mutaciones funcionales**), aunque existen mutaciones que ejercen un efecto mixto estructural y funcional (Cohen and Kelly 2003; Gregersen et al. 2000; Pey et al. 2003). Una vez confirmada la patogenicidad del cambio, los análisis funcionales también nos permiten identificar el efecto producido por la mutación y establecer posibles dianas terapéuticas, como en el caso de las mutaciones *missense* que afectan al plegamiento y/o estructura de la proteína cuyo efecto puede ser modulado mediante el uso de **chaperonas farmacológicas** (Chaudhuri and Paul 2006; Muchowski and Wacker 2005; Pey et al. 2008)

1.2.2 Mutaciones que afectan al correcto procesamiento del mRNA

Aproximadamente un 15% de las mutaciones puntuales asociadas a enfermedades genéticas humanas afectan al procesamiento del mRNA (*splicing*) (Cooper et al. 2006; Krawczak et al. 1992; Wang et al. 2005). Estas mutaciones pueden afectar a secuencias conservadas implicadas en el *splicing* (sitio **donador 5' de *splicing***, sitio **aceptor 3' de *splicing***, la **secuencia de ramificación (BPS)** y el **tracto polipirimidínico**) que representan el 60% de estas mutaciones, o bien afectar a secuencias reguladoras (Fig. 4). Estas secuencias reguladoras, que se encuentran localizadas tanto en exones como en intrones, pueden actuar o bien estimulando la eliminación intrónica (potenciadores de *splicing* o *enhancers*) o bien impidiéndola (silenciadores de *splicing*). Las secuencias conservadas son reconocidas por las partículas ribonucleoproteicas (snRNPs) (U1, U2, U4, U5 y U6) que forman el *spliceosoma* junto con más de 50 proteínas, y los elementos reguladores de *splicing* ejercen su acción a través de factores proteicos. En concreto, las secuencias silenciadoras parecen interactuar con una serie de reguladores negativos, frecuentemente pertenecientes a la familia de las

ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs). Los *enhancers* exónicos de *splicing* (ESEs) son sitios de unión de factores proteicos ricos en serina y arginina, conocidos como proteínas SR, a través de los cuales realizan su función activadora (Pozzoli and Sironi 2005). Las proteínas SR están implicadas en el reconocimiento de los sitios 5' y 3' de *splicing* y en la comunicación entre ambos, en el reclutamiento y constitución del *spliceosoma* funcional y en el reconocimiento de *enhancers*. Asimismo, pueden ejercer su acción positiva en el reconocimiento de un exon a través de su unión al RNA mensajero, al impedir que reguladores negativos se unan a un silenciador próximo (competición e impedimento estérico) (Pozzoli and Sironi 2005).

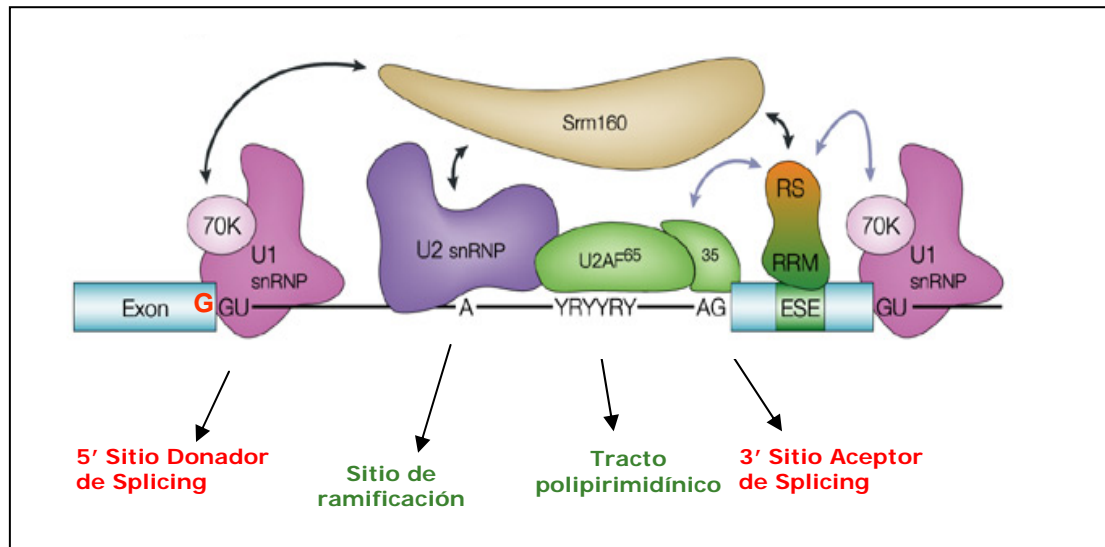


Figura 4. Representación esquemática de los distintos factores implicados en el proceso de maduración del mRNA y las distintas zonas de reconocimiento de los mismos. Figura adaptada de (Cartegni et al. 2002).

La identificación de las secuencias consenso de unión para factores reguladores de *splicing* (proteínas SR) (Liu et al. 2000) ha permitido la generación de diferentes programas informáticos como el ESEfinder (<http://exon.cshl.edu/ESE/>), SELEX, RESCUE-ESE y PESE (Wang et al. 2005) mediante los cuales se pueden predecir los posibles ESEs de una secuencia nucleotídica a estudiar (Cartegni et al. 2003; Pozzoli and Sironi 2005). Estos programas facilitan la identificación de posibles ESEs basándose en su reconocimiento por cuatro proteínas SR: SF2/ASF, SC35, SRp40 y SRp55, cuyos motivos consenso de unión se muestran en la figura 5.



Figura 5. Motivos de unión para las proteínas SR SF2/ASF, SC35, SRp40 y SRp55. La altura de cada letra indica la frecuencia de cada nucleótido en esa posición. En cada posición, los nucleótidos se muestran de arriba a abajo en orden decreciente de frecuencia. Las letras en color naranja indican frecuencias por encima del fondo. <http://exon.cshl.edu/ESE/>

En los últimos años se ha descubierto un mayor número de mutaciones que afectan a secuencias reguladoras de *splicing* como en la fibrosis quística, distrofia miotónica, esclerosis múltiple y otras (Pozzoli and Sironi 2005), incluso se han definido ciertas mutaciones puntuales que afectan a secuencias reguladoras de *splicing* y en concreto a ESEs (*exonic splicing enhancers*), y que fueron incorrectamente clasificadas como mutaciones de cambio de aminoácido, mutaciones *nonsense* o incluso polimorfismos silenciosos debido a la ausencia de análisis a nivel de cDNA (RT-PCR) y a la utilización de sistemas de expresión inadecuados (Nielsen et al. 2007).

Las dos consecuencias más comunes de las mutaciones de *splicing* son el *skipping* exónico, eliminación de un exon que no se incluye en el mRNA maduro, y la activación de sitios crípticos cuya consecuencia es la inclusión de secuencias aberrantes o la eliminación de secuencias codificantes. Además, en los intrones existen de manera muy abundante secuencias que portan todos los elementos necesarios para el reconocimiento de la maquinaria de *splicing* pero no se incluyen como exones en el mRNA. Esto es debido, a que a pesar de que estas secuencias poseen buenos valores de *splicing* presentan otros defectos importantes en las regiones potenciadoras del *splicing* además de un enriquecimiento de regiones silenciadoras que impiden su reconocimiento como exones verdaderos. Estas secuencias son denominadas **pseudoexones**. En los últimos años se han caracterizado diversas enfermedades genéticas causadas por la inclusión de estas secuencias, generalmente debido a mutaciones que provocan la creación de *novi* de un sitio donador o aceptor fuerte de *splicing* seguido de una selección de un aceptor o donador “oportunista”. Otro motivo por el que estas secuencias pueden ser incluidas como exones es debido a la existencia de mutaciones que causan la creación o delección de secuencias reguladoras de *splicing* (*enhancer* o secuencias silenciadoras tanto exónicas como intrónicas) (Blencowe 2000; Buratti et al. 2006; Faustino and Cooper 2003).

Para validar el efecto que ejercen las mutaciones sobre el procesamiento del mRNA se hace necesario utilizar otras aproximaciones experimentales que impliquen la expresión de regiones discretas del DNA genómico, como son los sistemas celulares modelo de *splicing* que utilizan vectores apropiados para generar los llamados **minigenes** (Cooper 2005; Pagani and Baralle 2004; Rincon et al. 2007). Los minigenes pueden ser utilizados como herramienta para distintos estudios como son la determinación del grado de reconocimiento de los sitios de *splicing*, la identificación de elementos exónicos o intrónicos que activan o reprimen al *splicing*, la identificación de variante alélicas que tienen un efecto en la eficiencia del *splicing* y la identificación de elementos requeridos para la regulación por factores específicos.

La mayoría de las mutaciones de *splicing* producen un cambio en el marco de lectura dando lugar a una secuencia madura de mRNA con un codón prematuro de terminación (PTC) lejano al sitio original. A priori, todas ellas son clasificadas como mutaciones nulas (actividad indetectable), ya que generalmente dan lugar a la disminución de los correspondientes mRNAs evitándose la producción de proteínas truncadas potencialmente tóxicas (Maquat 2004). Este mecanismo celular de degradación de mRNAs anómalos conocido como NMD (*Nonsense-mediated decay*) (Fig. 6) elimina los transcritos que producirían proteínas con una potencial dominancia negativa (Holbrook et al. 2004) y se ha conservado a través de la evolución no sólo porque degrada transcritos aberrantes generados

de forma rutinaria en la expresión génica sino porque, además, es utilizado para conseguir niveles apropiados de dicha expresión.

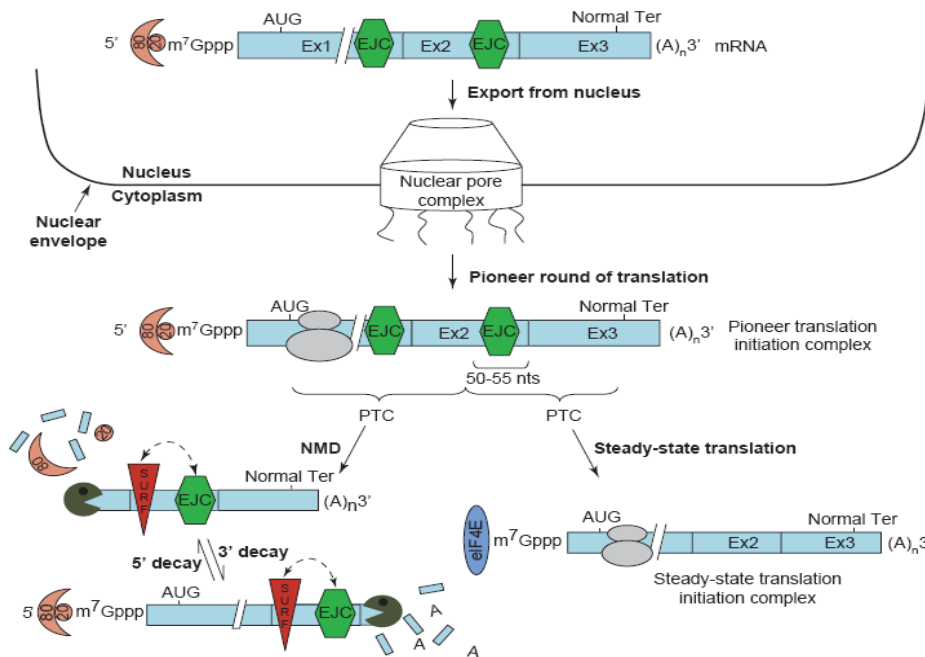


Figura 6. Esquema del mecanismo de actuación del sistema NMD. Se indica un PTC localizado antes de 50-55 nt corriente arriba de una unión exon-exon, que provocaría la activación del sistema NMD y otro localizado posteriormente que se traduciría normalmente. La eliminación de los intrones por el *splicing* da como resultado el posicionamiento a 20-25 nt corriente arriba de la unión exon-exon del complejo EJC. SURF: complejo de supervigilancia que se forma cuando se detiene el ribosoma al encontrar un PTC. Cuando SURF interactúa con EJC se dispara el sistema NMD. Figura adaptada de (Kuzmiak and Maquat 2006).

El NMD en mamíferos generalmente degrada mRNAs que terminan la traducción 50-55 nucleótidos corriente arriba de una unión exon-exon generada por *splicing*. A 20-24 nucleótidos corriente arriba de esta unión se une un complejo proteico, EJC (exon junction complex) el cual está formado por 12 proteínas donde están incluidos algunos factores del sistema NMD. Cuando el ribosoma comienza la traducción y encuentra un PTC (codón de parada prematuro) se detiene. Esto permite la formación del complejo SURF, el cual cuando colisiona con el EJC provoca la activación del sistema NMD y con ello, la degradación del mRNA. Se ha visto que mutaciones *nonsense* en el último exon del gen codificante para la β -globina humana no sufren NMD porque no hay unión exon-exon posterior (Thein 2004). El sistema NMD no es 100% eficiente, sino que aproximadamente un 5-25% de mRNA que contiene PTC escapa a este sistema de vigilancia y es traducido a una proteína truncada que generalmente es inestable siendo degradada (Kuzmiak and Maquat 2006). Sin embargo, en la actualidad se han observado transcritos portadores de PTC que no son degradados y generan proteínas truncadas con posible actividad (Kerr et al. 2001). En base a esto se han creado nuevas terapias basadas en la inhibición del sistema NMD que consiguen recuperar el fenotipo normal *in vitro* en enfermedades como la enfermedad de Ullrich (Usuki 2006; Usuki et al. 2004).

El conocimiento de las consecuencias que cada mutación produce en términos de su mecanismo de acción a nivel de DNA y mRNA ha abierto nuevas y prometedoras vías terapéuticas genéticas en estas alteraciones del *splicing*. La modulación del *splicing* permitiría modificar el porcentaje de transcritos incorrectamente procesados y por lo tanto, alterar la expresión fenotípica de la mutación. Esto se podría llevar a cabo mediante:

- **Sobreexpresión de factores específicos de *splicing*** (Nissim-Rafinia et al. 2004) o activación de la transcripción de estos factores con el uso de drogas como fenilbutirato (Andreassi et al. 2004), butirato sódico (Chang et al. 2001), kinetina (Slaugenhaupt et al. 2004), ácido valproico (Brichta et al. 2003; Gottlicher 2004), aclarubicina (Andreassi et al. 2001), cafeína (Shi et al. 2008), entre otros, que actúan como diacetilasas o activando determinados promotores.
- Uso de **oligonucleótidos antisentido tipo morfolino (AMO)**. Se trata de pequeñas cadenas de análogos de deoxirribonucleótidos que hibridan con el mRNA complementario por apareamiento de bases formando los heterodúplex AMOs-mRNA. Los mecanismos mediante los cuales los AMOs llevan a cabo la regulación de la expresión génica incluyen inducción de la actividad RNasa H endonucleasa que degrada el mRNA, interferencia de la traducción por impedimento estérico de la actividad ribosomal e interferencia de la maduración del mRNA por inhibición del *splicing* (Aartsma-Rus and van Ommen 2007; Kurreck 2003). En los últimos años los oligonucleótidos antisentido tipo morfolino (AMOs), capaces de bloquear alostéricamente estos sitios de *splicing*, han sido utilizados para restaurar el *splicing* normal en varias enfermedades como son la β -talasemias (Suwanmanee et al. 2002), fibrosis quística (Friedman et al. 1999), enfermedad de Menkes (Madsen et al. 2008), albinismo ocular tipo I (Vetrini et al. 2006), afibrinogenia (Davis et al. 2008), distrofia muscular de Duchenne (Aartsma-Rus and van Ommen 2007), ataxia telangiectasia (Du et al. 2007) y acidemias orgánicas (Rincon et al. 2007).

1.2.3 Relación genotipo-fenotipo

Con el conocimiento del espectro mutacional de los genes implicados y teniendo en cuenta la información obtenida en los diferentes estudios de expresión de las mutaciones y los datos clínicos/bioquímicos de los pacientes, se ha intentado correlacionar el fenotipo con el genotipo en numerosas enfermedades genéticas. De esta manera, se intentaría predecir el pronóstico de la enfermedad y adecuar una terapia de forma más individualizada y, en algunos casos, dirigida al mecanismo molecular responsable de la patogénesis de cada variante alélica.

La relación genotipo-fenotipo es más evidente cuando los pacientes son homocigotos para una mutación o funcionalmente hemicigotos (portadores de una mutación nula). En pacientes heterocigotos para dos mutaciones de cambio de aminoácido, que suponen el 80% de los pacientes, esta relación es más compleja ya que es necesario valorar la contribución de cada variante alélica en la producción final de proteína funcional. De esta forma, se puede definir un

sencillo algoritmo en el cual dos mutaciones severas (con actividad residual nula *in vitro*) se asocian a las formas más graves de la enfermedad, mientras que la presencia de una mutación leve que retiene actividad residual y una severa (hemicigoto funcional), se asocia a fenotipos más leves. Las discrepancias en la relación genotipo-fenotipo encontradas se han descrito fundamentalmente cuando se produce una menor cantidad de proteína inmunorreactiva por ser defectos que afectan al plegamiento de la proteína, con mayor tendencia a la agregación/degradación y por lo tanto, menor actividad cuando son expresadas *in vitro* (Waters et al. 1998). Las enfermedades donde se han descrito este tipo de mutaciones son denominadas **enfermedades conformacionales**. Así, estas discrepancias podrían ser explicadas por las posibles diferencias interindividuales en la eficacia del sistema de degradación/plegamiento de proteínas (*protein quality control*) que mantiene diferentes niveles de actividad residual (Desviat et al. 1999; Gregersen et al. 2001a; Gregersen et al. 2004).

2. OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este trabajo ha sido el estudio de las bases moleculares de los Defectos Congénitos de Glicosilación para encontrar nuevas herramientas diagnósticas y poder investigar en nuevas dianas y aproximaciones terapéuticas basadas en el genotipo. Para ello, se han seguido los siguientes objetivos concretos:

1. Aplicación y desarrollo de técnicas diagnósticas: IEF de glicoproteínas séricas, estudios enzimáticos y análisis genético de los genes responsables de la patología.
2. Estudios del proteoma sérico de pacientes con CDG Ia.
3. Caracterización de líneas celulares de pacientes con Defecto Congénito de Glicosilación Ia (CDG Ia). Análisis de la expresión génica y de la proteína PMM 2.
4. Análisis funcional de las mutaciones *missense* en sistemas de expresión procariota. Efecto de las mutaciones sobre la actividad y estabilidad de la proteína PMM 2.
5. Análisis funcional de mutaciones que afectan al correcto procesamiento del mRNA mediante modelos celulares con minigenes. Análisis del perfil transcripcional en líneas celulares portadoras de dichas mutaciones.
6. Estudio de nuevas aproximaciones terapéuticas específicas de mutaciones de *splicing*: sobreexpresión de factores de *splicing* y aplicación de oligonucleótidos antisentido tipo morfolinos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Reactivos y aparatos

El cálculo del porcentaje de transferrina deficiente en carbohidratos (%CDT) se ha realizado utilizando el kit %CDT TIA Microtiter plate versión de BIO RAD.

El isoelectroenfoque se ha realizado en una unidad de electroforesis Multiphor de Amersham, con anfolinas de pH 4-6 y 3.5-5 de Pharmacia y 5-8 de GE Healthcare, anticuerpos de conejo antitransferrina o anti- α_1 -antitripsina humana de DAKO y anti-apoCIII de conejo de Acris, anti-IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina de Sigma. Además de utilizó NBT/BCIP, neuraminidasa de Roche y Geles CleanGel IEF de Amersham Biosciences.

Para la medida de las actividades enzimáticas PMM 2 y PMI se han utilizado enzimas auxiliares proporcionadas por las casas comerciales Sigma y Roche, NADP de Roche y los sustratos, D-manosa-6-P y α -D-manosa-1-P de Sigma. Para la lectura de la absorbancia a 340 nm se ha utilizado un lector de placas Microplate Reader 680XR de Biorad.

En el cultivo celular se emplearon los siguientes reactivos: medio mínimo esencial de Eagle (MEM), glutamina de la firma comercial GibcoBRL y suero fetal bovino (FBS) de SIGMA. Los antibióticos fueron suministrados por Antibióticos S.A. La tripsina y los medios de comprobación se obtuvieron de Difco Laboratorios. Invitrogen, GibcoBRL y Gene Tools suministraron los reactivos para las transfecciones de células primarias y establecidas.

Amersham Biosciences y GE Healthcare proporcionaron los reactivos para la realización de la electroforesis bidimensional de proteínas.

La agarosa y la agarosa NuSieve®GTG® son de las casas comerciales Pronadisa y Cambrex, y la acrilamida y bisacrilamida de Bio-Rad.

Invitrogen proporcionó los productos necesarios para la purificación de RNA total. La purificación de productos de PCR y de DNA plasmídico se llevó a cabo con los productos de las casas comerciales Promega, Quiagen y Mbiotech. Las firmas comerciales GENTRA Systems, Promega e Invitrogen proporcionaron los productos necesarios para la extracción de DNA genómico.

Los reactivos y enzimas empleados en las reacciones de PCR, RT-PCR y mutagénesis dirigida fueron obtenidos de las firmas comerciales Invitrogen, Roche y Stratagene y se realizaron en un termociclador Verity de Applied Biosystem.

Las reacciones de secuenciación cíclica directa se llevaron a cabo con productos de Applied Biosystems en un secuenciador ABI Prism® 3730 de Applied Biosystems. Los oligonucleótidos sintéticos proceden de la firma comercial Isogen y los oligonucleótidos antisentido tipo morfolinós fueron suministrados por la casa comercial GeneTools.

Invitrogen, Life Technologies y Rzpd proporcionaron los vectores necesarios para llevar a cabo los clonajes.

Las enzimas de restricción fueron proporcionadas por Roche Diagnostics y Promega.

Los reactivos y aparatos empleados en las reacciones RT-PCR tiempo real (qRT-PCR) fueron obtenidos de las firmas comerciales Applied Biosystem.

Los reactivos utilizados para *Western Blot* son de las casas comerciales Amersham Pharmacia Biotech, Millipore y Roche. Los anticuerpos utilizados fueron anticuerpo policlonal comercial anti-PMM2 (Abnova) y anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Santa Cruz). El *Western blot* se llevo a cabo en un Mini-protean de Bio-rad y se densitómetró en un densitómetro Bio-Rad GS-710 Calibrated Imaging Densitometer.

3.1.2 Material biológico

3.1.2.1 Muestras biológicas

Se seleccionaron los sueros de pacientes que presentaron un %CDT>3 para el análisis por isoelectroenfoque de la transferrina, α_1 -antitripsina y apolipoproteína CIII. Para los estudios de proteómica se utilizaron sueros de 2 pacientes CDG Ia y de 3 controles.

Para el análisis enzimático y/o genético se utilizaron fibroblastos obtenidos de biopsia de piel de 24 pacientes y 17 controles cultivados en botellas de 75 ó 25 cm² o en placas estandarizadas de 6 pocillos (P6) a 37°C en una atmósfera de humedad relativa del 95% y CO₂ 5%. Se utilizó como medio de cultivo MEM suplementado al 10% con suero fetal bovino (FBS), glutamina 2mM, 100U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. Se realizaron controles de contaminación de reactivos, medios de cultivo y cultivos celulares de forma sistemática durante todo el estudio. Las células fueron recogidas con una solución de tripsina-EDTA y sedimentadas mediante centrifugación.

En aquellos casos en los que no se disponía de fibroblastos de piel se utilizó sangre total con anticoagulante o impregnada en papel SS903 para el estudio genético

La línea celular de hepatoma humano Hep3B utilizada en este estudio fue cedida por el Dr. S.R. de Córdoba.

Los fibroblastos de piel de la línea celular 25232 utilizada en este estudio fueron cedidos por el Dr. G. Matthijs del Centro de Genética Humana, Leuven (Bélgica).

Todo el material genético (biopsias de piel y sangres) de pacientes y controles se obtuvieron con consentimiento informado autorizado por padres y por el hospital que

remitió las muestras. Toda la investigación llevada a cabo con este material está autorizada por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid, respeta los principios fundamentales de la declaración de Helsinki, del Convenio del consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina y de la declaración Universal de la UNESCO sobre el genoma Humano y los derechos humanos.

3.1.2.2 Cepas bacterianas

Las estirpes de *E.coli* utilizadas en este estudio han sido XL1-Blue de Stratagene y BL21(DE3)pLysS de Promega.

3.1.2.3 Vectores plasmídicos

- *TOPO TA Cloning PCR 2.1-Topo Vector* de Invitrogen.
- pSPL3 de Life Technologies
- pDEST15 de Rzpd
- Los plásmidos portadores de la secuencia codificante para los distintos factores de *splicing* y proteínas SR fueron cedidos por Dr. B. Andresen, Dr. A. Krainer y Dr. J. Valcarcel.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Isoelectroenfoque (IEF) de glicoproteínas séricas

Para el análisis de la **transferrina** se utilizaron sueros de pacientes con sospecha de enfermedad metabólica previamente seleccionados por tener %CDT>3. Un volumen de 20 µl de suero se saturó con citrato férrico 10 mM en NaHCO₃ 0.5 M y posteriormente se diluyó 1/50 con agua destilada.

Para el análisis de **α₁-antitripsina** se utilizaron sueros de pacientes que presentaron alguna alteración en el IEF de la transferrina. Se incubó 20 µl de suero con DTT 25 mM-Tween20 12.5 ml/L y se diluyó 1/100 con agua destilada.

Ambos análisis se realizaron a 10°C en una unidad de electroforesis Multiphor de Amersham, en gel de agarosa al 1.2% conteniendo un 10% de glicerina y 15% de sorbitol, con un gradiente de pH=4-8 (Pharmalyte 4-6 y 5-8 de GE Healthcare) y aplicando una corriente de 1250 V, 150 mA, 20 W a 1500 V/h. Posteriormente se realizó el *immunoblot* a temperatura

ambiente transfiriéndose las proteínas a un filtro de nitrocelulosa durante 15-30 minutos. A continuación se incubó toda la noche a 4°C con anticuerpos de conejo antitransferrina o anti- α_1 -antitripsina humana, según el caso, diluidos 1/250 en una solución de NaCl 0.9% conteniendo un 0.2% de leche desnatada. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina (Sigma) diluido 1/2500 en la misma solución de NaCl 0.9% con 0.2% de leche descremada y se dejó incubando 1 hora a temperatura ambiente. El revelado se realizó con NBT/BCIP (Roche) diluido 1/10 en una solución al 5% de Tris-HCl 1 M pH=9.7.

Para la identificación de variantes o subtipos de transferrina se llevó a cabo un tratamiento con neuraminidasa; a 20 μ l de suero se añadió neuraminidasa 10 U/ml simultáneamente a la saturación con citrato férrico 10 mM y se dejó incubar a 37°C 24 horas. Posteriormente, se diluyó la muestra 1/100 con agua destilada. Este tratamiento proporciona la transferrina en estado asialilado, es decir, libre de grupos siálicos.

En todos los casos se aplicó al gel 3 μ l de las muestras para el análisis de la transferrina, y 4 μ l para el de la α_1 -antitripsina.

Para el análisis mediante IEF de la **Apo CIII** se utilizaron sueros de pacientes que presentaron patrón tipo 2 de la transferrina y se aplicó directamente 4 μ l de la muestra de suero sin ningún tratamiento previo.

El análisis se llevó a cabo a 16°C en una unidad de electroforesis Multiphor de Amersham, en gel de poliacrilamida (Geles CleanGel IEF de Amersham Biosciences) rehidratados hora y media a temperatura ambiente con una solución que contiene urea 8.5 M y Pharmalyte 3.5-5 63 mL/L (Farmacia). Se aplicó una corriente de 2000 V, 14 mA, 14 W durante 90 min y posteriormente se realizó el *immunoblot* transfiriendo a nitrocelulosa a 65°C durante 1 hora e incubando toda la noche a 4°C con anticuerpos anti-apoCIII de conejo (Acris) diluidos 1/100 en solución de NaCl 0.9% que contiene un 0.2% de leche descremada. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina (Sigma) diluido 1/1000 con la misma solución y se dejó incubar 1 hora a temperatura ambiente. Se reveló con NBT/BCIP (Roche) 1/10 en una solución al 5% de Tris-HCl 1M pH=9.7.

3.2.2 Medida de las actividades PMM 2 y PMI

El método espectrofotométrico utilizado está basado en la medida de NADPH a 340 nm producido por la reducción del NADP por la actividad de la glucosa-6P-deshidrogenasa (de Koning et al. 1998; Van Schaftingen and Jaeken 1995).

Cada pellet, obtenido de fibroblastos de piel cultivados en una botella de 75 cm² a confluencia, se resuspendió en un medio HEPES 20 mM con KCl 25 mM, DTT 1 mM y Pefabloc 0,2 mM. La rotura y eliminación de las estructuras celulares se realizó mediante doble congelación en nitrógeno líquido y posterior centrifugado de la muestra a 13.000 rpm durante 5 minutos.

La medida de las actividades se realizó durante 45 minutos a 37°C y en agitación, en una mezcla que contiene HEPES 50mM pH 7.1, MgCl₂ 5mM y NADP 0.6 mM de Sigma. Para la **actividad PMM 2** además se añadió fosfoglucoisomerasa 10µg/ml de Roche y glucosa-6-P deshidrogenasa 1.4 U/m, fosfomanoisomerasa 3.5 µg/ml, glucosa 1,6 diP 100 µM y manosa-1-P 0.4 mM de Sigma. En el caso de la **actividad PMI** se añadió glucosa-6-P deshidrogenasa 0.28 U/ml, fosfoglucoisomerasa 10 µg/ml citadas anteriormente y manosa-6-P 0.5 mM de Sigma. Se para la reacción con tampón NaHCO₃ / Na₂CO₃ 0.5 M pH 10.7. La lectura de la actividad se hizo mediante Microplate Reader 680XR de Bio-Rad a 340 nm.

Ambas actividades se expresa en mU/mg de proteína, siendo una mU los nmoles de NADPH obtenido por minuto.

3.2.3 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas totales a partir de fibroblastos de piel de pacientes, para la determinación de las actividades enzimáticas PMM 2/PMI se determinó siguiendo el método de Lowry (Lowry et al. 1951). La concentración de proteínas totales de los extractos obtenidos a partir de la expresión de la proteína de fusión GST-PMM 2 en bacterias se determinó siguiendo el método de Bradford (Bradford 1976).

3.2.4 Aislamiento de ácidos nucleicos

Para la **extracción de RNA total** a partir de fibroblastos de piel, se utilizó TriPure Isolation Reagent de Invitrogen.

La **extracción del DNA genómico** a partir de fibroblastos de piel o hepatoma y de sangre total de los distintos pacientes se realizó mediante fenolizaciones (John et al. 1991), sin embargo de la sangre impregnada en papel se llevó a cabo con el kit Generation DNA Purification Systems de Gentra Systems.

Para la **extracción y purificación de DNA plasmídico** se empleó el sistema comercial de extracción de DNA plasmídico *Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification system* de Promega.

3.2.5 Técnicas de amplificación de DNA

3.2.5.1 Amplificación de cDNA

El proceso de RT-PCR se llevó a cabo a partir de 1 µg de RNA total extraído a partir de fibroblastos de piel o hepatoma. Los reactivos empleados en la retrotranscripción y posterior amplificación fueron suministrados por Invitrogen (*SuperScript™III First-Strand*

Synthesis System for RT-PCR), utilizando oligodT y siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Para los distintos estudios moleculares en cDNA se diseñaron primers específicos para cada gen a partir de la Base de Datos Pública Ensembl <http://www.ensembl.org/index.html> (Tabla 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los cDNAs de los distintos genes estudiados.

GEN	FRAGMENTO cDNA	NOMBRE OLIGO	SECUENCIA 5' → 3'	T _m (°C)	TAMAÑO RT-PCR (pb)
PMM2	PMM2	PMM2-F	GTTCTCTCGTGCCAACGTGTC	61.4	937
		PMM2-R	GGAAGTCCAGACGGCACATG	61.4	
MPI	MPI	MPI-F-1S	CTGCCGGGAAAGGCATACGT	61.4	1377
		MPI-R	GGTGAGGTTGGCTGGAATTTA	57.9	
ALG6	ALG6.1	ALG6-A	ATGCGTTCCTGGGACCC	61.0	945
		ALG6-R(E8)	CCTTTCCTTTGAGGCCTTTT	57.9	
	ALG6.2	ALG6-F(E7)	ATGCATCTGTGTATCCAGG	59.8	1103
		ALG6-R	TCCTGTGGTTCCATGGTTCTC	59.8	
DPM1	DPM1.1	DPM1-F	TTTCTAATTGAACCACGCATT	52.0	578
		DPM1-R2	GAGACAATATCAAAATTACCC	52.0	
	DPM1.2	DPM1-F2	CTACATCATTATTATGGATGC	52.0	571
		DPM1-R-9AS	ATGCATGAAATTTACCTTACC	52.0	
DPGAT1	DPGAT1.1	DPGAT1-F	GCTCAAGTCAGAGTTGCTG	56.7	870
		DGPAT1-1R	GAGCAATCCCAAAGTGGTG	56.7	
	DPGAT1.2	DPGAT1-2F	GAGTTGGAAGGTGATTGTGC	57.3	1059
		DPGAT1-R	GTCTCCATTGAGAGCATGTG	57.3	

Oligonucleótidos diseñados utilizando las secuencias [NM_000303.1](#) para el gen *PMM2*, [NM_002435.1](#) para el gen *MPI*, [NM_013339.2](#) para el gen *ALG6*, [NM_003859.1](#) para el gen *DPM1* y [NM_001382](#) para el gen *DPGAT1*, depositadas en las bases de datos públicas.

Para el estudio del **perfil transcripcional de los pacientes portadores de la mutación IVS7-9T>G** se diseñó, además, un oligonucleótido específico (*PMM2-E8*) cuya secuencia es 5'ATGGTCATTGCCACCCTGGAA3' que hibrida con el final del intrón 7 y el principio del exon 8 del gen *PMM2*. Para la RT-PCR se utilizó este primer junto con el oligo *PMM2 F*.

Los oligonucleótidos utilizados en la amplificación y secuenciación de las construcciones plasmídicas en pSPL3 (Life Technologies) se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos sintéticos empleados en la secuenciación de construcciones plasmídicas.

VECTOR	NOMBRE OLIGO	SECUENCIA 5' → 3'	T _m (°C)
PSPL3	SD6	TCTGAGTCACCTGGACAACC	54.0
	SA2	ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC	52.0

3.2.5.2 Amplificación de DNA genómico

Los exones de cada gen junto con sus secuencias intrónicas flanqueantes, incluyendo las secuenciasceptoras y donadoras se amplificaron mediante el diseño de primers específicos y se llevo a cabo en un termociclador Veriti de Applied Biosystem.

Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los distintos exones del gen *PMM2*

GEN	EXON	NOMBRE OLIGO	SECUENCIA 5' → 3'	Tm(°C)	TAMAÑO PCR (pb)
<i>PMM2</i>	1	PMM2-1S	GTCCTCGTGCCAACGTGTC	61.4	178
		PMM2-1AS	AGCCCCAACTGGGAACAGCA	61.4	
	2	PMM2-2S	GGTCTCTGATTATTGTGTGG	57.9	251
		PMM2-2AS	TAGGGCAGCCTATGATACTTG	57.9	
	3	PMM2-3S	TTCCTAGAGGCATTTCATTGTG	55.9	205
		PMM2-3AS	GTTTTGATTCTTTGCATTCTAAG	53.5	
	4	PMM2-4S	CTGGGTTTGTCTATGAAGCTG	57.3	219
		PMM2-4AS	CCATGTGACACTACGCTATG	57.3	
	5	PMM2-5S	AGGCTGTTTATCTATGTTGCC	55.9	235
		PMM2-5AS	CACCAGGCCATATCTTATTT	53.2	
	6	PMM2-6S	GCCAGTAGTTAAAACTGTGCT	55.9	206
		PMM2-6AS	CCACAACAAACTCTGGGAAAT	55.9	
	7	PMM2-7S	TCAGTGACATATCATTAGCCC	55.9	235
		PMM2-7AS	CCCCATCAAGCGCAAATGC	58.8	
	8	PMM2-8S	TCCAGGGTCACATCAGCAAT	57.3	260
		PMM2-8AS	GAGCACGTGTGGGAGGAC	57.3	

Oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia [ENST00000268261](#), depositada en las bases de datos públicas.

Además, para la amplificación del pseudoexón localizado en el interior del intrón 7 del gen *PMM2* se diseñaron dos primers específicos, PSEU-F de secuencia 5'GTGGCTGAGTTCCCAACTA3' y PSEU-R de secuencia 5'GGAGAATCAATTCCATCCAG3'.

Tabla 5. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los distintos exones del gen *MPI*

GEN	EXON	NOMBRE OLIGO	SECUENCIA 5' → 3'	Tm(°C)	TAMAÑO PCR (pb)
<i>MPI</i>	1	MPI-F-1S	CTGCCGGGAAAGGCATACGT	61.4	108
		MPI-1AS	ACGCGCTCCACGAACACACT	61.4	
	2	MPI-2S	TGAGGAGTGGAGTGGCAGCT	61.4	218
		MPI-2AS	TTTCTCCTGACCTGCGGGTAA	59.8	
	3	MPI-3S	TGGCAGGTTTCTTCCCCCTT	59.4	296
		MPI-3AS	ATAAGCCCTTCTGTACCCTGA	57.9	
	4	MPI-4S	TAATGGCTGTACCCTCACCAT	57.9	236
		MPI-4AS	TATCCCTGGCCAGTACGCA	61.4	
	5	MPI-5S	CTTACCATTCTGATATGGGC	57.9	264
		MPI-5AS	AGAGCATTGCACCCAACCAG	59.4	
	6	MPI-6S	AGCACTGAGTATCCCCCTAAG	59.8	253
		MPI-6AS	AGTGGGGCTACATGCTGAAAT	59.8	
	7	MPI-7S	GGCATACTTCATCAGCTTAGC	57.9	297
		MPI-7AS	GATTTTCATGGCACACGAAGG	57.9	
	8	MPI-8S	ATGAGAGCAGAGTCTGAGCT	57.3	322
		MPI-8AS	TTTAGGAACAGGTACCCCAA	55.9	

Oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia [ENST00000352410](#), depositada en las bases de datos públicas.

Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del exon 9 del gen *DPM1*

GEN	EXON	NOMBRE OLIGO	SECUENCIA 5' → 3'	Tm(°C)	TAMAÑO PCR (pb)
<i>DPM1</i>	9	DPM1-9S	ATCCTATTTCTGTTGTGTGG	54.0	327
		DPM1-R-9AS	ATGCATGAAATTACCTTACC	52.0	

Oligonucleótidos diseñados utilizando la secuencia [ENST00000371588](#), depositadas en las bases de datos públicas.

Tabla 7. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los exones 6 y 8 del gen *DPGAT1*

GEN	EXON	NOMBRE OLIGO	SECUENCIA 5' → 3'	T _m (°C)	TAMAÑO PCR (pb)
<i>DPGAT1</i>	6	DPGAT1-6S	GGCCCCAGGAATAGATGAAT	57.3	450
		DPGAT1-6AS	CCCTTTGCACAGCAAATGTA	55.3	
	8	DPGAT1-8S	CAGATCCAAGGGGAACTTGA	57.3	291
		DPGAT1-8AS	AGAAAGGGAGACACGGAGGT	59.4	

Oligonucleótidos diseñados utilizando la secuencia [ENST00000354202](#), depositadas en las bases de datos públicas.

Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl, con una concentración de MgCl₂ de 2 mM, dNTPs 200 µM, 1 µmol de cada oligonucleótido, 1 U FastStart Taq de Roche Applied Science y entre 0,5-1,5 µg de DNA genómico. La temperatura de hibridación osciló entre 50-60 °C según fuera la temperatura de fusión o *melting* del par de oligonucleótidos empleados en cada caso (Tabla 4, 5, 6 y 7).

Para el estudio y amplificación de inserciones mediante separación alélica de un mismo gen se utilizó el kit *TOPO TA Cloning PCR 2.1-Topo Vector* de Invitrogen.

3.2.6 Purificación de fragmentos de DNA

La purificación de fragmentos de DNA inferiores a 1 Kb, obtenidos tras amplificación por PCR o resultantes de digestión enzimática, se realizó con los productos *SpinClean PCR Purification Kit* de MBIotech, siguiendo instrucciones de los proveedores. En el caso de fragmentos de mayor tamaño, la purificación se llevó a cabo empleando *QIAEX® II Gel Extraction kit* (Qiagen).

3.2.7 Secuenciación de DNA

La secuenciación cíclica directa se realizó empleando el método enzimático de terminación de cadena de DNA por incorporación de dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) descrito por (Sanger et al. 1977). Las reacciones se llevaron a cabo junto con oligonucleótidos sintéticos no fluorescentes y utilizando el kit *BigDe™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing* de Applied Biosystems, siguiendo el protocolo suministrado por el proveedor y los productos obtenidos fueron resueltos en un secuenciador automático *ABI Prism® 3730* de Applied Biosystems.

En las reacciones de secuenciación de productos amplificados por PCR se emplearon 300 ng de DNA y para la secuenciación de construcciones plasmídicas se empleó una cantidad de 300-500 ng de DNA.

La secuenciación de productos amplificados por PCR se llevó a cabo con oligonucleótidos de igual secuencia a los empleados en las reacciones de amplificación.

3.2.8 Electroforesis bidimensional (2-DE) de proteínas séricas

Se diluyeron los sueros de pacientes directamente en un buffer de lisis que contiene urea 8.4 M, tiourea 2.4 M, CHAPS 5% y TCEP-HCl 2 mM. Para incrementar la resolución e intensificar las proteínas de baja expresión, los sueros fueron previamente tratados con un kit que elimina la albúmina y las inmunoglobulinas IgG (de Amersham Biosciences) y el pellet obtenido fue resuspendido igualmente en el buffer de lisis.

En todos los casos se midió la concentración de proteína por Bradford y se cargó 90-100 µg de proteína total. La primera dimensión se llevó a cabo como fue descrita por (Richard et al. 2006). La separación de proteínas se realizó con una tira IPG de 18 cm y rango de pH 3-10 ó 4-7 de GE Healthcare en una unidad de electroforesis Ettan IPGphor Isoelectric focusing de GE Healthcare, ajustándose a las recomendaciones de la casa comercial.

La separación de la segunda dimensión se realizó en geles de SDS- poliacrilamida al 10%, corriendo cada gel a 6 mA durante 15 horas a 4°C y posterior tinción con plata.

Se recogieron manualmente *spots* de 3 mm³ que fueron colocados en placas de 96 pocillos y automáticamente procesados utilizando un Investigator™ ProGest digestion station donde las muestras son reducidas en gel, alquiladas con iodoacetamida y digeridas con tripsina (Shevchenko et al. 1996). Posteriormente se analizaron por MALDI-TOF.

3.2.9 Mutagénesis dirigida

Las variantes alélicas **D65Y, V44A, L32R, F207S, F157S, D209G, R141H, T237M, P184T, T118S, P113L, R123Q R238H, C241S y E197A** del gen *PMM2* fueron introducidas en el vector de expresión procariota pDEST15 de Rzpd que porta la secuencia del cDNA *PMM2*.

La mutagénesis dirigida mediante el proceso de PCR se realizó con el kit *QuikChange™ Site Directed Mutagenesis* de Stratagene utilizando los *primers* específicos que se indican en la tabla 8.

Todos los clones mutantes fueron comprobados y seleccionados como portadores de la mutación correspondiente mediante secuenciación cíclica directa del DNA plasmídico resultante.

Tabla 8. Oligonucleótidos sintéticos empleados en la mutagénesis dirigida.

MUT.	SECUENCIA 5' → 3'	SECUENCIA 3' → 5'	cDNA PMM2 NM_000303.1
D65Y	GTGGTTGAAAAATACTATTATGTGTTCCAG	CTGGAAACACATAATAGTATTTTCAACCAC	178-208
L32R	GAAATGGATGACTTCCGCCAAAAATTGAGG	CCTCAATTTTGGCGGAAGTCATCCATTC	79-108
R141H	CCAAGAAGAACAATTGAGTTCTACGAAC	GTTTCGTAGAACTCAATGTGTTCTTCTGG	411-439
T237M	GCCTGAGGACATGCGCAGGATCTG	CAGATCCTGCGCATGTCCTCAGGC	699-722
P113L	CGAAAATTAACCTCTGAAGAAGAGGGG	CCCCTTCTTCCAGGAGTTTAATTTTCG	322-350
D209G	TTATTTCTTGGAGGCAAAACTATGCCAG	CTGGCATAGTTTTGCCCTCAAAGAAATAA	612-640
F207S	CCATTTATTCTCTGGAGACAAAACATGC	GCATAGTTTTGTCTCCAGAGAAATAAATGG	608-637
F157S	GACAAAAGTCTGTAGCAGATCTACGAAAAG	CTTCCGTAGATCTGCTACAGACTTTTGTG	461-590
P184T	CTTTGATGCTTTACTGATGGATGGGAC	GTCCCATCCATCAGTAAAGACATCAAAG	537-564
V44A	CAAAATCGGAGTGGCAGGCGGATCG	CGATCCGCCTGCCACTCCGATTTTG	117-141
T118S	GAAGAGGGGTAGTTTCATTGAATTCCG	CGGAATCAATGAAACTACCCCTCTTC	342-368
R123Q	CATTGAATTCCAAAATGGGATGTAAACG	CGTTTAACATCCCATTGTGGAATTCAATG	357-385
R238H	GAGGACACGCACAGGATCTGTGAAC	GTTACAGATCCTGTGCGTGTCTC	703-726
C241S	CGCAGGATCTCTGAACTGCTGTCTC	GAGAACAGCAGTTCAAGATCCTGCG	712-737
E197A	CGACATGTGGCAAAATGACGGTTATAAG	CTTATAACCGTCATTGCCACATGTCG	580-606

La base que introduce la mutación en la reacción de mutagénesis dirigida se muestra en rojo.

Se muestra la localización de cada oligonucleótido en la secuencia del cDNA *PMM2* (Ensembl, código de acceso [NM_000303.1](#)), siendo el nucleótido +1 la adenosina del ATG iniciador de la traducción.

3.2.10 Expresión de mutaciones *missense* en *E. coli*

Para la expresión de mutaciones se utilizó el vector plasmídico pDEST15 de Rzpd, portador del cDNA de *PMM2* en fase de lectura con la proteína GST (Fig. 7) y al que se le han introducido las distintas variantes alélicas por mutagénesis dirigida.

Se transformaron las células XL1-Blue de Stratagene con el vector conteniendo el gen *PMM2* salvaje y con las mutaciones en estudio incorporadas. La selección de los clones positivos se realizó por resistencia a ampicilina y se confirmó por secuenciación.

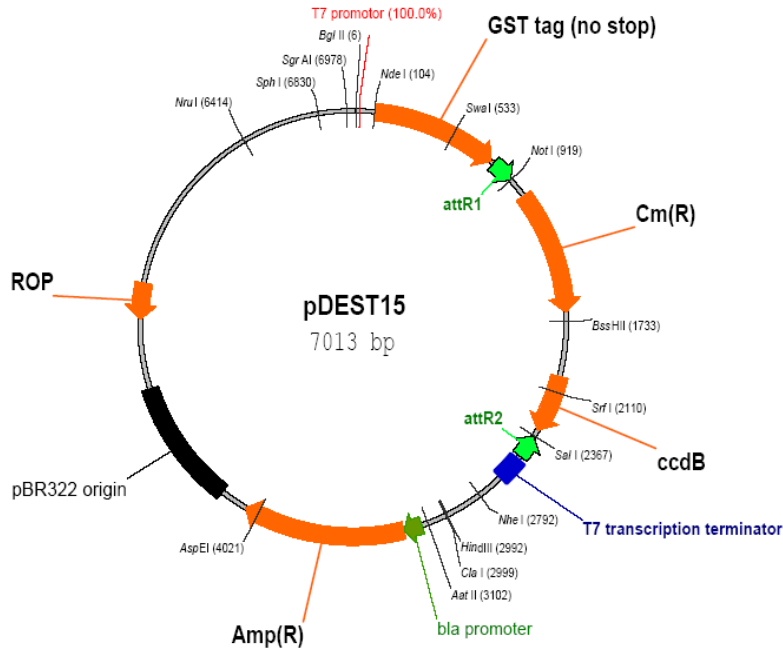


Figura 7. Esquema del vector pDEST15.

De cada clon se preparó un pre-cultivo de 18h, a partir del cual se creció a 26 ó 37°C un cultivo hasta una densidad óptica de 0.6-1 a 600 nm, al cual se le añadió IPTG 1 mM dejando actuar al menos 5 horas. Se centrifugó 5 minutos a 5000 rpm y el pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de un medio que contiene HEPES 20 mM con KCl 25 mM, DTT 1 mM e inhibidor de proteasa *Complete, Mini, EDTA-Free* de Roche. La rotura celular se llevó a cabo por sonicación durante 5 segundos 3 veces con descansos de otros 5 segundos y para la eliminación de las estructuras celulares se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm. Con el sobrenadante se realizó la determinación enzimática.

La medida de la actividad PMM 2 se llevó a cabo a 37°C con 500 ng de proteína total, medida por Bradford (Bradford 1976), en una mezcla que contiene HEPES 50 mM pH 7.1, MgCl₂ 10 mM y NADP 1.2 mM. Además se añadió glucosa-6-P deshidrogenasa 2.8 U/ml, fosfoglucoisomerasa 20 µg/ml, fosfomanoisomerasa 8 µg/ml, glucosa 1,6 diP 200 µM y manosa-1-P 0.8 mM. Se para la reacción a los 30 minutos con tampón NaHCO₃ / Na₂CO₃ 0.5 M pH 10.7. La lectura de la actividad se hizo a 340 nm en un Microplate Reader 680XR de Bio-Rad.

3.2.11 Electroforesis, transferencia e inmunodetección de la PMM 2 (Western blot)

Para el análisis de proteína PMM 2 mediante *Western Blot*, los pellets obtenidos de fibroblastos de piel de pacientes CDG Ia, hepatoma o de bacterias se resuspendieron en una solución HEPES 20 mM con KCl 25 mM, DTT 1 mM y Pefabloc 0,2 mM y se sometieron a tres ciclos sucesivos de congelación/descongelación en N₂ líquido y posterior centrifugación. La

determinación de la concentración de proteínas se llevó a cabo mediante cuantificación por el método de Bradford (Bradford 1976) empleando el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad). La misma cantidad de extracto proteico (10 µg en el caso de de fibroblastos de pacientes y de la proteína expresada en hepatoma, 150 µg en el caso de fibroblastos transfectados con AMOs y 1 µg en el caso de la proteína expresada en bacterias.) fue sometida a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%. La electroforesis se llevo a cabo en el aparato Mini-Protean (Bio-Rad), empleando una solución Tris25 mM, 250 mM glicina, 0,1% (p/v) SDS.

La proteínas separadas por SDS-PAGE, fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa (*Millipore*) y detectadas mediante tinción con Rojo Ponceau (Harlow and Lane 1988). La inmunodetección de la proteína PMM 2 se realizó utilizando anticuerpo policlonal comercial anti-PMM 2 de ratón a una dilución 1/1000 (Abnova) y como anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Santa Cruz) a una dilución 1/10000 (V/V). La visualización de los complejos formados se llevó a cabo mediante el desarrollo de una reacción quimioluminiscente en presencia del reactivo ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech) durante 1 minuto y posterior impresión de una película fotográfica durante 15 y 30 minutos. La cuantificación de los niveles de proteína inmunorreactiva se realizó mediante densitometría láser, utilizando el densitómetro Bio-Rad GS-710 Calibrated Imaging Densitometer (Bio-Rad).

3.2.12 Estudios de estabilidad de proteínas *in vitro*.

Se realizó el análisis de estabilidad de las proteínas de fusión PMM 2 normal y mutantes expresadas en *E. coli* incubando a 37°C el extracto proteico obtenido de cada clon bacteriano por sonicación y cuya concentración de proteínas totales se ha medido por el método de Bradford.

De cada extracto se recolectaron alícuotas de igual volumen cada 2 horas, teniendo en cuenta que la alícuota inicial, es decir a tiempo 0 siempre contiene 1 µg de proteína total. Mediante una representación gráfica de las medidas densitométricas obtenidas a partir de la proteína inmunorreactiva detectada en cada alícuota por *Wester blot*, se calculó la vida media tanto de la proteína salvaje como de las proteínas mutantes.

3.2.13 Análisis cuantitativo de la expresión del gen *PMM2* mediante qRT-PCR

Los niveles de expresión del gen *PMM2* se analizaron mediante cuantificación del cDNA por PCR a tiempo real (qRT-PCR).

Se extrajo el RNA total de fibroblastos de piel de las distintas líneas celulares mediante TriPure de Ambion, se analizó la calidad del mismo mediante el Bioanalizador Agilent 2100 que permite realizar ensayos electroforéticos del RNA pudiendo visualizarse en formato gel o en un perfil de picos (electroferograma).

Para la *qRT-PCR* del mRNA del gen *PMM2* se utilizaron sondas Universal Probe (S48) de Roche y oligonucleótidos específicos 5'GGACTTTGAGAAAGTGCAGGA3' y 5'AAGCCATTTTCTGGAAACACAT3' diseñadas usando el probeFinder Software (Universal Probe Library) de Roche Applied Science. La retrotranscripción se llevó a cabo con el Archive kit de Applied Biosystems utilizando 1µg de RNA total y siguiendo las recomendaciones del proveedor. Para la PCR se utilizó la TaqMan 2X Universal PCR Master Mix No Amperease ONG (Applied Biosystems).

La amplificación y análisis se realizó en un aparato ABIPRISM 7900 HT utilizando el programa qBase suministrado por la casa con el mismo nombre. La eficiencia de la amplificación fue estandarizada mediante la retrotranscripción y posterior amplificación en paralelo del mRNA del gen constitutivo rRNA 18s.

Para llevar a cabo la cuantificación, una vez obtenidos los datos de *crossing point* (Cp) o *cycle threshold* (Ct) de la PCR a tiempo real tanto para el gen de interés como para los constitutivos se llevó a cabo el tratamiento matemático para obtener finalmente el parámetro (RQ) *relative quantity* que nos permite calcular y comparar la cantidad de mRNA en los distintos extractos celulares, siendo calculado según la siguiente fórmula:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct} ; \Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ de una muestra} - \Delta Ct \text{ la muestra de referencia})$$

$$\Delta Ct = (Ct \text{ del gen de estudio} - Ct \text{ del gen constitutivo [rRNA 18s]})$$

3.2.14 Clonaje en el vector pSPL3. Minigenes.

La construcción de los distintos minigenes se realizó en el vector de *splicing* pSPL3 (*Exon Trapping System*, Life Technologies) (Figura 8)

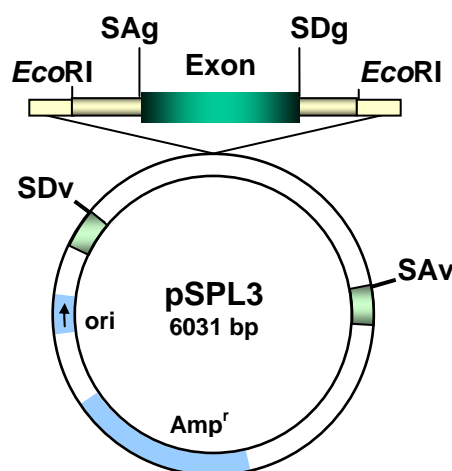


Figura 8. Esquema del vector pSPL3. SDv: Sitio donador de *splicing* del vector. SAv: Sitio aceptor de *splicing* del vector. Amp^r: Gen de resistencia a ampicilina. SDg: Sitio donador de *splicing* del exon introducido. SAg: Sitio aceptor de *splicing* del exon introducido.

Para evaluar el mecanismo de *splicing* de las mutaciones **IVS3-1G>C** e **IVS7-15479C>T**, los fragmentos génicos correspondientes a los exones 3 y 4 o el pseudoexon, respectivamente, del gen *PMM2* junto con sus regiones intrónicas adyacentes, se amplificaron por PCR a partir de DNA genómico de controles y de los pacientes portadores de los cambios nucleotídicos a estudiar. Los fragmentos resultantes de la amplificación fueron clonados en el vector *TOPO TA Cloning PCR 2.1-Topo Vector* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor. El fragmento introducido en cada caso fue escindido del vector con el enzima de restricción *EcoRI* y clonado en el vector plasmídico pSPL3 digerido previamente con el mismo enzima y desfosforilado para evitar la recircularización.

Para el estudio del efecto producido en el mecanismo de *splicing* por la mutación **IVS7-9T>G** se requirió la construcción de un exon artificial formado por el exon 8 con su 3' aceptor de *splicing* fusionado al exon 2 del mismo gen que le aportara el sitio 5' donador de *splicing*. Para ello, se amplificó la secuencia entera del exon 8 con los *primers* PMM2A-NotI y PMM2B y se amplificó la secuencia entera del exon 2 con los *primers* PMM2A y PMM2B-BamHI. Posteriormente, el exon 8 fue digerido con las enzimas de restricción NotI y AlwI, y el exon 2 con AlwI y BamHI. Los fragmentos fueron clonados en el vector TOPO y escindidos usando BamHI y NotI. La construcción obtenida se introdujo en el vector pSPL3 y la transcripción del minigen se analizó por RT-PCR.

Las diferentes construcciones normales y mutantes en la orientación correcta fueron seleccionadas por análisis de restricción y secuenciación cíclica directa.

3.2.15 Transfección de líneas celulares primarias y establecidas

Para ver el efecto producido por los oligonucleótidos antisentido (AMOs) en el perfil transcripcional, expresión y actividad de la proteína PMM 2, 6×10^5 **fibroblastos de piel** del paciente con CDG Ia fueron cultivados en botellas de 25cm² para la RT-PCR y la medida de actividad, y 18×10^5 fibroblastos en botellas de de 75 cm² para el *Western blot*. Se añadieron los AMOs 24 horas después de la siembra a una concentración final de 10 μ M ó 20 μ M. Para la transfección se utilizó Endo-Porter (Gene Tools) a una concentración final de 6-8 μ M. El tiempo de cultivo tras la adición del Endo-Porter y los AMOs fue de 48-72 horas. Posteriormente, se recogieron las células y se guardó el precipitado celular a -70°C (hasta su utilización).

La secuencia de los oligonucleótidos tipo morfolininos (Tabla 9) utilizados en la modulación de *splicing* fueron diseñados, sintetizados y purificados por GeneTools.

Tabla 9. Oligonucleótidos tipo morfolininos diseñados para la modulación del *splicing* en el gen *PMM2*.

Oligo	Secuencia 5' → 3'	Gen diana
AMOA	TAGCTGCAAAGCAAGTGAAGCGGAC	<i>PMM2</i> ENST00000268261
AMOB	ATCACAACACAACCTACCTCAGGC	

Los experimentos de expresión de minigenes se llevaron a cabo cultivando 4×10^5 células **Hep3B de hepatoma humano** en placas estandarizadas P6. Las transfecciones se llevaron a cabo en medio MEM completo, utilizando 6 μ l de Jetpei (*Lipofectin*[®] Reagent, Invitrogen) y 1.5 μ g de la construcción plasmídica pSPL3 normal o mutante.

En los experimentos para ver el efecto de la sobreexpresión de factores de *splicing* se cotransfectó Hep3B con el minigen adecuado y hasta 4 μ g de vectores portadores de distintos factores de *splicing*: SRp40, SRp55, SC35, SF2/ASF, U2AF³⁵ y U2AF⁶⁵ utilizando 8 μ l de Jetpei (*Lipofectin*[®] Reagent, Invitrogen).

Las células fueron recogidas a las 48-72 horas de la transfección por tripsinización, lavadas con PBS y congeladas a -70°C hasta su utilización.

3.2.16 Soporte informático

Las secuencias tanto de los cDNAs como de los DNAs genómicos de los genes *PMM2*, *MPI*, *ALG6*, *DPM1* y *DPGAT1* fueron obtenidas mediante búsqueda informática en la base de datos pública Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>).

El tratamiento de imágenes digitales y densitometría de las mismas se realizó mediante los programas Kodak Digital Science 1D 2.0.3. (Kodak Scientific Image Systems) y Quantity One 4.3.1 (Bio-Rad).

El procesamiento y análisis de secuencias de DNA se llevó a cabo con los programas Chromas 1.45 (Griffith University, Australia) y Prophet 5.0 (BNN Systems and Technologies).

La identificación de los posibles sitios aceptores y donadores de *splicing* en una determinada secuencia se realizó con el programa informático *Splice Site Prediction* de BDGP (http://www.fruitfly.org/seq_tools/other.html).

La visualización de la estructura tridimensional de la PMM 2 se realizó mediante la búsqueda en la base de datos 3d Domains del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=domains>) y la localización de los aminoácidos mutados en las distintas variantes alélicas se realizó con el soporte informático DS ViewerPro5.0 de Accelrys Inc.

La búsqueda de secuencias homólogas se llevo a cabo en la bases de datos públicas Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). Para el alineamiento interespecífico de las secuencias homólogas obtenidas se empleó el programa CLUSTALW de EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

Las estimaciones estadísticas se llevaron a cabo con la prueba Prueba-T realizada en Microsoft Office Excel 2003.

4. RESULTADOS

4.1 DIAGNÓSTICO BIOQUÍMICO Y ENZIMÁTICO DE LOS DEFECTOS CONGÉNITOS DE GLICOSILACIÓN.

Durante el transcurso de este trabajo se ha medido el porcentaje de transferrina deficiente en carbohidratos (%CDT) en más de 4000 sueros/plasmas de niños con sospecha de enfermedad metabólica recibidos en el laboratorio. Se considera transferrina deficiente en carbohidratos al conjunto formado por las isoformas di-, mono- y asialiladas de la proteína. De esta manera, se seleccionaron 45 pacientes cuyo suero presentaba un %CDT>3, valor de referencia en la población pediátrica, a los cuales se les realizó el estudio de 3 proteínas séricas glicosiladas (transferrina, α 1-antitripsina y apolipoproteína CIII) para poder clasificarlos en pacientes con CDG I, II o pacientes con Defectos Combinados en la N- y O-glicosilación.

4.1.1 Isoelectroenfoque (IEF) de Transferrina (Tf)

Cuando se realizó el análisis de la transferrina mediante IEF en individuos control se observó un patrón típico caracterizado por predominio de la isoforma tetrasialilada de la proteína (Fig.9, carril C y D) mientras que los 45 sueros seleccionados presentaban patrones anómalos: 32 con un patrón tipo 1 caracterizado por aumento de las formas di- y asialiladas de la transferrina (Fig. 9, carril A) y 13 con distintos patrones tipo 2, caracterizados por un aumento variable de cualquiera de las isoformas hipoglicosiladas de la proteína (Fig. 9, carril B).

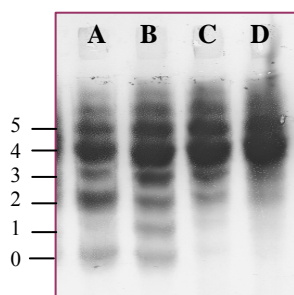


Figura 9. Isoelectroenfoque de transferrina sérica.

A la izquierda de la figura se indica el número de ácidos siálicos que tiene unida cada isoforma de la transferrina. **A** patrón tipo 1 típico de CDG I. **B** patrón tipo 2 típico de pacientes CDG II. **C** y **D** patrones de individuos control.

Tipificadas las muestras en patrones tipo 1 y 2, faltaba descartar que esos patrones anómalos fueran debidos a que los pacientes presentaran una variante aminoacídica o subtipo de la Tf debido a una alteración de la glicosilación de forma secundaria.

Para descartar una variante alélica de la Tf, se realizó el tratamiento de las muestras con neuraminidasa y se volvieron a analizar por IEF. Como la neuraminidasa proporciona la transferrina libre de grupos siálicos, dejando toda la proteína en estado asialilado, aquellas muestras que presentaron dos bandas presentarían, en principio, un polimorfismo aminoacídico para la misma (Fig. 10).

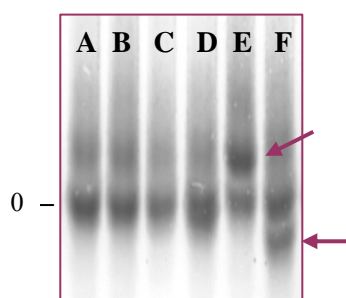


Figura 10. Isoelectrofoque de transferrina sérica tras el tratamiento con neuraminidasa. A la izquierda de la figura se señala la banda que corresponde a la forma asialilada de la proteína. *A, B, C y D* son muestras con la variante alélica más común de la Tf. Sin embargo *E y F* presentan además otra variante alélica o subtipo de la Tf, indicada con una flecha.

De los 32 pacientes que presentaron patrón tipo 1 sólo uno presentó una variante alélica de la transferrina, sin embargo de los 13 pacientes con patrón tipo 2, 7 presentaron un polimorfismo de la proteína.

Posteriormente de los 31 pacientes restantes con patrón tipo 1, 3 fueron diagnosticados como defectos secundarios de glicosilación: 2 Galactosemias y 1 Intolerancia a la Fructosa. En la Tabla 10 se resumen los resultados obtenidos en el IEF de la Tf.

Tabla 10. Clasificación de pacientes mediante el análisis de transferrina por isoelectrofoque.

PATRÓN	CLASIFICACIÓN	Nº de Pacientes
Tipo 1	CDG I	28
	POLIMORFISMO AMINOACÍDICO	1
	GALACTOSEMIA	2
	INTOLERANCIA A LA FRUCTOSA	1
Tipo 2	CDG II	6
	POLIMORFISMO AMINOACÍDICO	7

Otra de las aplicaciones del estudio de las isoformas de la Tf sérica ha sido el seguimiento terapéutico de un paciente CDG Ib. De esta forma, se analizó el efecto que produce la administración oral de manosa en el patrón de glicosilación de este biomarcador (Fig. 11).

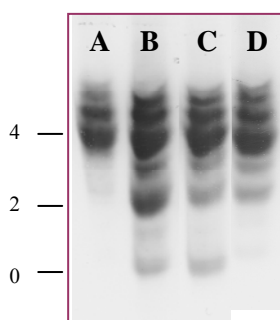


Fig. 11. Isoelectrofoque de la transferrina sérica de un paciente CDG Ib tras recibir tratamiento. A la izquierda se indica el grado de glicosilación de las diferentes isoformas de la transferrina. A: control. B: paciente al diagnóstico (6 m) con un %CDT en suero de 42%, desnutrición, hepatomegalia (5cm) y anemia microcítica. C: paciente (7 m) en tratamiento con manosa a dosis de 150 mg/kg x 4 dosis, en este momento el %CDT sérico era 24% y mejora de la curva de peso. D: paciente 6 meses después de subir la dosis de manosa a 200mg/kg x 4, el %CDT bajó al 6%, curva de peso ascendente y estudio de coagulación normal.

Los resultados nos muestran que con la administración oral de manosa no sólo mejora la sintomatología clínica del paciente sino también los parámetros bioquímicos, pues además de una bajada en el %CDT podemos ver como el patrón de glicosilación de la Tf se normaliza.

4.1.2 IEF de α_1 -antitripsina (α_1 -AT)

Con el objetivo de analizar de forma complementaria otra glicoproteína sérica de origen hepático, se analizó la α_1 -AT sérica de 30 individuos control (Fig. 12), de 17 pacientes con patrón tipo 1 en la transferrina clasificados como CDG I, de 6 pacientes con patrón tipo 2 en la transferrina clasificados como CDG II (Fig. 13) y los 8 individuos que presentaban un polimorfismo aminoacídico para la transferrina (Fig. 14).

El resultado obtenido en los sueros control muestra un patrón de glicosilación de la α_1 -AT más complejo que el de la Tf, con la aparición de hasta 7 isoformas sialiladas (Fig. 12).

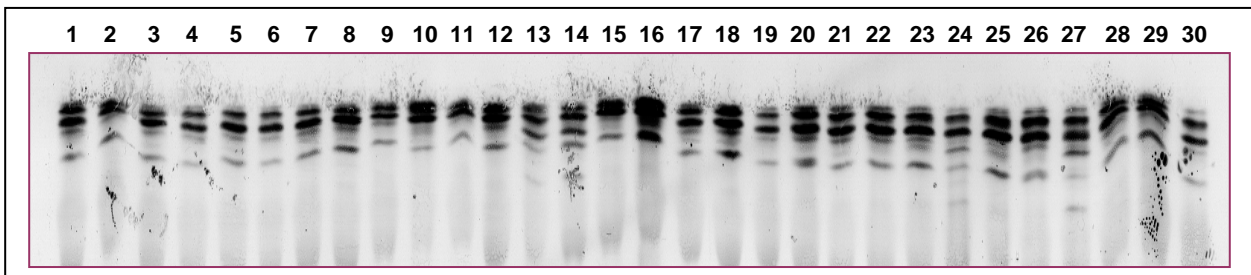


Figura 12. Isoelectroforesis de α_1 -antitripsina de 30 individuos controles. El patrón típico presenta de 4 a 7 isoformas.

En todos los sueros de los pacientes catalogados como CDG I observamos la aparición de una o varias bandas correspondientes a isoformas hipoglicosiladas que no están presentes en los controles. Sin embargo, sólo en 3 de los 6 sueros de pacientes catalogados como CDG II se observa una de las isoformas hipoglicosiladas característica (Fig. 13).

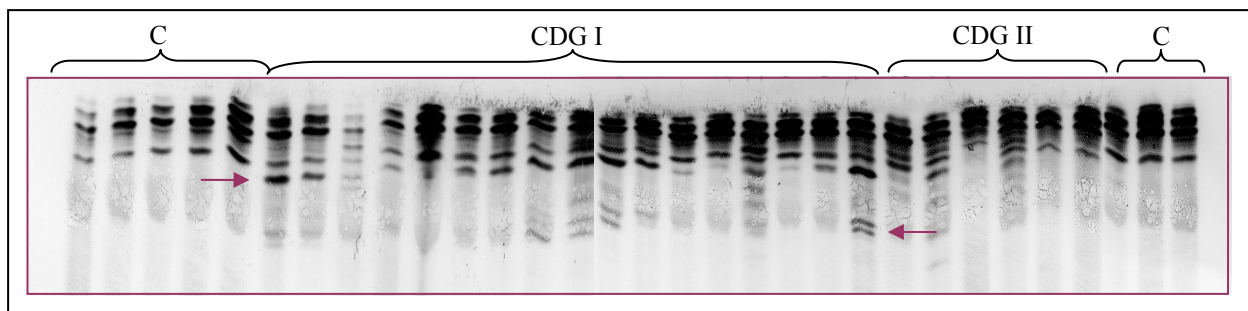


Figura 13. Isoelectroforesis de α_1 -antitripsina de pacientes con un posible CDG clasificados previamente con el IEF de la transferrina. En la figura se indican con flechas las bandas de hipoglicosilación presentes en los pacientes y que no están presentes en los controles (C).

Por último, se analizaron los sueros de los 8 individuos que presentan alguna variante aminoacídica de la Tf, que como era esperable todos presentaron un patrón normal para la α_1 -AT (Fig. 14), excepto uno que presentó una banda de hipoglicosilación (Fig. 14, carril E). Este resultado permitió sospechar que el paciente podría tener un CDG y además presentar una variante alélica de la transferrina.

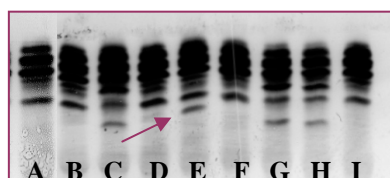


Figura 14. Isoelectroforesis de α 1-antitripsina de pacientes que presentan distintas variantes alélicas de la transferrina. A control. B-D, F-I pacientes que presentan patrón normal. E paciente que presenta banda de hipoglicosilación (indicada con una flecha).

4.1.3 IEF de Apolipoproteína CIII (Apo CIII)

Se conoce la existencia de defectos combinados de N- y O-glicosilación debido a deficiencias en algún enzima del aparato de Golgi común en ambas rutas. Para poder detectar este tipo de defectos se analizó mediante IEF el patrón de glicosilación de una O-glicoproteína tipo mucina, la apolipoproteína CIII, en aquellas muestras que presentaban un patrón tipo 2 de la transferrina ya que los pacientes con defectos en la N-glicosilación con deficiencias en enzimas localizadas en el aparato de Golgi muestran alteraciones en el patrón de esta glicoproteína.

Analizando 20 sueros de individuos control se determinó un patrón típico normal caracterizado por la presencia de dos bandas de igual intensidad correspondientes a las formas di- y monosialiladas de la proteína. Además se detectaba una tercera banda de baja intensidad correspondiente a la forma asialilada de la Apo CIII (Fig.15, carril A).

Posteriormente, se analizaron un total de 6 sueros de pacientes catalogados como CDG II, en busca de posibles Defectos Congénitos Combinados de la N- y O-glicosilación. El resultado obtenido fue que en todos los casos encontramos un patrón normal, es decir, ninguno de nuestros pacientes parecía presentar una alteración de la O-glicosilación tipo mucina (Fig. 15).

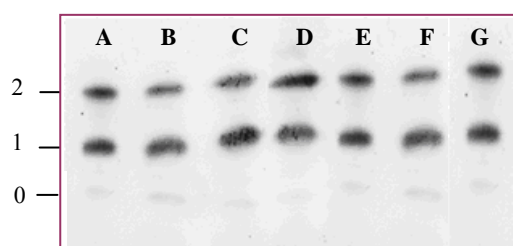


Figura 15. Isoelectroforesis de Apo CIII. A control. B-G pacientes clasificados con CDG II a partir del IEF de la Tf. A la izquierda de la figura se indica el número de grupos siálicos unidos a la proteína.

4.1.4 Determinación de las actividades PMM 2 y PMI

Una vez clasificados los pacientes en CDG I y II nuestro propósito fue identificar el defecto genético responsable de la patología en cada uno de ellos. Se procedió primero al análisis enzimático de los pacientes clasificados como CDG I para identificar dos de las formas más frecuentes de estos defectos; CDG Ia causado por un defecto en la proteína

fosfomanomutasa 2 (PMM 2) y CDG Ib causado por un defecto en la proteína fosfomanoisomerasa (PMI).

Se realizó la medida de las actividades enzimáticas PMM 2 y PMI a partir de fibroblastos de piel cultivados, según un método espectrofotométrico basado en la medida de NADPH a 340nm producido por la reducción del NADP por la actividad de la glucosa-6P-deshidrogenasa (de Koning et al. 1998; Van Schaftingen and Jaeken 1995).

Se analizaron las actividades enzimáticas de 20 de los 28 pacientes catalogados como CDG I, del resto de los pacientes no se disponía de fibroblastos de piel en el laboratorio. Además se incluyeron en el estudio fibroblastos de 17 individuos control. Las figuras 16 y 17 muestran los resultados obtenidos.

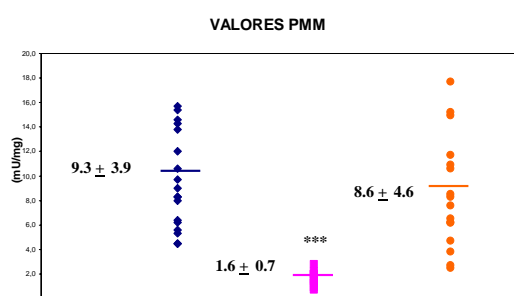


Figura. 16. Representación gráfica de la medida de la actividad PMM 2. Cada rombo indica la actividad PMM 2 de los individuos control, los cuadrados la actividad PMM 2 de los individuos que presentan valores deficientes y los círculos la actividad PMM 2 del resto de los pacientes CDG I. Las líneas horizontales señalan los valores PMM 2 medio de los resultados obtenidos. *** indica el grado de significación estadística con $p < 0.001$.

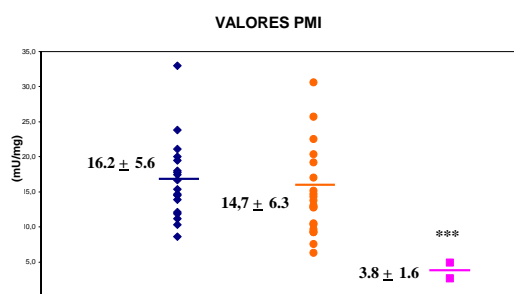


Figura. 17. Representación gráfica de la medida de la actividad PMI. Cada rombo indica la actividad PMI de los individuos control, los cuadrados la actividad PMI de los individuos con valores deficientes y los círculos la actividad PMI del resto de los pacientes CDG I. Las líneas horizontales señalan el valor PMI medio de los resultados obtenidos. *** indica el grado de significación estadística con $p < 0.001$.

En los controles se obtuvo un valor medio de actividad PMM 2 de 9.35 ± 3.9 mU/mg de proteína y de actividad PMI 16.2 ± 5.6 mU/ mg de proteína y un ratio PMI/PMM 2 de 1.9 ± 0.5 .

De la medida de nuestros pacientes con CDG I se obtuvo que 8 presentaban una actividad PMM 2 significativamente deficiente ($p < 0.001$) entre 0.7-2.8 mU/mg de proteína total (de un 7% a un 31 % de la media de controles) y un ratio PMI/PMM 2 patológico entre 3.7-21, siendo diagnosticados como CDG Ia (Tabla 11). Además 2 pacientes mostraban actividad PMI significativamente deficiente ($p < 0.001$), 2.6-4.9 mU/mg de proteína total (de un 16% a un 30% de la media de controles), siendo diagnosticados como CDG Ib (Tabla 11). El resto de los pacientes con actividades PMM 2, PMI y ratio PMI/PMM 2 dentro de los valores control fueron clasificados como CDG Ix.

Tabla 11. Medida de las actividades PMM 2 y PMI de pacientes CDG I.

PACIENTE	ACTIVIDAD PMM 2 (mU/mg)	PMI (mU/mg)	PMI / PMM 2	DIAGNÓSTICO
17568	2.8	10.3	3.7	CDG Ia
18440	2.0	9.2	4.6	
18818	2.0	13.7	6.9	
19042	2.2	20.3	9.2	
20484	0.9	7.4	8.6	
20682	1.5	15.1	10.1	
22692	0.7	14.7	21.0	
22988	1.3	19.2	14.7	
19484	6.2	2.6	0.42	
25058	8.5	4.9	0.57	
C (n=17)	9.3 ± 3.9	16.2 ± 5.6	1.9 ± 0.5	

C corresponde a los media de controles. Las actividades se expresan en mU/mg proteína, siendo una mU los nmoles de NADPH producidos por minuto.

4.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS PACIENTES CON CDG.

Se realizó la caracterización molecular de los pacientes mediante búsqueda de mutaciones causantes de enfermedad en los genes implicados en cada defecto. En aquellos pacientes que presentaron una deficiencia en el enzima PMM 2, se realizó el análisis mutacional en el gen *PMM2*. Del mismo modo, en aquellos pacientes que presentaron actividad PMI deficiente, por lo tanto, diagnosticados como CDG Ib se realizó una búsqueda de mutaciones en el gen *MPI*. En el resto de pacientes catalogados como CDG Ix, y con el objetivo de finalizar el diagnóstico se llevó a cabo un *screening* mutacional en diversos genes de la ruta, en función de la sintomatología, frecuencia del defecto o procedencia de los pacientes.

4.2.1 Estudio genético de los pacientes con Defecto Congénito de Glicosilación Ia: análisis del gen *PMM2*.

Se llevó a cabo el estudio genético del gen *PMM2* en un total de 14 muestras. Se analizaron fibroblastos de piel de los 8 pacientes con deficiencia en la actividad PMM 2 (CDG Ia), sangre en papel de un paciente hermano de uno de los anteriormente citados y sangre total de 5 pacientes remitidos a nuestro laboratorio únicamente para realizar el estudio genético.

Los distintos cambios alélicos en el gen *PMM2* fueron detectados por secuenciación cíclica directa del cDNA y/o en los exones correspondientes del gen. Inicialmente el estudio molecular se llevó a cabo a nivel de mRNA mediante retrotranscripción y posterior amplificación por PCR a partir de RNA total y con oligonucleótidos diseñados para que hibriden en las zonas 5' UTR y 3'UTR. Una vez fueron detectados los cambios nucleotídicos

en el cDNA, el análisis molecular del gen *PMM2* a nivel del DNA genómico permitió identificar y confirmar la presencia de dichos cambios en los exones correspondientes, así como determinar el carácter homocigoto o heterocigoto del paciente para cada mutación. Para ello, se analizaron los exones y las secuencias adyacentes, lo que nos permitió detectar el 100% de las distintas variantes alélicas presentes en nuestros pacientes.

Se pudo determinar los genotipos causantes de enfermedad de 14 pacientes pertenecientes a 13 familias no relacionadas, identificándose 18 variantes alélicas distintas. Se encontró una alta frecuencia de heterocigotos, del 92%, ya que tan sólo hay un paciente que presenta la mutación T237M en homocigosis (Tabla 12).

Mediante el estudio en DNA de los padres se confirmó en “*trans*” la presencia de ambas mutaciones y en el paciente homocigoto, se confirmó la ausencia de una delección que comprendiera dicha mutación.

El espectro mutacional encontrado (Fig. 18) incluye 13 cambios puntuales de probable cambio aminoacídico todos ellos descritos previamente (L32R, V44A, D65Y, P113L, R123Q, R141H, F157S, R162W, F183S, E197A, T237M y T226S (Matthijs et al. 2000) y F207S descrita como F206S (<http://www.euroglycanet.org/>)). Los nuevos cambios nucleotídicos encontrados incluyen 3 mutaciones de probable cambio aminoacídico (D209G, P184T y T118S) y 2 que afectarían al correcto procesamiento del mRNA (IVS7-9T>G y IVS3-1G>C). Se realizó la búsqueda en 100 alelos normales de los cambios nucleotídicos P184T y T118S por encontrarse en “*cis*”, de E197A pues ya se sospechaba que era un SNPs, y de IVS7-9T>G por su localización en el tracto polipirimidínico. La patogenicidad de los 5 cambios nuevos identificados se comprobó, posteriormente, mediante estudios funcionales (sección 4.5).

GEN *PMM2* (16p13.2) NM_000303.1



Figura 18. Representación esquemática de la estructura genómica del gen *PMM2*. La figura muestra todas las variantes alélicas identificadas en los pacientes CDG Ia analizados en el laboratorio y su localización. La representación de la estructura del gen se realizó en base a la información de la secuencia genómica ENST00000268261 disponible en las bases de datos públicas. Las mutaciones nuevas identificadas en este estudio se denotan en rojo.

Según estos resultados encontramos que en los exones 5 y 8 se encuentran las mutaciones más frecuentes (15%) en nuestra serie de pacientes con CDG Ia (R141H, T237M) (Tabla 13) y en el exon 7 encontramos el mayor número de mutaciones diferentes.

Tabla 12. Resumen de datos clínicos, bioquímicos y genéticos de los 14 pacientes con CDG1a

	17568	18759 ¹	18440	18818	19042	20484	20682
Sexo	mujer	varón	varón	varón	mujer	mujer	mujer
Consanguinidad	no	no	no	no		no	
Edad al diagnóstico	10a	3a3m	3a 11m	4a 5m	14m	10.5m	10m
Edad actual (Dic 2008)	17a	8a	9a	10a	7a	5a	5a
Retraso psicomotor	Leve IQ71	Leve-Moderado IQ75	Leve IQ70	Moderado-severo	leve	Moderado	Leve-moderado
Ataxia	+	+	-	-	+	+	
hipotonía	-	+	-	+	+	+	+
Estrabismo	-	+	-	+	-	+	+
Epilepsia	-	-	-	+	-	-	-
Microcefalia	-	-	-	+	-	-	-
Retinitis pigment.	-	-	-	+	+	-	-
Hiporeflexia	-	-	-	+	+	+	
Otros	Temblor	temblor		Escoliosis Infecciones	anorexia	leucocitosis	
Anomalías cerebrales	Hipoplasia cerebelosa y de vermis	Gran cisterna magna Hipoplasia cerebelosa	Hipoplasia cerebelosa	Hipoplasia cerebelosa	Hipoplasia cerebelosa	Hipoplasia cerebelosa	
Dismorfias	-	-		+	-	-	+
Mamilas invertidas	+ (dcha)	-		+	-	-	-
Lipodistrofia	-	-		-	-	-	-
Retraso crecimiento	-	-	-	+	-	-	+
Hepatopatía	-	-	↑ GPT	↑ transaminasas Derrame pericárdico coagulopatía	↑ transaminasas	↑ transaminasas Leve derrame pericárdico	↑ transaminasas
Anomalías cardíacas	-	-	-		-		
Factores coagulación	↓ proteína C	↓ proteína C	Normal			↓ Antitrombina III	
Actividad PMM 2 (mU/mg proteína)	2.8 (31%)*	ND	2.0(22%)*	2.0 (22%)*	2.2 (24%)*	0.9 (9.8%)*	1.5 (16%)*
Genotipo	p.R141H (0%) ^B p.R162W (19%) ^A	p.R141H (0%) ^B p.R162W (19%) ^A	p.T237M (48%) ^B p.T237M (48%) ^B	p.D65Y (20%) ^B p.R141H (0%) ^B	p.L32R (51%) ^B IVS3-1G>C (0%)	p.T237M (48%) ^B IVS7-9T>G (0%)	p.D209G (0%) ^B p.P113L (43%) ^B

1. Hermano del paciente 17568. - Ausente. + Presente. ND. No determinado PMM 2: Fosfomano mutasa 2. * Actividad PMM 2, medida en fibroblastos de piel, respecto a los valores control: 9.3± 3.9 (4.5-15.4) mU/mg proteína. A actividad PMM 2 descrita en la literatura (Pirard et al. 1999). B actividad PMM 2 expresada *in vitro* en el apartado 4.5.1

Cont. tabla 12. Resumen de datos clínicos, bioquímicos y genéticos de los 14 pacientes con CDG1a

	22692	22988	22514	22764	24086	24728	26032
Sexo	mujer	varón	mujer	mujer	mujer	mujer	mujer
Consanguinidad	no	no				no	
Edad al dx	6.5m	5a	10m	12m	12a	7m	20m/ 5a
Edad actual (Dic 2008)	3a	7a	4a	4a	15a	2a	6a
Retraso psicomotor	Moderado-severo	Leve-moderado		+	+	Leve-moderado	Severo
Ataxia	+	+		+	+		+
hipotonía	+	+	+			+	+
Estrabismo	+	+		+	+		
Epilepsia		+		-	+		
Microcefalia	+	+		-	+		
Retinitis pigment.				-			
Hiporeflexia				-			
Otros	Infecciones	Temblor polineuropatía	Trastorno Oculo motricidad		Polineuropatía Sordera Nistagmus	Anemia microcítica	
Anomalías cerebrales	Hipoplasia cerebelosa	Hipoplasia cerebelosa y de vermis	Atrofia cerebral y cerebelosa	Atrofia cerebral	Atrofia cerebelosa		
Dismorfias	+	+		-	+	+	+
Mamilas invertidas	+			+		+	
Lipodistrofia	+			-		+	
Retraso crecimiento	+	-		-		+	
Hepatopatía	↑ transaminasas		↑ GPT GOT			↑ transaminasas	
Anomalías cardiacas				-			
Factores coagulación	↓Antitrombina III ↓ proteína C	Hiper coagulabilidad		Normal	Normal	Normal	
Actividad PMM 2 (mU/mg proteína)	0.7 (7.7%)*	1.3 (14%)*	0.73(35%)**		0.13 (6.2%)**	0.8 (39%)**	0.4 (19%)**
Genotipo	p.D65Y (20%) ^B IVS7-9T>G (0%)	p.R141H (0%) ^B p.T237M (48%) ^B	p.V44A (16%) ^B p.F207S (0%) ^B	p.F157S (1%) ^B p.R162W (19%) ^B	p.R123Q (0%) ^B p.F183S	p.T118S+p.P184T (0%) ^B p.P113L (43%) ^B	p.R141H (0%) ^B p.T226S (23%) ^C

Ausente. + Presente. ND. No determinado PMM 2: Fosfomano mutasa 2. * Actividad PMM 2, medida en fibroblastos de piel, respecto a los valores control: 9.3± 3.9 (4.5-15.4) mU/mg proteína. ** Actividad PMM 2, medida en fibroblastos de piel, respecto a los valores control: 2.07 mU/mg proteína (Dra. Chabás). C actividad PMM 2 decrita en la literatura (Vuillaumier-Barrot et al. 2000). B actividad PMM 2 expresada *in vitro* en el apartado 4.5.1

Tabla 13. Mutaciones identificadas en los pacientes CDG Ia y frecuencia alélica.

MUTACIONES*	EFFECTO EN LA PROTEÍNA	Nº ALELOS (frecuencia alélica)
c.95TA>GC	L32R	1 (4%)
c.131T>C	V44A	1 (4%)
c.193G>T	D65Y	2 (8%)
c.338C>T	P113L	2 (8%)
[c.353C>G / c.550C>A]	[T118S / P184T]	1 (4%)
c.368G>A	R123Q	1 (4%)
c.422G>A	R141H	4 (15%)
c.470T>C	F157S	1 (4%)
c.484C>T	R162W	2 (8%)
c.548T>C	F183S	1 (4%)
c.620T>C	F207S	1 (4%)
c.626A>G	D209G	1 (4%)
c.677C>G	T226S	1 (4%)
c.710C>T	T237M	4 (15%)
c.640-9T>G (IVS7-9T>G)	p.P213_G214ins22	2 (8%)
c-256-1G>C (IVS3-1G>C)	p.V60Gfs11X	1 (4%)

*Nomenclatura según número de acceso de GenBank: NM_000303 siguiendo las recomendaciones de Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen>).

Se llevó a cabo el análisis a partir de RNA y DNA genómico extraídos de fibroblastos de piel cultivados de las dos líneas celulares, 20484 y 22692. Con el análisis mutacional en el cDNA del gen *PMM2* se identificaron dos mutaciones *missense*, T237M en la línea 20484 y la D65Y en la línea 22692, en ambos casos en homocigosis (Fig. 19 A), sin embargo en el DNA genómico se encontró que dichas mutaciones estaban en heterocigosis. Tras el análisis de todos los exones y secuencias intrónicas adyacentes se identificó en ambos pacientes además una mutación, también en heterocigosis, en la posición -9 del intrón 7 (Fig. 19 B).

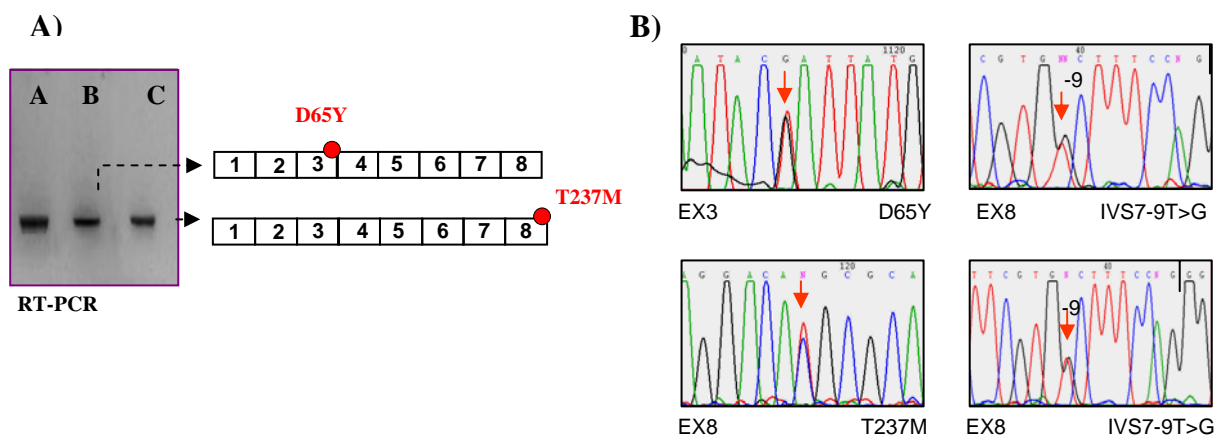


Figura 19. Patrón de RT-PCR y secuencias del gDNA de dos pacientes CDG Ia. A) Carril A transcrito que se obtiene en controles. Carril B transcrito obtenido en el paciente 22692 portador de la mutación D65Y en homocigosis. Carril C transcrito obtenido en el paciente 20484 portador de la mutación T237M en homocigosis. B) Secuencias de los exones portadores de las mutaciones (indicadas con flechas).

Se llevó a cabo el análisis a partir de RNA y DNA genómico extraídos de fibroblastos de piel cultivados de la línea celular 19042. Cuando se realizó la RT-PCR con el RNA total del paciente se encontró la aparición de dos transcritos, uno contenía una mutación por cambio de aminoácido (L32R), ya descrita previamente en la literatura (Vuillaumier-Barrot et al.

2000), y el otro presentaba la deleción o *skipping* del exon 3 y exon 4 (Fig. 20, A). Con el estudio mutacional en DNA genómico se confirmó la mutación *missense* y se identificó un segundo cambio nucleotídico nuevo en la posición -1 del intrón 3 del gen *PMM2*, que posiblemente afectara al correcto procesamiento del mRNA, IVS3-1G>C (Fig. 20, B). No se encontró ninguna mutación en el intrón 2 que explicara el *skipping* del exon 3.

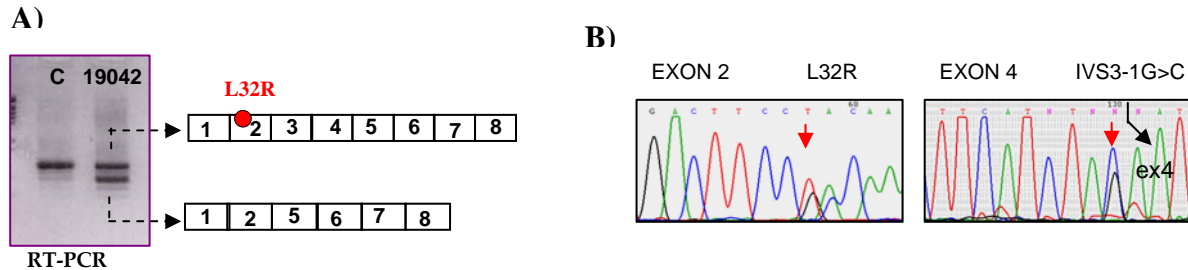


Figura 20. Patrón de la RT-PCR y secuencias del gDNA del paciente 19042. A) transcritos que se obtienen en el control (C) y en el paciente 19042. A la derecha se representa los transcritos obtenidos y la mutación L32R encontrado en uno de ellos. B) Secuencias de los exones y secuencias adyacentes portadores de las mutaciones L32R y IVS3-1G>C (indicadas con una flecha).

4.2.2 Estudio genético de los pacientes con Defecto Congénito de Glicosilación Ib: análisis del gen *MPI*.

Se llevó a cabo el estudio genético en fibroblastos de piel de los pacientes con CDG Ib caracterizados mediante la determinación de la actividad PMI.

Los distintos cambios alélicos en el gen *MPI* fueron detectados por secuenciación cíclica directa del correspondiente cDNA y/o gDNA, según el procedimiento del apartado anterior. Se identificaron 3 variantes alélicas ya descritas, 2 de cambio de aminoácido, R219Q y M51T, y una inserción de una base, c.166-167 ins C (Schollen et al. 2000a) (Fig. 21, Tabla 15).

GEN *MPI* (15q22) NM_002435.1

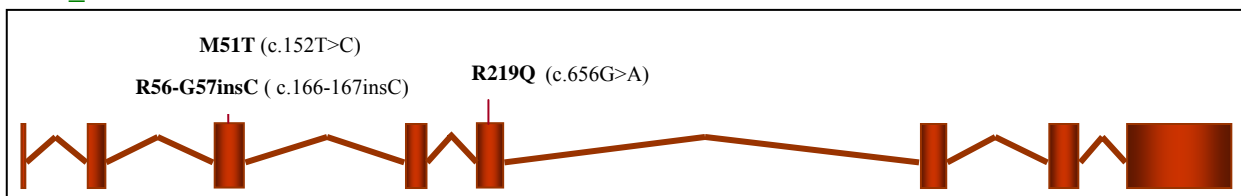


Figura 21. Representación esquemática de la estructura genómica del gen *MPI*. La figura muestra las variantes alélicas identificadas en los pacientes y su localización en los diferentes exones. La representación de la estructura del gen se realizó en base a la información de la secuencia genómica ENST00000352410 disponible en las bases de datos públicas.

En el estudio mutacional del cDNA del paciente 19484 se identificó en el exon 5 la mutación *missense*, R219Q, en homocigosis pero la comprobación en el DNA genómico nos mostró que dicha mutación se encontraba en heterocigosis y identificándose una segunda

mutación, una posible inserción de una citosina en el exon 3. La caracterización de la inserción 166-167 ins C se realizó mediante la amplificación por clonaje del exon 3 lo que permitió estudiar los alelos por separado (Fig. 22)

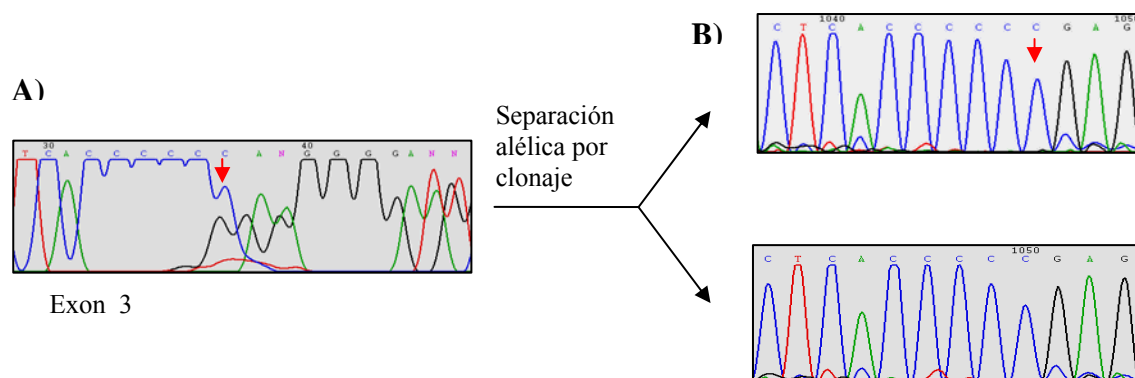


Figura 22. Análisis de la mutación 166-167 ins C mediante separación alélica del exon 3 del paciente 19484.
A) Secuencia del exon 3 amplificado y secuenciado. **B)** Secuencias de un clon portador de una citosina extra (indicada con una flecha roja) y de un clon con la secuencia normal.

La inserción de una citosina en la posición 166-167 del exon 3 provoca la aparición de un codon stop prematuro que posiblemente conduce a la degradación de dicho transcrito por el sistema de vigilancia de la célula (NMD), lo que explica que la mutación R219Q aparezca en homocigosis en el cDNA.

Mediante el estudio en DNA de los padres de cada paciente se confirmó la presencia de ambas mutaciones en posición “*trans*” y en el caso del paciente homocigoto se descartó una delección que comprendiera dicha mutación.

4.2.3 Estudios genéticos de los pacientes con Defectos Cogénitos de Glicosilación Ix: análisis de los genes *ALG6* (CDG Ic), *DPM1* (CDG Ie) y *DPGAT1* (CDG Ij)

Se utilizaron fibroblastos de 10 pacientes que no presentaron deficiencia en la actividad PMM 2 ni PMI y por lo tanto, estaban clasificados como CDG Ix.

La secuenciación del cDNA del gen *ALG6* no permitió identificar ningún cambio causante de enfermedad en ninguno de nuestros pacientes en estudio.

Por el contrario, mediante la secuenciación del cDNA y DNA genómico del gen *DPM1* se identificó en homocigosis una mutación por cambio de aminoácido, S248P (c.742T>C), ya descrita en la literatura (Garcia-Silva et al. 2004) en 2 de nuestros pacientes (Tabla 14), siendo diagnosticados como CDG Ie.

Tabla 14. Resumen de datos clínicos, bioquímicos y genéticos de los pacientes CDG Ib, Ie y Ij.

	19484 (CDG Ib)	25058 (CDG Ib)	21705 (CDG Ie)	23734 (CDG Ie)	22701 (CDG Ij)
Sexo	Varón	Mujer	Mujer	Mujer	Varon
Consanguinidad	No	no	si	no	no
Edad al diagnóstico	7m		11a	2m	15d
Edad actual (Dic 2008)	5a	17m	16a	2a	Exitus 1.5m
Retraso crecimiento	+		+	+	-
Retraso psicomotor	-		severo	+	+
Alteraciones neurológicas	-		PCI, convulsiones, sordera bilateral	Sordera bilateral	Hiporeflexia, alteración coclear bilateral
Hipotonía	-		+	+	+ con hipocinesia
Anomalías cerebrales	-		Displasia cortical, Paquigiria, polimicrogiria	Atrofia cerebral	-
Alteraciones oculares	-		Nistagmo	Atrofia óptica	Atrofia papilar
Alteraciones gastrointestinales	Diarrea, atrofia vellositaria yeyunal		-	-	-
Hepatopatía	hepatomegalia		-	-	-
Dismorfias	-		Microcefalia, paladar gótico, malposición dental	-	Lipodistrofia general displejia facial, telecantus campodactilia,
Otros	-		Infecciones, luxación de caderas		Deformidades esqueléticas
Factores coagulación	↓ Antitrombina III, proteínas C y S, factor XI		N	N	
Alteraciones bioquímicas	↑Transaminasas, Hipoalbuminemia		-	-	Hipoalbuminemia
Mutaciones identificadas	R219Q / R56-G57insC	M51T/ M51T	S248P / S248P	S248P / S248P	R301C / L385R

- Ausente. + Presente.

Por secuenciación del cDNA y DNA genómico del gen *DPGAT1* en el paciente 22701 se identificaron 2 mutaciones *missense* identificadas nuevas en este estudio, R301C (c.901C>T) y L385R (c.1054T>G), siendo, por lo tanto, diagnosticado como CDG Ij (Tabla 14).

Con el fin de analizar si estos cambios podrían estar afectando a la función de la proteína se realizó un alineamiento múltiple con secuencias de proteínas ortólogas, donde se pudo observar que el cambio aminoácido R301C afectaba a un residuo altamente conservados y que el cambio L385R aunque afectaba a un residuo menos conservado ninguna de las especies presentaba una arginina en esa posición (Fig. 23).



Figura 23. Fragmento del alineamiento múltiple de diferentes proteínas ortólogas a la proteína N-acetilglucosaminiltransferasa I humana realizado con el programa informático ClustalW2 de EBI <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. Los residuos afectados por las dos variantes alélicas *DPGAT1* se encuentran señalados con una flecha. (*)= Residuos idénticos (:=) sustituciones conservadas (.)= sustituciones semi-conservadas

Se continúa el estudio en los 7 pacientes con CDG Ix, de los que todavía se desconoce el defecto genético.

Podemos resumir los análisis bioquímicos, enzimáticos y genéticos utilizados para el diagnóstico de los Defectos Congénitos de Glicosilación en el siguiente algoritmo (Fig. 24)

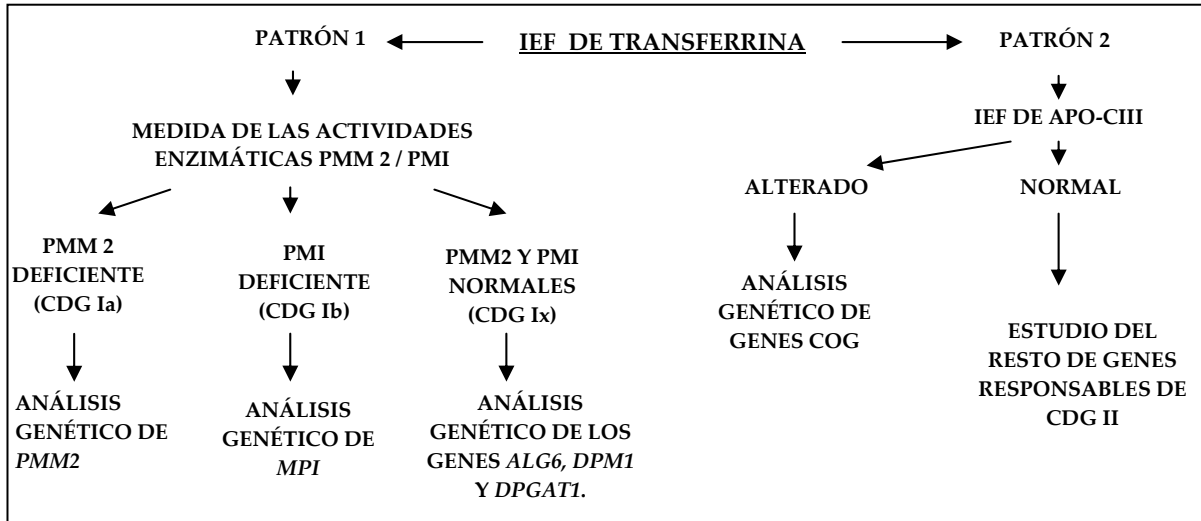


Figura 24. Algoritmo diagnóstico. El esquema resume los pasos utilizados en el diagnóstico de pacientes con Defectos Congénitos de Glicosilación.

4.3 ANÁLISIS DEL PROTEOMA SÉRICO DE PACIENTES CDG Ia

Se ha analizado el proteoma sérico por electroforesis bidimensional (2-DE) de 3 controles y de dos pacientes CDG Ia (20484 y 22692), compuestos heterocigotos de una mutación *missense* (T237M y D65Y, respectivamente) y una mutación de *splicing* IVS7-9T>G. En primer lugar, se realizó el análisis diferencial del proteoma sérico mediante 2-DE del paciente 20484, donde observamos la expresión diferenciada de varias isoformas hipoglicosiladas de ciertas proteínas como transferrina, α 1-antitripsina y α 2-macroglobulina respecto a un control (Fig. 25, Tabla 15).

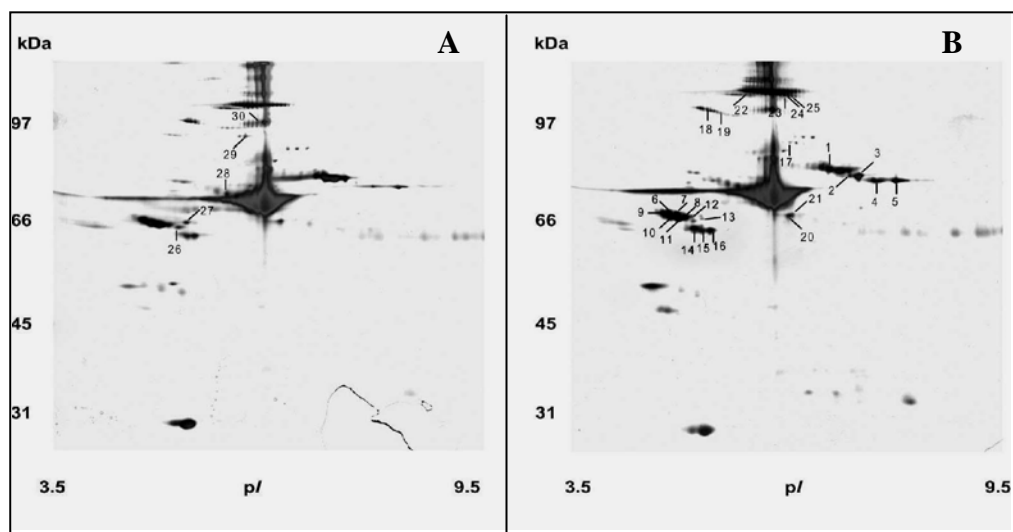


Figura 25. Análisis proteómico de un suero control (A) y suero del paciente 20484 (B). El número indica la proteína picada, tripsinizada y analizada por MALDITOF, y cuya identificación se encuentra en la Tabla 15. Se analizaron 100 μ g de proteína total utilizando una tira IPG de 18 cm y pH=3-10 no lineal en la primera dimensión y gel- 2D al 10% para la segunda dimensión. Posteriormente, los geles fueron teñidos con plata.

Tabla 15. Proteínas identificadas en suero del paciente 20484 y de un control por 2-DE / MS

Nº spot ^a	Nº acceso ^b	Nombre de la proteína	Mr / pI ^c	Nº masas buscadas	Nº masas correspondidas	% de cobertura de la secuencia	MASCOT score
1	gi 62897069	Transferrina	77049 / 6.61	49	38	51	460
2	gi 62897069	Transferrina	77049 / 6.61	31	40	35	242
3	gi 62897069	Transferrina	77049 / 6.61	40	30	42	307
4	gi 37747855	Transferrina	77049 / 6.97	35	22	33	216
5	gi 78101272	Cadena D, Componente C3c complemento	71190 / 6.82	24	18	32	208
6	gi 1942629	α_1 -Antitripsina	44250 / 5.37	23	9	20	87
7	gi 1942629	α_1 -Antitripsina	44250 / 5.37	22	15	27	153
8	gi 224224	α_1 -Antitripsina	46731 / 5.35	25	14	24	123
9	gi 224224	α_1 -Antitripsina	46731 / 5.35	13	8	18	89
10	gi 1942629	α_1 -Antitripsina	44250 / 5.37	21	14	36	183
11	gi 1942629	α_1 -Antitripsina	44250 / 5.37	19	12	28	161
12	gi 1942629	α_1 -Antitripsina	44250 / 5.37	13	7	14	89
13	gi 177827	α_1 -Antitripsina	46645 / 5.42	18	7	17	75
14	gi 177831	α_1 -Antitripsina	46645 / 5.43	18	7	16	74
15	gi 455970	Vitamina D-unido a proteína	52950 / 5.34	14	11	25	137
16	gi 455970	Vitamina D-unido a proteína	52950 / 5.34	12	10	27	176
17	gi 224053	α_2 -Macroglobulina	160805 / 5.95	15	10	9	108
18	gi 1620909	Ceruloplasmina	115471 / 5.43	12	10	9	112
19	gi 1620909	Ceruloplasmina	115471 / 5.43	17	12	9	120
20	gi 23307793	Albumina	69401 / 6.13	8	6	12	72
21	gi 60810141	Albumina	69484 / 5.92	10	7	14	82
22	gi 224053	α_2 -Macroglobulina	160805 / 5.95	23	19	14	106
23	gi 224053	α_2 -Macroglobulina	160805 / 5.95	23	18	16	148
24	gi 224053	α_2 -Macroglobulina	160805 / 5.95	13	11	9	154
25	gi 224053	α_2 -Macroglobulina	160805 / 5.95	18	11	9	89
26	gi 1942629	α_1 -Antitripsina	44280 / 5.37	11	7	23	94
27	gi 179161	Antitrombina III	52618 / 6.32	19	13	27	140
28	gi 386789	Precursor de Hemopexina	51545 / 6.57	12	8	20	108
29	gi 78101268	Cadena B, Componente C3 del Complemento	112940 / 5.55	26	22	24	207
30	gi 62113341	Albumin	69087 / 5.85	15	8	13	79

^aNúmero del spot correspondiente de la figura 25. ^bNúmero de acceso al NCBI. ^cValores del peso molecular y pI calculados con SWISS-PROT database.

Tabla 16. Proteínas identificadas en suero del paciente 22692 y de un control por 2-DE / MS

Nº spot ^a	Nº acceso ^b	Nombre de la proteína	Mr / pI ^c	Nº masas buscadas	Nº masas correspondidas	% de cobertura de la secuencia	MASCOT score
1	gi 178775	Proapolipoproteína	28078 / 5.27	33	20	56	235
2	gi 178775	Proapolipoproteína	28078 / 5.27	13	11	34	158
3	gi 178775	Proapolipoproteína	28078 / 5.27	23	18	58	257
4	gi 178775	Proapolipoproteína	28078 / 5.27	18	13	37	174
5	gi 223170	γ -Fibrinogeno	46281 / 5.54	29	18	49	219
6	gi 223170	γ -Fibrinogeno	46281 / 5.54	35	19	53	218
7	gi 182439	γ -Fibrinogeno	49481 / 5.61	28	15	48	181
8	gi 223170	γ -Fibrinogeno	46281 / 5.54	28	14	39	164
9	gi 223170	γ -Fibrinogeno	46281 / 5.54	25	18	60	256
10	gi 182439	γ -Fibrinogeno	50481 / 5.61	23	16	56	226
11	gi 223170	γ -Fibrinogeno	46281 / 5.54	27	16	50	205
12	gi 1942629	α_1 -Antitripsina	44250 / 5.37	27	16	38	205
13	gi 1942629	α_1 -Antitripsina	44250 / 5.37	28	16	36	184
14	gi 82408097	Antitrombin III	49029 / 5.95	17	14	34	177
15	gi 22219267	Cadena A, actin+vit. D	51216 / 5.17	20	9	23	100
16	gi 223170	γ -Fibrinogeno	46281 / 5.54	19	13	44	181
17	gi 223170	γ -Fibrinogeno	46281 / 5.54	19	13	44	181
18	gi 223002	β -Fibrina	50762 / 7.95	33	23	54	276
19	gi 223002	β -Fibrina	50762 / 7.95	25	18	50	233
20	gi 223002	β -Fibrina	50762 / 7.95	29	18	51	205
21	gi 6990	α_1 -B-glicoproteína	51940 / 5.65	15	7	17	101
22	gi 6990	α_1 -B-glicoproteína	51940 / 5.65	14	8	19	123
23	gi 2347133	factor B del Complemento	85504 / 6.55	10	5	8	69
24	gi 2347133	factor B del Complemento	85504 / 6.55	22	14	20	142
25	gi 1620909	Ceruloplasmina	115471 / 5.43	23	17	17	177
26	gi 224053	α_2 -Macroglobulina	160805 / 5.95	15	10	9	120
27	gi 182424	α -Fibrinogeno	69809 / 8.26	21	12	21	129
28	gi 182424	α -Fibrinogeno	69809 / 8.26	28	14	25	138
29	gi 182424	α -Fibrinogeno	69809 / 8.26	26	14	24	144
30	gi 182424	α -Fibrinogeno	69809 / 8.26	25	13	22	132

^aNúmero del spot correspondiente de la figura 25. ^bNúmero de acceso al NCBI. ^cValores del peso molecular y pI calculados con SWISS-PROT database.

Cont. tabla 16. Proteínas identificadas en suero del paciente 22692 y de un control por 2-DE / MS

32	gi 182424	α -Fibrinogeno	69809 / 8.26	28	15	25	150
33	gi 182424	α -Fibrinogeno	69809 / 8.26	28	15	26	150
34	gi 182424	α -Fibrinogeno	69809 / 8.26	24	15	26	164
35	gi 182424	α -Fibrinogeno	69809 / 8.26	16	9	16	98
36	gi 182424	α -Fibrinogeno	69809 / 8.26	19	11	19	117
37	gi 62897069	Transferrina	77079 / 6.68	42	29	41	330
38	gi 15021381	Transferrina	77049 / 6.81	40	28	42	320
39	gi 15021381	Transferrina	77049 / 6.81	28	19	27	212
40	gi 37747855	Transferrina	77079 / 6.97	22	12	17	119
41	gi 47124562	Haptoglobina	31381 / 8.48	10	6	15	85
42	gi 47124562	Haptoglobina	31381 / 8.48	15	6	17	74
43	gi 47124562	Haptoglobina	31381 / 8.48	11	6	17	83
44	gi 47124562	Haptoglobina	31381 / 8.48	11	6	17	83
45	gi 47124562	Haptoglobina	31381 / 8.48	15	6	18	72
46	gi 47124562	Haptoglobina	31381 / 8.48	15	11	31	120
47	gi 55669576	Cadena B, A Dimero covalente of Transtiretina	12843 / 5.33	13	7	80	130
48	gi 34785163	Componente 1, s subcomponente del Complemento	76684 / 4.86	20	12	19	127
49	gi 109731812	Componente 5 Complemento	188319 / 6.11	24	13	8	76
50	gi 78101268	Cadena B, Componente C3 Complemento	112940 / 5.55	22	16	19	162
51	gi 80478039	Afamina	69069 / 5.64	15	12	18	149
52	gi 4096840	Inhibidor de Inter- α -tripsina	103372 / 6.64	26	15	14	103
53	gi 40737343	Componente C4B3 del Complemento	47454 / 5.37	22	8	19	78
54	gi 78101268	Cadena B, Componente C3 Complemento	112940 / 5.55	17	16	17	183
55	gi 4389275	Albumina	66035 / 5.69	24	13	21	139
56	gi 230284	Retinol unido a proteína	20958 / 5.27	11	7	34	91

^aNúmero del spot correspondiente de la figura 26. ^bNúmero de acceso al NCBI. ^cValores del peso molecular y pI calculados con SWISS-PROT database.

Posteriormente, se realizó el análisis del paciente 22692. Para mejorar la resolución del análisis, los sueros tanto del paciente como del control fueron tratados previamente con un kit para eliminar la albumina y la IgG. Los resultados obtenidos nos muestran una disminución en la expresión de 5 proteínas séricas: antitrombina III, dos componentes del complemento: cadena B del C3c y C4B3, afamina y retinol. Además aparece expresión de distintas isoformas adicionales con hipoglicosilación en distintas proteínas, siendo más evidente en proteínas involucradas en la **respuesta inmune** (fibrinógeno, haptoglobina, α 2-macroglobulina y C3 del complemento), en los **mecanismo de coagulación** (antitrombina III y fibrinógeno) y de proteínas encargadas de la protección contra el **estrés oxidativo** de tejidos (haptoglobina, α 2-macroglobulina) (Fig. 26, Tabla 16).

Si atendemos a la proteínas que usualmente se analizan por IEF, α 1-antitripsina y transferrina, observamos que las técnicas proteómicas pueden aportar información adicional pues en el suero control se identificaron 8 isoformas diferentes según el tamaño y *PI*, y en el paciente 22692 se observaron 2 isoformas hipoglicosiladas adicionales, como ya se había descrito previamente (Henry et al. 1997; Mills et al. 2001; Mills et al. 2003).

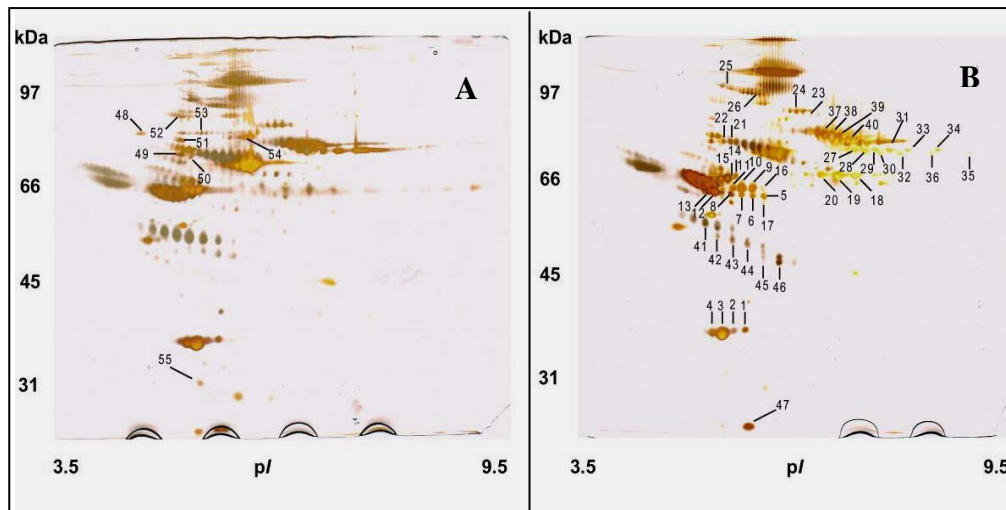


Figura 26. Análisis proteómico de un suero control (A) y suero del paciente 22692 (B). El número indica la proteína picada, tripsinizada y analizada por MALDITOF, y cuya identificación se encuentra en la Tabla 16. Se analizaron 90 μ g de proteína total utilizando una tira IPG de 18 cm y pH=3-10 no lineal en la primera dimensión y gel- 2D al 10% para la segunda dimensión. Posteriormente, los geles se tiñeron con plata.

4.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES CDG Ia

4.4.1 Niveles de expresión de la proteína PMM 2

Se emplearon pellets de fibroblastos de 8 pacientes CDG Ia resuspendidos en un medio HEPES 20 mM con KCl 25 mM, DTT 1 mM y Pefabloc 0,2 mM. Se realizó la rotura y

eliminación de las estructuras celulares y se realizó *Western blot* cargando 150 μ g de proteínas totales (Fig. 27).

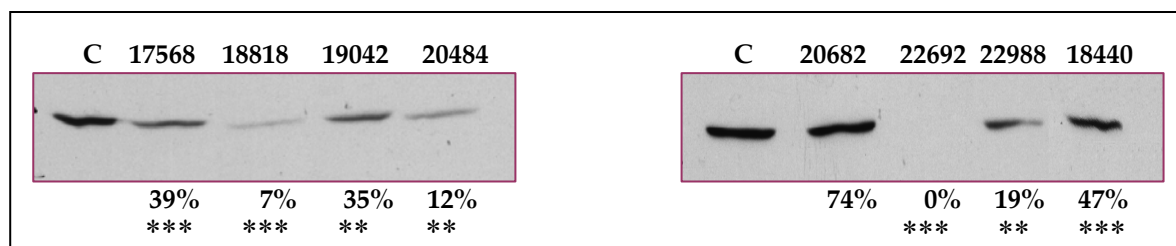


Figura 27. Niveles de expresión de la proteína PMM 2 en fibroblastos controles y de pacientes CDG Ia. Abajo se indica el porcentaje de proteína inmunorreactiva en cada caso respecto al control cuantificada mediante densitometría láser. *** y ** indican el grado de significación estadística con $p < 0.001$ y $p < 0.01$, respectivamente, obtenida analizando los resultados de 3 ensayos diferentes.

Según estos resultados, todas las líneas celulares excepto la 20682, presentan disminución significativa de los niveles de expresión de la proteína PMM 2, que podría ser debido o bien a una disminución en los niveles de expresión del gen *PMM2* (inestabilidad del mRNA) o porque estas mutaciones causen inestabilidad en la proteína. Para ello, se procedió a analizar la estabilidad del mRNA mediante qRT-PCR.

4.4.2 Niveles de expresión del gen *PMM2*.

Se estudió el efecto que tenían las distintas mutaciones detectadas sobre los niveles de expresión del gen *PMM2*. Para ello, se analizó el mRNA extraído de fibroblastos de piel cultivados de 8 pacientes con CDG Ia, siempre comparándolo con el mRNA extraído de fibroblastos control.

En primer lugar, se confirmó el buen estado del RNA extraído mediante un bioanализador, y a continuación se realizó la cuantificación de los niveles del mRNA mediante la conversión de 1 μ g del RNA total extraído de cada línea celular a cDNA y posterior análisis mediante PCR a tiempo real, utilizando sondas específicas Universal Probe.

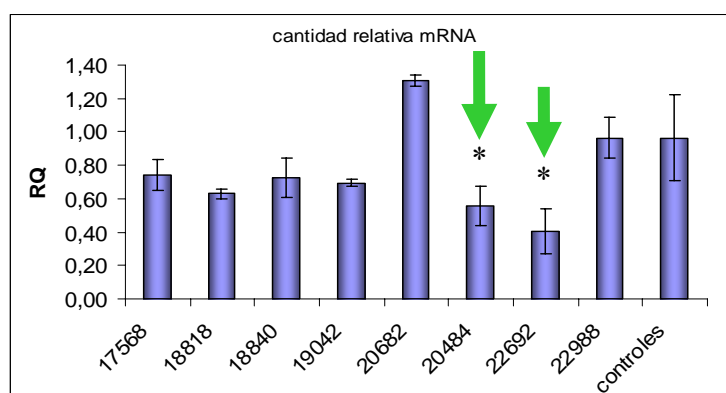


Figura 28. Cuantificación de los niveles de mRNA del gen *PMM2* mediante qRT-PCR. En el eje X se representa las líneas celulares analizadas y en el eje Y se representa el RQ de cada línea celular, siendo $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$. $\Delta\Delta CT$ es calculado como la diferencia entre el ΔCT de la muestra y el ΔCT del control interno, siendo en este caso del gen de rRNA18S. ΔCT es la variación existente dentro de la misma línea en 3 experimentos distintos. * indica el grado de significación estadística con $p < 0.05$.

Finalizado el análisis, el resultado obtenido fue que casi todas las líneas celulares presentaban niveles cercanos a la normalidad (RQ= 0.69-1.2), lo que indica que las mutaciones detectadas no parecen afectar a la estabilidad del mRNA. Sólo las líneas 20484 y 22692 (portadoras de la mutación IVS7-9T>G) parecen presentar una pequeña disminución significativa ($p<0.05$), RQ=0.64-0.47 y RQ=0.5-0.31 respectivamente, en los niveles de expresión del gen *PMM2* (Fig. 28, Tabla 17). Sin embargo, la línea 19042 portadora de la mutación IVS3-1G>C, causante del *skipping* de los exones 3 y 4 que da lugar a un cambio en el marco de lectura, no presentó disminución significativa en la expresión del gen *PMM2*.

Tabla 17. Niveles de expresión de la proteína PMM 2 y niveles de mRNA del gen *PMM2* en las líneas de fibroblastos de pacientes CDG Ia

PACIENTE	GENOTIPO	% ACTIVIDAD PMM 2	% PROTEÍNA INMUNORREACTIVA*	% EXPRESIÓN GEN <i>PMM2</i> *
20682	p.D209G / p. P113L	16	74	131
17568	p.R141H / p.R162W	30	39	74
18818	p.R141H / p.D65Y	22	7	63
22988	p.R141H / p.T237M	14	19	97
18440	p.T237M / p.T237M	22	47	73
20484	IVS7-9T>G / p.T237M	10	12	56
22692	IVS7-9T<G / p.D65Y	8	0	41
19042	IVS3-1G>C / p.L32R	24	35	70

* % calculado tomando como 100% los niveles obtenidos en controles.

4.5 ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS VARIANTES ALÉLICAS IDENTIFICADAS EN EL GEN *PMM2*.

Es necesario profundizar en el análisis de los distintos cambios nucleotídicos mediante su expresión en sistemas celulares y la aplicación de diversas aproximaciones experimentales para comprender el mecanismo molecular responsable de su patogénesis e intentar establecer la relación genotipo-fenotipo. En el caso de variantes alélicas que originan un cambio de aminoácido, deleciones en fase, codones de parada de traducción cerca del original, así como cambios puntuales que afectan a *splicing*, su efecto es difícilmente predecible. Por lo que, estos estudios son importantes para diferenciar entre aquéllas que están asociadas a enfermedad y las que son polimorfismos.

La metodología empleada para este estudio incluye la expresión de mutaciones *missense* en un sistema procarionta y el análisis funcional de mutaciones de *splicing* mediante minigenes, así como el perfil transcripcional de los fibroblastos portadores de las mutaciones de *splicing*.

4.5.1 Análisis funcional de mutaciones *missense*.

Se escogieron para el estudio las siguientes variantes alélicas: **D209G**, **P184T**, **T118S** son variantes nuevas identificadas en este estudio; **P113L**, **F207S**, **F157S**, **V44A** y **T237M** (Matthijs et al. 2000) porque, aunque se trata de mutaciones ya descritas en la literatura, no se han realizado estudios de expresión que analicen su efecto, **R123Q** y **R141H** por estar descritas con actividad < 10% o nula (control negativo) (Kjaergaard et al. 1999; Le Bizec et al. 2005; Pirard et al. 1999; Vuillaumier-Barrot et al. 2000; Westphal et al. 2001); **E197A** (Le Bizec et al. 2005) para confirmar que es SNP y por último, **D65Y** y **L32R** (Pirard et al. 1999; Vuillaumier-Barrot et al. 2000; Westphal et al. 2001) que aunque están descritas en la literatura comparten genotipo con las mutaciones de *splicing* nuevas identificadas en este estudio y era interesante conocer si la mutación D65Y afectaba al plegamiento de la proteína, ya que los fibroblastos portadores de dicha mutación (22692 y 18818) presentaron niveles inferiores del 6% de proteína PMM 2 con respecto al control.

Con el fin de analizar el efecto y comprobar la patogenicidad de las distintas variantes alélicas de cambio de aminoácido identificadas en el gen *PMM2*, se realizó en primer lugar un alineamiento múltiple con secuencias de proteínas ortólogas (Fig. 29). Se observó que todos los cambios aminoácídicos encontrados afectaban a residuos altamente conservados, excepto el 197 en el que aparece un cambio de glutamina por alanina en *Gallus gallus*, lo que indica que es un residuo menos conservado.

		L32R	V44A																																																										
		↓	↓																																																										
Homo	----	MAAPG	----	PALCLFDVDGTLTAPRQKITKEMDDFLQKL	RQKIKIGV	VGGSDFEK	51																																																						
Canis	----	MAASG	----	SALCLFDVDGTLTAPRQKITTEEMDGF	LQNL	RQRIKIGV	VGGSDFEK 51																																																						
Eqqus	----	MAAPG	----	PALCLFDVDGTLTPRQKITKEMDDFLQKL	RQKIKIGV	VGGSDFEK	51																																																						
Bos	----	VMAAPG	----	PALCLFDVDGTLTAPRQKITKDMDCF	LQKL	RQKIKIGV	VGGSDFEK 52																																																						
Gallus	LPAAM	PPER	----	AVLCLFDVDGTLTAPRQKITAEMAEFLQRL	RQKVKVGV	VGGSDFEK	56																																																						
Xenopus	----	MAQCD	----	VLCLFDVDGTLTAARQKVTKDMAEFL	EELR	KRVKVG	VGGSDFEK 50																																																						
Danio	--	MSGSTVDS	----	TTLCLFDVDGTLTAARQKATADMHEFL	SKLK	QRVKVG	VGGSDLDK 54																																																						
Saccharomyces	--	MSIAEFAYKEK	PETLV	FDVDGTLTPARLTVSEEVRTLAKLR	NKCCIG	VGGSDLSK	58																																																						
	:		:	*	*****	..*	::	*	..::	.*	:::	.*	*****	::*																																															
D65Y																																																													
↓																																																													
Homo	VQEQLGNDVVEKYD	VVFPENGLVAYKDGKLLCRQNIQSHLGEALI	QDLIN	YCLSYIAKIK	111																																																								
Canis	VQEQLGNDVVKKYD	VVFPENGLVAYKDGKLLCKQNIQGH	LGEALI	QDLIN	YCLSYIAKIK 111																																																								
Eqqus	VQEQLGNDVVEKYD	VVFPENGLVAYKDGKLVCKQSIQGH	LGEALI	QDLIN	YCLSYISKIK 111																																																								
Bos	VQEQLGDDVIKKYD	VVFPENGLVAYRDGKLLCKQNIQGH	LGEALI	QDLIN	YCLSYIAKIK 112																																																								
Gallus	IKEQLGDDVVEKFD	VVFPENGLVAYKDGKFFSKQNIQSHLGEDVL	QDLIN	YCLSYIAKIK	116																																																								
Xenopus	IKEQLGDDVVEKFD	VVFAENGLVAYKDGKFLCKQSIHAHLGEDLLQDI	IN	YCLSYIAKLK	110																																																								
Danio	IKEQLGDDVIDRDV	VVFAENGLVAYRFGKLSVQNIQAYLGEDILQEF	IN	FCLN	YLSKIK 114																																																								
Saccharomyces	QLEQLGPNVLD	DFDY	SFSENGLTAYRLGKELASQSF	INWL	GEEKYNKLA	VFIL	RYLSEID 118																																																						
	***	.*	..*	**	*.*****	**	*	..*	***	::	.*	*****	::*																																																
P113L T118S R123Q R141H F157S																																																													
↓ ↓ ↓ ↓ ↓																																																													
Homo	L	P	K	R	G	T	F	I	E	F	R	N	G	M	L	N	V	S	P	I	G	R	S	C	S	Q	E	E	R	I	E	F	Y	E	L	D	K	K	E	N	I	R	Q	K	F	V	A	D	L	R	K	E	F	A	G	K	G	L	T	171	
Canis	L	P	K	R	G	T	F	I	E	F	R	N	G	M	L	N	V	S	P	I	G	R	S	C	S	Q	E	E	R	I	E	F	H	E	L	D	K	K	E	N	I	R	Q	K	F	V	A	D	L	R	K	E	F	A	G	K	G	V	T	171	
Eqqus	L	P	K	R	G	T	F	I	E	F	R	N	G	M	L	N	V	S	P	I	G	R	S	C	S	Q	E	E	R	I	E	F	H	E	L	D	K	K	E	N	I	R	Q	K	F	V	A	D	L	Q	K	E	F	A	G	K	G	L	T	171	
Bos	L	P	K	R	G	T	F	I	E	F	R	N	G	M	L	N	V	S	P	I	G	R	S	C	S	Q	E	E	R	I	E	F	Y	E	L	D	Q	K	E	N	I	R	Q	K	F	V	E	D	L	R	K	E	F	A	G	K	G	L	T	172	
Gallus	L	P	K	R	G	T	F	I	E	F	R	N	G	M	L	N	V	S	P	I	G	R	S	C	S	Q	E	E	R	I	E	F	Y	E	L	D	K	K	E	H	I	R	E	K	F	V	A	D	L	R	R	E	F	A	G	K	G	L	T	176	
Xenopus	L	P	K	R	G	T	F	I	E	F	R	N	G	M	L	N	V	S	P	I	G	R	N	C	T	Q	E	E	R	I	E	F	Y	E	L	D	K	K	E	Q	F	R	D	K	F	V	A	E	L	Q	R	E	F	S	G	R	G	L	T	170	
Danio	L	P	K	R	G	T	F	I	E	F	R	N	G	M	L	N	V	S	P	I	G	R	S	C	S	Q	E	E	R	I	E	F	F	E	L	D	K	K	E	I	R	E	T	F	V	S	V	L	K	E	E	F	A	G	K	G	L	A	174		
Saccharomyces	L	P	K	R	R	G	T	F	L	E	F	R	N	G	M	I	N	V	S	P	I	G	R	N	A	S	T	E	E	R	N	E	F	E	R	Y	D	K	E	H	Q	I	R	A	K	F	V	E	A	L	K	K	E	F	P	D	Y	G	L	T	178
	***	.*	*****	*****	..*	**	*	..*	***	::	.*	*****	::*																																																

y por ultimo, las mutaciones **F157S**, **P184T**, **F207S**, **R123Q**, **R141H** y **D209G**, tenían actividad residual nula (1-0%).

Para el estudio de la estabilidad de la PMM 2, se analizó por *Western blot* 1 µg de proteína total a partir del mismo extracto obtenido para la medida de la actividad, recogida y congelada inmediatamente (Fig. 31).

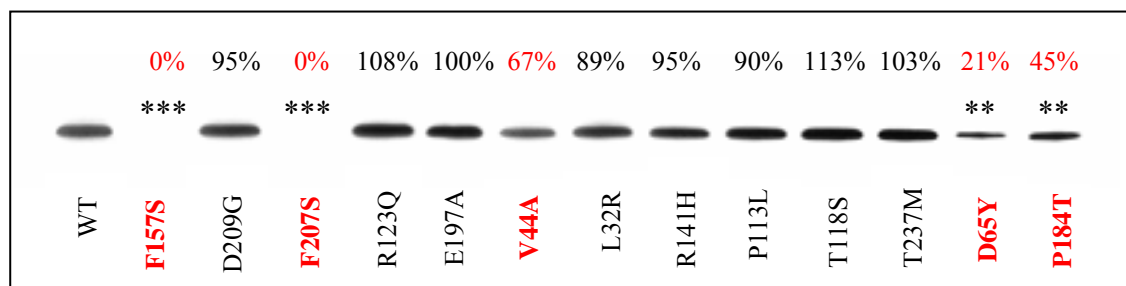


Figura 31. Estudio de la estabilidad a 37°C de las proteínas PMM 2 salvaje (wt) y mutantes analizado mediante *Western blot*. Arriba se indica la cuantificación relativa de proteína inmunorreactiva densitometrada por láser, y abajo la correspondiente mutación. *** y ** indican el grado de significación estadística con $p < 0.001$ y $p < 0.01$ respectivamente, obtenidos mediante el análisis de los resultados obtenidos de 2 ensayos.

En estas condiciones, se pueden distinguir 2 tipos de mutaciones, aquellas que no producen variación en los niveles de proteína inmunorreactiva (**D209G**, **R132Q**, **L32R**, **R141H**, **P113L**, **T118S** y **T237M**), posiblemente porque sean mutaciones que afecten a la función catalítica de la proteína, y aquellas que sí dan lugar a una disminución en los niveles de proteína (**F157S**, **F207S**, **V44A**, **D65Y** y **P184T**) que podrían estar afectando a la estructura o plegamiento de la PMM 2 causando la pérdida de actividad. Como era esperable la proteína portadora del cambio **E197A** presenta los mismos niveles de proteína inmunorreactiva que la salvaje (Tabla 18).

Tabla 18. Efecto de las mutaciones sobre la actividad PMM 2 y proteína inmunorreactiva .

MUTACION	% ACTIVIDAD RESIDUAL	% PROTEÍNA INMUNORREACTIVA
WT	100	100
T118S	54	113
L32R	51	89
T237M	48	103
P113L	43	90
R123Q	0	108
R141H	0	95
D209G	0	95
V44A	16	67
P184T	1	45
D65Y	20	21
F157S	1	0
F207S	0	0

WT indica la proteína salvaje. En azul se indican aquellas mutaciones que parecen afectar a la función catalítica de la PMM 2 y en rojo aquellas que podrían estar afectando al plegamiento y/o estructura de la proteína.

Se realizó una aproximación experimental mediante la expresión de las proteínas normal y mutantes a 26°C, para intentar conseguir una mejora en la eficacia de plegamiento de la proteína, y su visualización mediante *Western blot*. Se estudiaron aquellas mutaciones que podían estar afectando al plegamiento de la proteína (V44A, P184T, D65Y, F157S y F207S). Se obtuvo un aumento del 45-70% de proteína inmunorreactiva en las mutaciones F207S, F157S y P184T (Fig. 32).

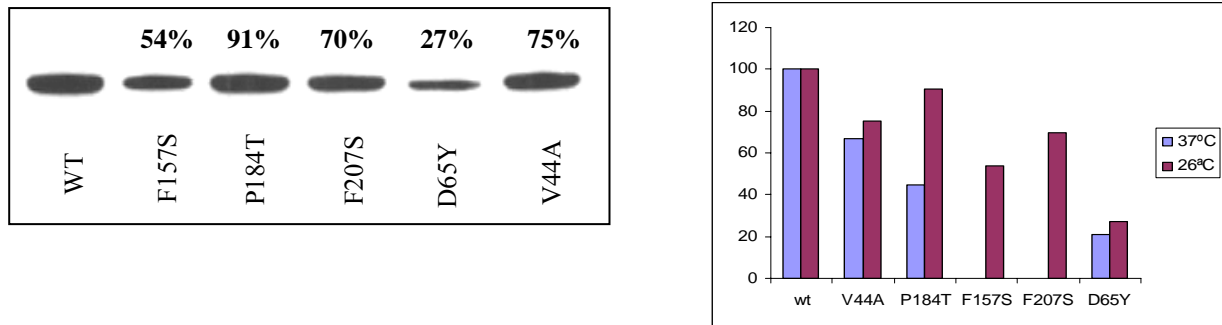


Figura 32. Estudio de estabilidad de la proteína PMM 2 a 26°C. A) Western blot de las enzimas PMM 2 recombinantes salvaje (WT) y mutantes. Arriba se indica el porcentaje de proteína inmunorreactiva densitometrada por láser. B) Representación gráfica del porcentaje de proteína inmunorreactiva detectada a 37 y 26 °C en las proteínas PMM 2 portadoras de las mutaciones en estudio.

Por último, se estudió la estabilidad de las proteínas mutantes F157S y F207S analizándose los perfiles de degradación a 37°C, recogiendo alicuotas del extracto a intervalos de tiempo de 2 horas hasta un máximo de 24h de incubación. A partir de la representación gráfica de los perfiles de degradación a lo largo del tiempo se calculó la vida media de cada una de estas proteínas, (Fig. 33).

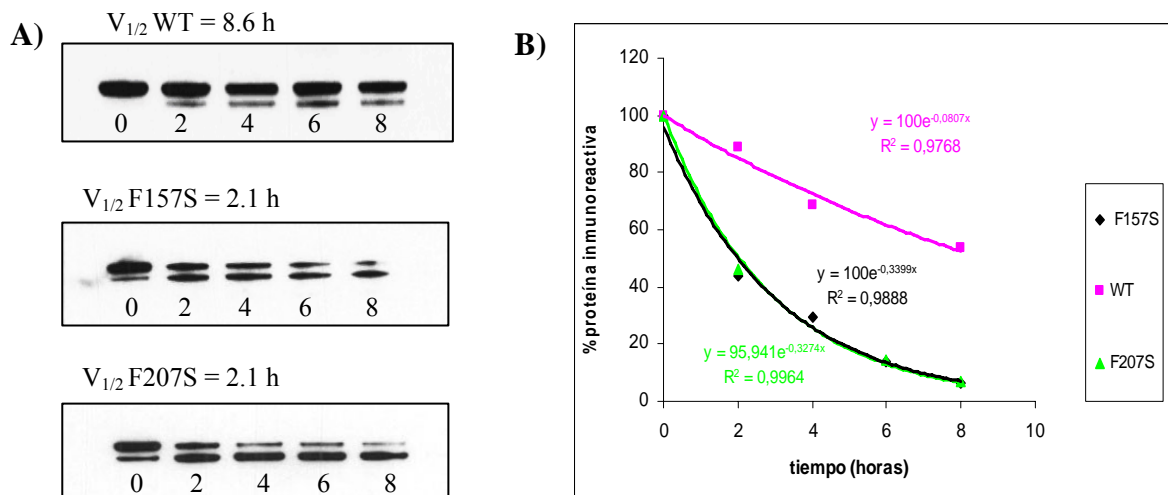


Figura 33. Análisis de la estabilidad de las proteínas PMM 2 normal y mutantes tras su expresión *in vitro* en un sistema procariota. A) Análisis mediante SDS-PAGE y posterior autorradiografía de la estabilidad de las proteínas salvaje (WT) y mutantes F157S y F207S. Arriba se indica la vida media ($V_{1/2}$) calculada en cada caso. B) Representación gráfica de los perfiles de degradación de cada proteína, con el fin de calcular el tiempo de vida media, obtenidos a partir de la cuantificación de los niveles de proteína inmunorreactiva mediante densitometría láser.

Los resultados muestran que las proteínas mutantes F157S y F207S muestran una vida media menor que la salvaje revelando una degradación más rápida por parte de la maquinaria proteolítica del sistema. Como ha sido descrito previamente, tiempos de vida media disminuidos en proteínas podrían ser indicativos de defectos de plegamiento (Gamez et al. 2000).

4.5.2 Análisis funcional de las mutaciones de *splicing*.

En la posición -9 del último intrón del gen *PMM2* se encontró la transversión c. 640-9T>G (IVS7-9T>G), cambio que podría afectar al correcto procesamiento del mRNA por encontrarse en el tracto polipirimidínico del último intrón del gen. Se analizó el perfil transcripcional en fibroblastos de piel de los pacientes (20484 y 22692) diseñando un *primer* específico (PMM2B) que hibridara con el final del intrón 7 y el principio del exon 8 y que no modificara el cambio nucleotídico en la posición -9, con el propósito de rescatar algún posible transcrito producto de un proceso de maduración del mRNA alterado (Fig. 34).

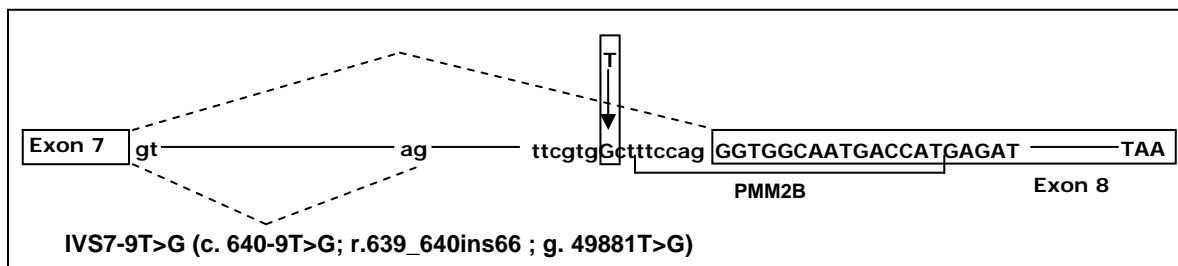


Figura 34. Representación esquemática de la mutación IVS7-9T>G. Se indican los exones en cajas y la posición del *primer* PMM2B utilizado para el rescate de transcritos aberrantes. Se indica el cambio nucleotídico en un recuadro.

El resultado obtenido, mediante RT-PCR, fue que en ambos pacientes se rescataba un transcrito que está ausente en individuos control, lo que indicaba que no era parte del fondo de *splicing* (Fig. 35). Este transcrito contenía una inserción de 66 pb debida a la activación de un sitio crítico de *splicing* en la posición -67 del intrón 7 del gen *PMM2* y portaba el cambio T>G en la posición -9 del intrón 7, demostrándose, así, que es producto de la transcripción del alelo mutante. A nivel de proteína, esta activación provocaría una inserción de 22 aminoácidos.

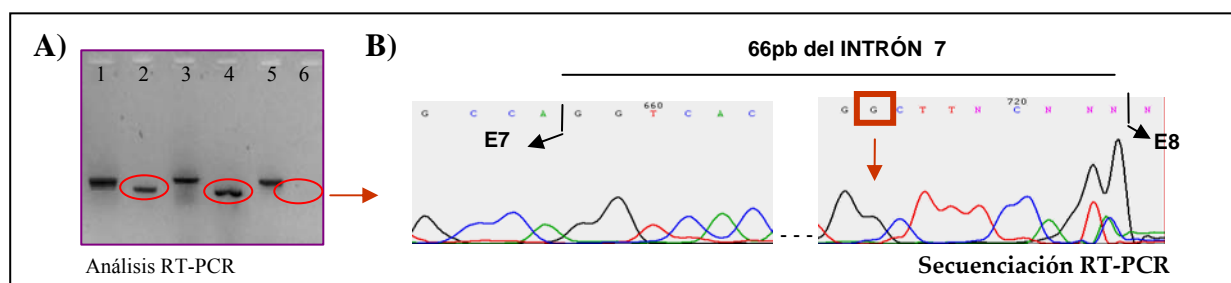


Figura 35. Análisis del perfil transcripcional de las líneas celulares portadoras del cambio T>G en la posición -9 del intrón 7 del gen *PMM2* (20484 y 22692). A) Carriles 1, 3 y 5 corresponden a los productos obtenidos con los *primers* PMM2-F y PMM2-R de la línea 20484, 22692 e individuo control, respectivamente. Carriles 2, 4 y 6 señalados con círculos rojos, corresponden a los productos obtenidos a partir del RNA de las líneas 20484, 22692 e individuo control con el *primer* PMM2-E8, respectivamente. Se observó ausencia de amplificación a partir del mRNA control. B) Secuencia de los transcritos obtenidos en pacientes mediante los *primers* PMM2-F y PMM2-E8.

Se realizó una estimación *in silico* de lo que podría estar ocurriendo en el proceso y se observó que el aceptor de *splicing* salvaje prácticamente no pierde efectividad bajando, el *score* de un 0.98 a un 0.92 en el mutante, mientras que el aceptor críptico de *splicing* presenta un *score* del 81 (Fig. 36).

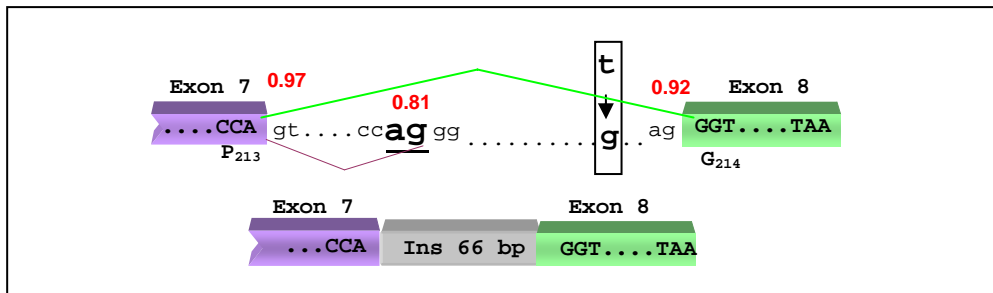


Figura 36. Representación esquemática del posible efecto producido por la mutación IVS7-9T>G. Se indican los exones en cajas, así como algunos codones y los aminoácidos que codifican. El cambio nucleotídico aparece en un recuadro (mutante→normal). El efecto en la secuencia codificante se muestra en la parte inferior de la figura. En rojo se indica la probabilidad de *splicing* de cada sitio donador y aceptor estimada informáticamente (18Hhttp://www.fruitfly.org/seq_tools/other.html).

Para comprobar que la transversión **c. 640-9T>G (IVS7-9T>G)** localizada en el tracto polipirimidínico del último intrón del gen *PMM2* no es un SNP, si no que es la causa del procesamiento aberrante del mRNA, y por lo tanto, es causante de enfermedad, se realizó el estudio mediante minigenes. Debido a que el exon en estudio es el último del gen *PMM2*, se requirió realizar una construcción del exon 8 unido a otro exon del mismo gen que nos aportara el donador 5' de *splicing* (Abuhatzira et al. 2005). Esta construcción se introdujo en el vector pSPL3 y se transfectaron células humanas Hep3B.

Con la caracterización de la mutación mediante minigenes se observó que el cambio IVS7-9T>G provoca una alteración total del procesamiento del mRNA, pues no aparece ningún transcrito resultado del alelo mutante con la inclusión del "exon híbrido 8/2". Sin embargo, este resultado no se ajusta a lo encontrado en los pacientes pues no se activa el sitio críptico y por lo tanto, no se insertan las 66 pb (Fig. 37).

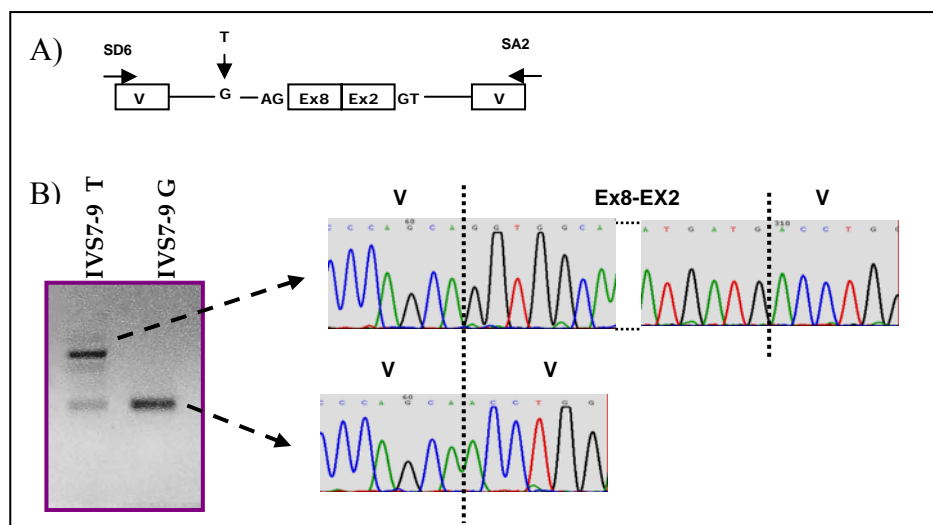


Figura 37. Análisis funcional de la mutación IVS7-9T>G por minigenes. A) Esquema de la construcción introducida en el vector pSPL3. B) La figura muestra el patrón de RT-PCR y la secuencia de los fragmentos obtenidos resultado de los minigenes normal y mutante. Para la RT-PCR se utilizaron primers específicos del vector (SD6 y SA2). V= secuencia exónica del vector.

En el intrón 3 del gen *PMM2* se identificó la mutación **c. 256-1G>C (IVS3-1G>C)**, que consiste en la inversión G>C en la posición -1, nucleótido invariable dentro de la secuencia consenso del sitio 3'ceptor de *splicing*. El análisis del perfil transcripcional de la línea celular del paciente a nivel de RNA mensajero, muestra el *skipping* del los exones 3 y 4 provocando un cambio en la fase de lectura de la traducción, que da lugar a una posible proteína truncada debido a la aparición de un codon stop prematuro (Fig. 38).

Cuando se realizó un estudio *in silico* de lo que podría estar ocurriendo en el proceso, se observó que debido a la mutación el aceptor de *splicing* salvaje del intrón 3 pierde efectividad bajando el *score* de un 65% a un 0% en el mutante, y que el aceptor de *splicing* del intrón 2 tiene un *score* de un 18% lo que podría explicar el *skipping* de los exones 3 y 4 (Fig. 38).

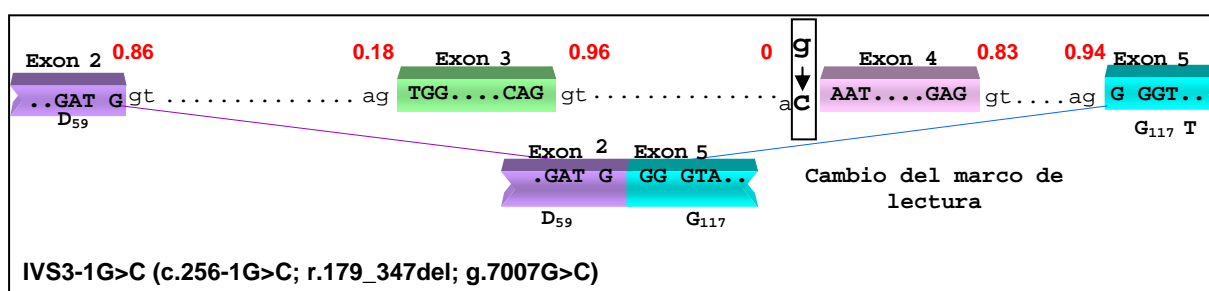


Figura 38. Representación esquemática del posible efecto producido por la mutación IVS3-1G>C. Se indica en cada caso los exones deletionados y los exones adyacentes, así como algunos codones y los aminoácidos que codifican. El cambio nucleotídico aparece en un recuadro. El posible efecto en la secuencia codificante se muestra en la parte inferior de la figura. En rojo se indica la probabilidad de *splicing* de cada sitio donador y aceptor estimada informáticamente (19H http://www.fruitfly.org/seq_tools/other.html).

Para estudiar si el cambio nucleotídico en la posición -1 del intrón provoca una alteración en el procesamiento del mRNA siendo causante de enfermedad, se construyó un minigen que contenía el exon 3 con su aceptor 3' correspondiente, el intrón 3 y el exon 4 con su donador 5' (Fig 39, A). Se observó que el cambio **IVS3-1G>C** provoca una alteración total del procesamiento del mRNA, pues no aparece ningún transcrito normal resultado del alelo mutante. Además se observa, como ocurre en las células del paciente, que casi la totalidad de los transcritos generados sufren además *skipping* del exon 3. En el caso del alelo salvaje se produce mayoritariamente la inclusión de los exones 3 y 4, pero también aparecen transcritos con *skipping* del exon 3 debido a la debilidad del 3'ss del intrón 2 (Fig. 39, B)

Recientemente se ha descrito una mutación inusual en este tipo de defectos. El paciente es un compuesto heterocigoto de una mutación *missense* **c.691G>A (V231M)** (Schollen et al. 2007) y una mutación puntual en la posición -15479 del último intrón del gen *PMM2*. Se trata de la transversión **c. 640-15479C>T (IVS7-15479C>T)**, cambio que parece afectar al correcto procesamiento del mRNA por activación de un sitio 5' donador de *splicing*, generando una inserción de un pseudoexón de 123 pb entre los exones 7 y 8 (Fig. 40).

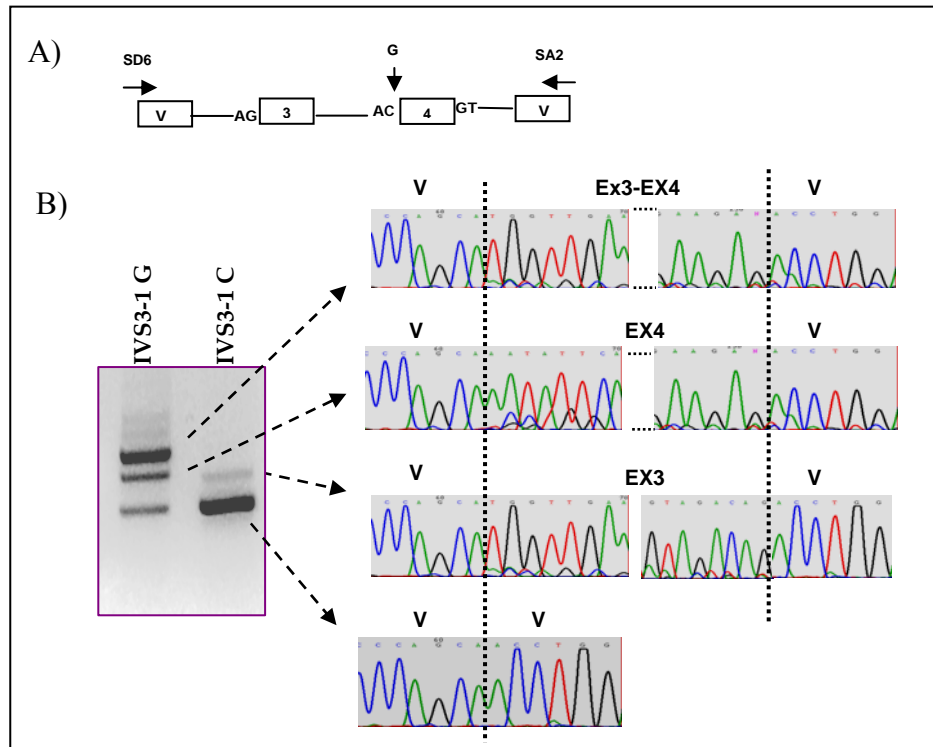


Figura 39. Análisis funcional de la mutación IVS3-1G>C por minigenes. A) Esquema del fragmento de gDNA introducida en el vector pSPL3. B) La figura muestra el patrón de RT-PCR y la secuencia de los fragmentos obtenidos resultado de los minigenes normal y mutante. Para la RT-PCR se utilizaron primers específicos del vector (SD6 y SA2). V= secuencia exónica del vector.

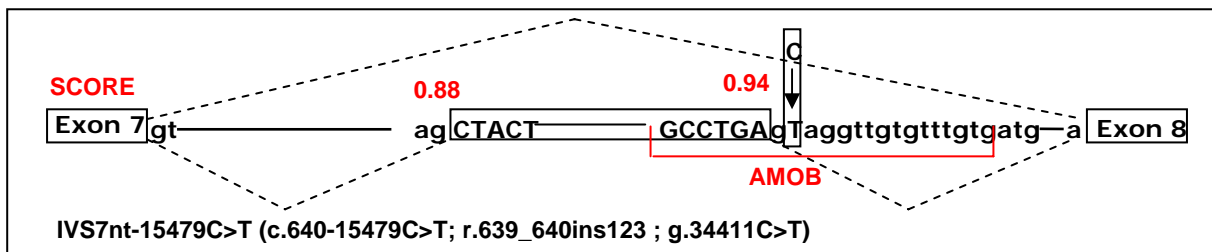


Figura 40. Representación esquemática de la mutación IVS7-15479C>T que afecta al procesamiento del mRNA. Se indican los exones y pseudoexón en recuadros y la posición del AMOB utilizado para bloquear el *splicing*. Los cambios nucleotídicos aparecen en un recuadro. En rojo se indica la probabilidad de *splicing* de cada sitio donador y aceptor estimada informáticamente (20H http://www.fruitfly.org/seq_tools/other.html).

Se llevó a cabo el análisis funcional de la mutación **c.640-15479C>T** mediante el vector pSPL3 conteniendo el pseudoexón y sus secuencias adyacentes (Fig. 41 A), con ello se pretendía comprobar que ese cambio nucleotídico provocaba la inserción de 123 pb, y en que porcentaje de transcritos lo hacía.

Los resultados obtenidos se ajustaron a lo observado *in vivo* (Schollen *et al.* 2007), es decir, el cambio nucleotídico provoca un *splicing* aberrante por la creación de un sitio críptico, generándose la inserción de un pseudoexón de 123 pb en todos los transcritos (Fig. 41 B).

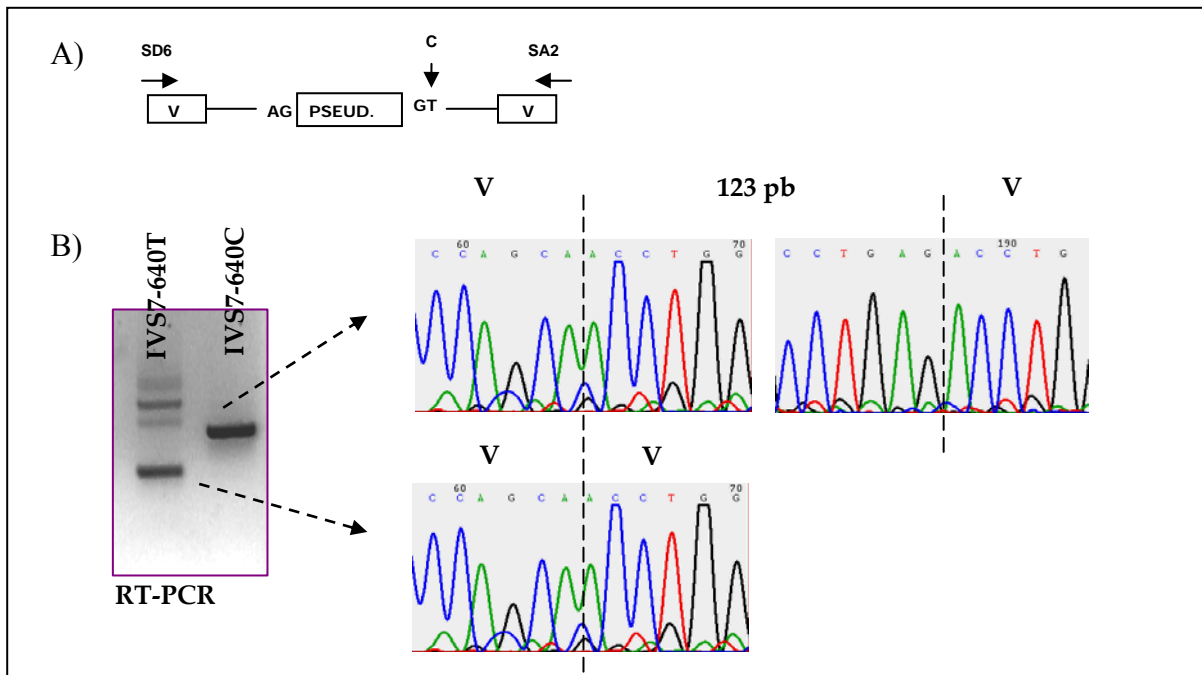


Figura 41. Análisis funcional de la mutación c.640-15479C>T por minigenes. A) Esquema del fragmento de gDNA introducido en el vector pSPL3. B) La figura muestra el patrón de RT-PCR y la secuencia de los fragmentos obtenidos resultado de los minigenes normal y mutante. Para la RT-PCR se utilizaron primers específicos del vector (SD6 y SA2). V= secuencia exónica del vector.

4.6 ESTUDIO DE TERAPIAS ESPECÍFICAS DE MUTACIONES DE *SPLICING*.

Se plantearon 2 alternativas que pudieran ser aplicadas en las mutaciones de *splicing*: la sobreexpresión de distintos factores de *splicing* con la intención de modular el proceso de maduración del mRNA y recuperar transcritos correctamente procesados, en aquellas mutaciones que tienen afectadas las secuencias consenso implicadas en este proceso, y la aplicación de oligonucleótidos antisentido con la intención de bloquear aceptores o donadores de *splicing* implicados en la exonización de secuencias intrónicas.

4.6.1 Efecto de la sobreexpresión de factores de *splicing* sobre mutaciones que afectan al procesamiento del mRNA

Algunas mutaciones de *splicing* pueden dar lugar a niveles detectables de mRNAs correctamente procesados, generándose ciertos niveles de proteína normal. Se ha demostrado en diversos trabajos que la sobreexpresión de factores de *splicing* y diversas drogas incrementan los niveles de mRNA correctamente procesado (Nissim-Rafinia et al. 2004). Se procedió a estudiar el efecto que podría tener la sobreexpresión de distintos

factores de *splicing* sobre las mutaciones IVS7-9T>G y IVS3-1G>C identificadas en el gen *PMM2* que afectan al correcto procesamiento del mRNA.

Debido a que la mutación **IVS7-9T>G** parece estar localizada en el tracto polipirimidínico del intrón 7 del gen *PMM2*, se pensó que podría estar afectando la unión del factor de *splicing* U2AF⁶⁵ (Tronchere et al. 1997; Zuo and Maniatis 1996). Además, está descrito que una sobreexpresión de los factores de *splicing* SC35 y SF2/ASF parece tener un efecto activador de *splicing* normal en mutaciones que se encuentran localizadas en esta región (Manley and Tacke 1996). Por este motivo, se realizó un estudio cotransfectando células de hepatoma Hep3B con el minigen correspondiente y distintos factores de *splicing* (U2AF⁶⁵, SC35, SRp40, SRp55 y SF2/ASF). Los resultados mostraron que con la sobreexpresión de los factores SC35 y SF2/ASF aunque no se consigue la activación del *splicing* normal sí se recupera el transcrito portador de la inserción de 66 pb que se observaba en el perfil transcripcional de los pacientes (Fig. 42).

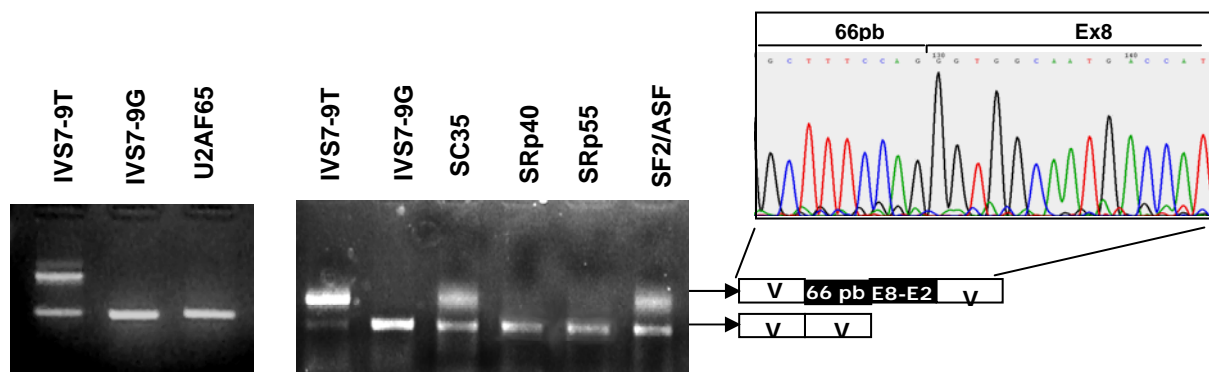


Figura 42. Efecto de la sobreexpresión de factores de *splicing* sobre la mutación IVS7-9T>G. La figura muestra el patrón de RT-PCR resultante de la transfección con los minigenes portadores del alelo normal y mutante junto con factores de *splicing*. Para la RT-PCR se utilizaron primers específicos del vector (SD6 y SA2). V= secuencia exónica del vector.

Del mismo modo, como la mutación **IVS3-1G>C** parece estar afectando también a la unión de los factores U2AF⁶⁵ o U2AF³⁵, se realizó un estudio cotransfectando células de hepatoma Hep3B con el minigen correspondiente y dichos factores de *splicing*. El resultado obtenido fue que con la sobreexpresión de U2AF⁶⁵ se produjo la activación del aceptor de *splicing* débil (*score* = 0.18) del intron 2 pero no se compensó la mutación, ni se recuperó el *splicing* normal del intrón 3 (Fig. 43).

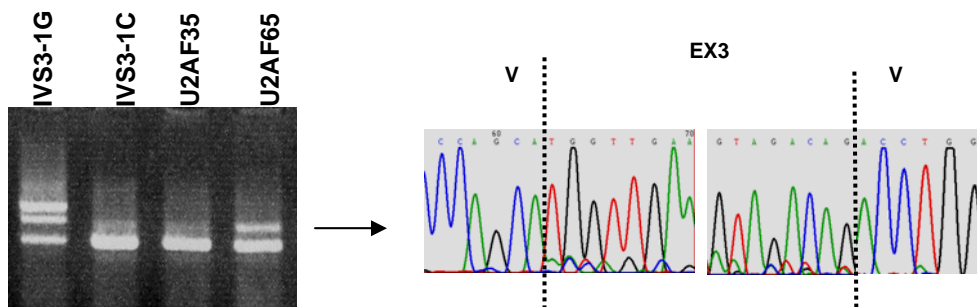


Figura 43. Efecto de la sobreexpresión de factores de *splicing* sobre la mutación IVS3-1G>C La figura muestra el patrón de RT-PCR resultante de la transfección con los minigenes portadores del alelo normal y mutante junto con factores de *splicing*. Para la RT-PCR se utilizaron primers específicos del vector (SD6 y SA2). V= secuencia exónica del vector.

4.6.2 Uso de terapia antisentido tipo morfolino (AMOs) en mutaciones causantes de exonización de secuencias intrónicas.

Los alelos portadores de mutaciones intrónicas, como la **IVS7-15479C>T**, con activación de sitios críticos de *splicing*, son particular interesantes para intentar una terapia génica basada en el bloqueo del sitio de *splicing* aberrante quedando el sitio salvaje intacto recuperándose el *splicing* normal.

Para comprobar la patogenicidad de la mutación **IVS7-15479C>T**, que provoca la inserción de 123 pb, además de los estudios funcionales con los minigenes descritos anteriormente, se diseñaron dos oligonucleótidos antisentido (AMOs) que bloquearan estéricamente el sitio 5' o 3' de *splicing* del pseudoexón con el objetivo de recuperar el *splicing* normal, y con ello la funcionalidad de la proteína. Se transfectaron fibroblastos del paciente con los oligonucleótidos antisentido (AMOs) a distintas concentraciones y se monitorizó el efecto mediante los análisis del perfil transcripcional y de expresión y actividad de la proteína PMM 2.

Cuando se analizó el efecto que producía la transfección con AMOs (AMO A y AMO B) sobre células del paciente a distintas concentraciones, se obtuvo como resultado que a una concentración de 20 μM se recuperaba totalmente el *splicing* normal, obteniéndose la amplificación de un solo transcrito que contenía la mutación V231M en heterocigosis (Fig. 44). Con ambos AMOs se obtuvo el mismo resultado, siguiendo el estudio sólo con AMO B.

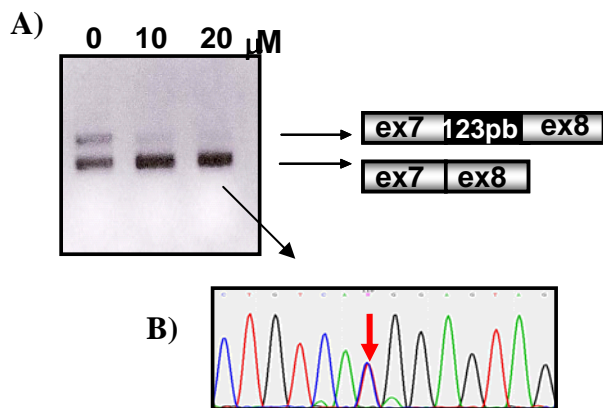


Figura 44. Perfil transcripcional del paciente CDG Ia obtenido tras la transfección con AMOs. A) Se realizó el estudio a partir de fibroblastos de piel del paciente sin tratar (0) y tratados con AMO A o B a 10 μM y 20 μM durante 24 h. Para el análisis se ha utilizado un primer localizado entre el exon 6 y 7 y otro localizado en la zona 5'UTR. El transcrito amplificado se ha identificado por secuenciación cíclica directa. B) Secuencia de la banda inferior en la que aparece la mutación V237M en heterocigosis.

Una recuperación del *splicing* normal debía corresponderse con un aumento en la expresión de la proteína PMM 2. Para comprobarlo, se realizó un estudio mediante *Western blot* de fibroblastos del paciente transfectados con AMO B a una concentración de 20 μM e incubados durante 48 horas. Con este estudio pudimos observar un aumento del 14% de proteína inmunorreactiva (Fig. 45).

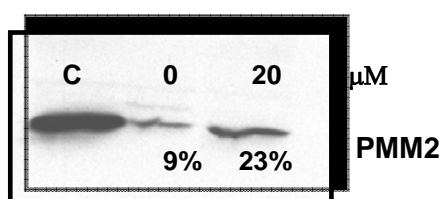


Figura 45. Aumento de la expresión de la proteína PMM 2 tras el tratamiento con AMO B detectado mediante *Western blot*. Se realizó el estudio a partir de células del paciente sin tratar (0) y tratadas con AMO B 20 μM durante 48 h. C = fibroblastos control.

Por último, un aumento en la expresión de la proteína PMM 2 se debía corresponder, también, con un aumento en la actividad de la misma. Para ello, se transfectaron fibroblastos del paciente con oligonucleótidos antisentido (AMO B) a 20 μM durante 48 h y se midió la actividad PMM 2 según el método de Van Schaftingen et al., 1995 modificado por De Koning et al, 1998 (Fig. 46).

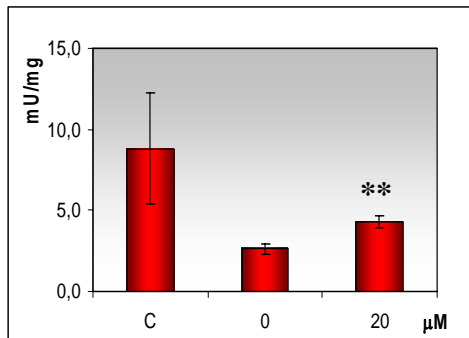


Figura 46. Corrección de la actividad PMM 2 tras el tratamiento con AMO B. Se realizó el estudio a partir de células del paciente sin tratar y tratadas con AMO B 20 μM durante 48 h. C = fibroblastos control. ** indica el grado de significación estadística con $p < 0.01$ en la recuperación de la actividad.

Con el tratamiento con morfolinós conseguimos un aumento al doble de la actividad PMM 2 y con ello, una actividad estadísticamente significativa cercana a los valores normales.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha llevado a cabo la caracterización bioquímica y molecular de pacientes con Defectos Congénitos de Glicosilación, así como la caracterización y el estudio funcional de las variantes alélicas encontradas. Con ello se pretende ampliar el conocimiento de este tipo de defectos y así tener la posibilidad de profundizar en la aplicación de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas.

5.1 DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN DE PACIENTES CON DEFECTOS CONGÉNITOS DE GLICOSILACIÓN

Durante los últimos 20 años, investigadores clínicos y bioquímicos han colaborado en la identificación de más de una veintena de enfermedades genéticas, los Defectos Congénitos de Glicosilación (CDG), causadas por algún defecto en la ruta de la N-glicosilación de proteínas. Este grupo de enfermedades presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas que abarcan multitud de órganos y tejidos. Se han descrito en los individuos afectados alteraciones visuales, gastrointestinales, endocrinas, hepáticas, del sistema inmunitario, del proceso de coagulación, alteraciones del sistema nervioso y malformaciones. La heterogeneidad de estas manifestaciones clínicas hace difícil el diagnóstico clínico, siendo necesaria la puesta a punto de diversas técnicas bioquímicas y genéticas para llegar a un diagnóstico certero.

Inicialmente, se realizó un *screening* mediante la cuantificación del %CDT (porcentaje de transferrina deficiente en carbohidratos) en sueros de pacientes remitidos desde hospitales de la Comunidad de Madrid y otras comunidades autónomas para el estudio de enfermedades metabólicas hereditarias, con el fin de seleccionar de forma rápida pacientes candidatos a tener un CDG. Durante el desarrollo de este trabajo se ha puesto a punto un conjunto de análisis bioquímicos, enzimáticos y moleculares que ha permitido el diagnóstico de 26 pacientes con CDG I en distintos subgrupos 14 pacientes CDG Ia, 2 CDG Ib, 2 CDG Ie, 1 CDG Ij y 7 pacientes CDG Ix en los que no se conoce aún el defecto genético. El conocimiento del espectro mutacional de estas enfermedades genéticas además de un valor diagnóstico tiene un valor terapéutico añadido, ya que existen terapias específicas de mutación. Además se ha iniciado el estudio del proteoma sérico de pacientes CDG Ia, lo que podría ser de utilidad en la búsqueda de nuevos marcadores bioquímicos para el diagnóstico y nuevas dianas terapéuticas.

En primer lugar, se clasificaron los pacientes con el estudio del grado de glicosilación de ciertas glicoproteínas séricas como son la transferrina, α_1 -antitripsina y apolipoproteína CIII mediante IEF.

El análisis de la transferrina permitió identificar 45 posibles pacientes CDG con algún tipo de defecto de glicosilación, bien secundario a otra enfermedad, bien causado por una variante polimórfica de la propia proteína o bien un auténtico CDG. La transferrina parece ser el biomarcador por excelencia de este tipo de defectos, ya que la presencia de un patrón anómalo de sus isoformas séricas permite identificar a los pacientes y además, según la tipología del patrón alterado, clasificarlos en CDG I o II, es decir, en aquellos que

posiblemente presenten un defecto en el ensamblaje y transferencia del LLO (tipo I) o en aquellos que pueden presentar el defecto en las posteriores modificaciones del glicano unido a la proteína (tipo II) (Grunewald et al. 2002). Mediante el tratamiento con neuraminidasa de los sueros, y por tanto, la eliminación de los ácidos siálicos, pudimos discriminar si el patrón alterado de la Tf se debía a la existencia de una variante aminoacídica o subtipo de dicha proteína, lo que podría confundir el diagnóstico.

Complementariamente, el análisis de las isoformas de la α_1 -antitripsina sérica mediante IEF ha ayudado a la detección de pacientes que presentaban un patrón dudoso de la transferrina. De hecho, en un paciente (19042) en el que se había observado un patrón dudoso en la Tf en suero y en el que se había verificado la existencia de una variante aminoacídica de la misma, se observó la presencia de bandas de hipoglicosilación en el análisis de la α_1 -antitripsina, lo que corroboró la sospecha de un CDG. Finalmente, el estudio enzimático y genético confirmó un defecto en la enzima PMM 2 (CDG Ia).

Se ha observado que todos los pacientes con sospecha de CDG I presentaron un patrón alterado de las isoformas de la α_1 -antitripsina, sin embargo, sólo la mitad de los pacientes tipificados como posibles CDG II presentaron alteración de esta proteína. Todavía no se ha localizado el defecto genético en estos últimos, por lo que no sabemos si el patrón normal de la α_1 -antitripsina sérica de algunos pacientes tipificados como CDG II se corresponde con el hecho de que realmente no son pacientes CDG y la alteración del patrón de la transferrina es secundaria a otra patología. Por otro lado, la incoherencia de resultados entre estas dos glicoproteínas hepáticas también podría estar relacionada con la gravedad del defecto de glicosilación de los pacientes, ya que la transferrina es un marcador más sensible para detectar la hipoglicosilación que la α_1 -antitripsina (Fang et al. 2004). Esta mayor sensibilidad, además, nos ha permitido valorar la evolución bioquímica de uno de los pacientes con deficiencia en la enzima PMI (CDG Ib) al ser tratado con manosa, observándose como se corrige el patrón anómalo de las isoformas de la transferrina a lo largo de los meses de tratamiento, lo que confirma la adecuada glicosilación de sus proteínas (Hendriksz et al. 2001).

Debido a que las rutas de la N- y la O-glicosilación de proteínas comparten enzimas y transportadores en el aparato de Golgi, se han descrito pacientes que presentan un defecto simultáneo en ambas rutas. Estos pacientes tienen un defecto en alguna de las subunidades del complejo conservado oligomérico de Golgi (COG), implicado en la regulación, compartimentalización, transporte y actividad de varios enzimas del aparato de Golgi, o en algunos transportadores de azúcares, presentan un defecto combinado fácilmente detectable por el análisis de la transferrina y de la Apo CIII, lipoproteína O-glicosilada tipo mucina (Foulquier et al. 2006; Spaapen et al. 2005). Finalmente, el estudio mediante IEF de las isoformas de la apolipoproteína CIII sérica de los 6 pacientes tipificados como CDG tipo II descartó la existencia de este tipo de defectos (Albahri et al. 2006) entre nuestros pacientes.

La determinación de las actividades PMM 2 y PMI en fibroblastos de piel de pacientes CDG I permitió diagnosticar 8 pacientes con CDG Ia. Aunque está descrito en la literatura que la actividad PMM 2 en fibroblatos de pacientes puede solaparse con la de controles (Niehues et al. 1998; Van Schaftingen and Jaeken 1995), en nuestra experiencia,

todos los pacientes CDG Ia presentaron una actividad PMM 2 en fibroblastos de piel deficiente del 8 al 31% respecto al valor control y un ratio PMI/PMM 2 patológico de 2 a 10 veces mayor, que nos permitió realizar un diagnóstico preciso del defecto. El hecho de que no hayamos identificado pacientes con actividades menores del 8% junto con que no se hayan descrito pacientes homocigotos para mutaciones nulas (Pirard et al. 1999) parece corroborar que es esencial para la vida mantener cierta actividad residual de glicosilación. Este hecho es apoyado por estudios realizados en ratones *knockout* para PMM2 donde se demostraba que la gestación se detenía a los pocos días de la fecundación (Thiel et al. 2006). También se diagnosticaron 2 casos con CDG Ib que presentaban una actividad PMI deficiente del 16 al 30% respecto a la media de controles. Estos pacientes presentaban una sintomatología clínica diferente a los pacientes CDG Ia, ya que no padecían síntomas neurológicos sino síntomas gastro-hepáticos. Es el único tipo de CDG I que tiene tratamiento efectivo en la actualidad y una vez confirmado el defecto, se administró manosa oralmente que ha resultado en la remisión de gran parte de la sintomatología típica y en una buena evolución psicomotora y mental. Esto confirma lo ya observado en otros casos de que la aportación de manosa a la dieta promueve la vía alternativa a través de la hexoquinasa para la síntesis de manosa-6-P, siendo un tratamiento eficaz para este tipo de defecto (Hendriksz et al. 2001; Niehues et al. 1998)

El análisis molecular de los pacientes ha permitido confirmar el diagnóstico en individuos sintomáticos previamente identificados mediante ensayos enzimáticos. Además ha permitido llevar a cabo el diagnóstico prenatal genético en familias con hijos afectados y el diagnóstico de portadores en individuos asintomáticos con antecedentes familiares. Durante el transcurso de este trabajo se ha realizado el diagnóstico prenatal en 4 familias previamente genotipadas y el estudio de portadores en casi un centenar de familiares.

En este estudio se ha llevado a cabo la caracterización molecular de los pacientes previamente clasificados en CDG Ia y Ib. El análisis genético de los 14 pacientes CDG Ia ha permitido definir un espectro mutacional del gen *PMM2* formado por un total de 18 variantes alélicas: 13 descritas (L32R, D65Y, T237M, V44A, P113L, R123Q, R141H, F157S, R162W, F183S, E197A, F207S y T226S), todas por cambio de aminoácido (Matthijs et al. 2000), y 5 nuevas, 3 presumiblemente por cambio de aminoácido (D209G, P184T y T118S) que no se encontraron en las bases de datos de SNPs ni en controles, y 2 mutaciones intrónicas, IVS7-9T>G y IVS3-1G>C que parecen afectar al proceso de maduración del mRNA.

El primer indicio de que un cambio aminoacídico es causante de enfermedad es porque ocurre en algún residuo conservado de la proteína, es decir, en dominios esenciales para conservar su estructura y/o función. Los estudios de conservación a nivel de la secuencia de aminoácidos en proteínas ortólogas, por lo tanto, también son de utilidad a la hora de analizar si las nuevas variantes identificadas son causantes de enfermedad, ya que estos cambios suelen producirse en residuos que se encuentran altamente conservados entre las enzimas de las distintas especies. En este trabajo se han analizado los cambios puntuales por cambio aminoacídico identificadas en el gen *PMM2*. Este análisis ha mostrado que, efectivamente todas los cambios, con excepción de E197A, afectan a residuos idénticos o muy conservados en todas las secuencias aminoacídicas estudiadas de las proteínas ortólogas alineadas, incluso entre especies muy alejadas evolutivamente, sugiriendo que estas posiciones pueden ser

críticas para la función del péptido. Esto es debido a un fenómeno de selección natural que no permite que cambios en la secuencia de aminoácidos que tengan un efecto patogénico sobre la proteína sean seleccionados evolutivamente. Por el contrario, E197A parece estar afectando a un residuo no conservado sugiriendo que puede ser tolerado por la selección natural, y por lo tanto, parecería tratarse de un SNP. Además se había encontrado en alelos de individuos controles. Paralelamente a este trabajo fue descrito como SNP mediante estudios de expresión (Le Bizec et al. 2005). Con los estudios funcionales realizados posteriormente, se confirmó que todas las variantes alélicas identificadas en el gen *PMM2* son causantes de enfermedad, excepto el cambio E197A que se clasificó como SNP.

Como se ha visto en otros estudios genéticos de pacientes con CDG Ia, se observa una clara predominancia de las mutaciones *missense* (86%) aunque hay un aumento de las mutaciones de *splicing* (14%), frente a lo encontrado en otras series europeas, donde las mutaciones *missense* aparecen con una frecuencia del 98% y las mutaciones de *splicing* y mutaciones por cambio de marco de lectura o *frameshift* de un 1% (<http://www.euroglycanet.org/home.html>).

Es interesante destacar que aunque es poco probable la aparición de pacientes homocigotos para mutaciones en el gen *PMM2* (Kjaergaard et al. 1998; Matthijs et al. 1998), entre nuestros pacientes encontramos un homocigoto para la mutación T237M (8%) que presenta fenotipo leve, lo que parece indicar que la mutación T237M podría considerarse mutación leve. A pesar de ello, la frecuencia de heterocigotos sigue siendo muy elevada (92%).

De todas las variantes alélicas encontradas en el gen *PMM2*, las dos más frecuentes son la T237M y la R141H, ambas con una frecuencia del 15% en los alelos mutantes. Sin embargo, se ha observado que las variantes alélicas más frecuentes en otras poblaciones caucásicas son la R141H (35%) seguida de la mutación F119L (13%) (<http://www.euroglycanet.org/home.html>), cambio que no hemos encontrado entre nuestros pacientes. La T237M aparece con una frecuencia del 2% en otras series. Estos datos, junto con los publicados en el año 2002 por el grupo de Briones (Briones et al. 2002), parecen indicar que el espectro mutacional de pacientes españoles es diferente al de otras poblaciones europeas (<http://www.euroglycanet.org/home.html>).

En los 2 pacientes tipificados como CDG Ib se identificaron 3 variantes alélicas en el gen *MPI* ya reportadas en la literatura pero sin estudios de expresión que demuestren su patogenicidad (Niehues et al. 1998; Schollen et al. 2000a). Se trata de 2 cambios de aminoácido, R219Q en el exon 5 y M51T en el exon 3, y una inserción de una base en el exon 3 (166-167 ins C) que provoca cambio del marco de lectura con la aparición de un codon stop prematuro (PTC) y por lo tanto, la degradación de dicho transcrito por los sistemas de vigilancia de la célula (NMD) (Lejeune and Maquat 2005; Wang et al. 2002).

Se realizó el análisis genético de varios genes causantes de CDG en fibroblastos de piel de los pacientes catalogados como CDG Ix, que presentaban actividades *PMM 2* y *PMI* normales. Se eligieron los genes *ALG6* (CDG Ic) por ser responsable del defecto más frecuente después de los CDG Ia, *DPM1* (Ie) debido a que dos pacientes en estudio eran

originarios de la misma comunidad autónoma en la que ya había un caso documentado y el gen *DPGAT1* (Ij) por la ausencia de especies anómalas de LLO en fibroblastos de piel de uno de los casos, estudio realizado por el Dr. Jaeken (Leuven, Bélgica), que orientaba hacia un defecto en los pasos iniciales de la síntesis del oligosacárido estándar o LLO. Los 2 pacientes diagnosticados como CDG Ie por ser portadores de mutaciones en el gen *DPM1*, son compuestos homocigotos de una única mutación, ya descrita (García-Silva et al. 2004) de cambio de aminoácido, serina por prolina en la posición 248 (S248P) en el exon 9 del gen *DPM1*. El aumento encontrado en su frecuencia alélica, probablemente, se debe a que los pacientes pertenecen a una población con cierto grado de aislamiento genético, ya que todos son originarios de las Islas Canarias y aunque los datos de consanguinidad no indican que sean pacientes relacionados, probablemente sea el mismo alelo. No parece existir relación genotipo-fenotipo, seguramente debido a que a la expresión clínica de la enfermedad contribuyen otros factores genéticos y ambientales. Por otro lado, el paciente diagnosticado como CDG Ij, con mutaciones en el gen *DPGAT1*, es un compuesto hererocigoto formado por 2 variantes alélicas por cambio aminoacídico (R301C y L385R) identificadas por primera vez en este estudio. En la actualidad sólo hay un caso descrito en la literatura por el grupo americano de Frezze (Wu et al. 2003). Se trata de cambios no conservativos, ya que se trata de un cambio de un aminoácido básico por uno polar en la posición 301 y uno apolar por uno básico en la posición 385. Además, ambos cambios aminoacídicos afectan a un residuo idéntico o muy conservado en todas las secuencias de las proteínas ortólogas alineadas, incluso entre especies muy alejadas evolutivamente, sugiriendo que estas posiciones pueden ser críticas para la función del péptido. En cualquier caso serán necesario estudios funcionales para comprobar que estos cambios son causantes de enfermedad.

En los últimos años las técnicas proteómicas han protagonizado un gran número de estudios en diferentes enfermedades genéticas debido a que permiten el conocimiento de los niveles de expresión de proteínas y la detección diferencial de proteínas con modificaciones postraduccionales. Por ello, además de la caracterización bioquímica y molecular se ha profundizado en el análisis del proteoma sérico de 2 pacientes CDG Ia que comparten un alelo mutante con el objetivo de intentar relacionar fenotipo con genotipo.

Se han encontrado diferencias en la expresión de 14 glicoproteínas, las cuales participan principalmente en la respuesta inmune, procesos de coagulación y en los mecanismos de protección de tejidos frente al estrés oxidativo. Varias proteínas como la α 1-antitripsina, transferrina, el complemento, haptoglobina, antitrombina III, proteína unida al retinol y ceruloplasmina habían sido ya involucradas previamente en la patología de los CDG Ia (Butler et al. 2003; Henry et al. 1997; Mills et al. 2001; Mills et al. 2003) y en otras enfermedades neurológicas (Lehmensiek et al. 2007). Pero en este estudio se asocia por primera vez la sobreexpresión de varias isoformas de la haptoglobina, α 2-macroglobulina, afamina, fibrina y fibrinógeno con CDG Ia. Varias de las proteínas identificadas están involucradas en la cascada del complemento, el cual es un importante mediador de la inflamación y contribuye a la regulación de la respuesta inmunitaria. Si atendemos al factor C3c del complemento vemos que el paciente 22692 que presenta disminución en las isoformas de esta proteína ha sufrido infecciones recurrentes, mientras que el paciente 20484, que por el contrario presenta aumento de sus niveles, parece poseer resistencia frente a ellas.

El fibrinógeno participa en la coagulación, inflamación y respuesta inmunitaria, siendo especialmente importante en la formación del trombo. La trombina es una proteína encargada de la degradación del trombo. Altos niveles de fibrinógeno se han visto asociados a enfermedades cardiovasculares. Se ha visto que anomalías en el proceso de coagulación debidas a una inadecuada glicosilación de los factores de coagulación o inhibidores de la misma pueden provocar cuadros trombóticos o hemorrágicos en este tipo de pacientes (Fiumara et al. 1996; Stibler et al. 1996; Young and Driscoll 1999). El aumento de expresión del fibrinógeno junto con la disminución en la expresión de la antitrombina III en nuestros pacientes podría estar indicándonos un alto riesgo de sufrir eventos trombóticos. Según esto, se podría utilizar la proteómica como herramienta para distintas intervenciones terapéuticas. Se ha propuesto la aspirina en baja dosis como profilaxis en pacientes CDG Ia que presentan eventos trombóticos (Arnoux et al. 2008). La diferencia en la expresión en proteínas involucradas en la inflamación y en los procesos de coagulación corrobora las alteraciones encontradas en estos procesos en este tipo de defecto.

Si atendemos al genotipo de estos pacientes, ambos son compuestos heterocigotos de una mutación *missense* con la mutación IVS7-9T>G, considerada nula según hemos visto en los estudios funcionales descritos en este trabajo. Podemos observar que el paciente 22692 portador de la mutación D65Y, que *in vitro* presenta menor actividad residual (20%), presenta una mayor alteración en el patrón proteómico que el paciente 20484 portador de la mutación T237M, la cual retiene mayor actividad residual *in vitro* (48%). Según este estudio parece haber una buena correlación entre las alteraciones proteómicas encontradas y la clínica que presentan los pacientes, lo que nos podría hacer considerar a la proteómica como herramienta para el diagnóstico y profilaxis en estos defectos y para el estudio de nuevas dianas terapéuticas.

5.2 ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS VARIANTES ALÉLICAS IDENTIFICADAS EN EL GEN *PMM2*.

Para poder predecir la gravedad del fenotipo clínico y bioquímico en los pacientes CDG Ia y además poder investigar nuevas terapias potencialmente aplicables a partir de su genotipo, es necesario conocer tanto la gravedad del efecto causado por las mutaciones sobre la función proteica como los mecanismos a través de los cuales estas mutaciones causan la pérdida de dicha función. Desde la información codificada en un gen hasta la traducción a una proteína efectora existen varios procesos intermedios, que también están sujetos a regulación y son susceptibles de cambios. Por tanto, cualquier variante alélica asociada a una enfermedad genética podrá afectar no sólo a nivel de proteína efectora, sino también los procesos de transcripción y procesamiento del mensajero, así como su estabilidad.

En el caso de mutaciones que causan un cambio de aminoácido en la secuencia de la proteína *PMM 2* (que representan el 86% de los alelos mutantes detectados), los estudios de expresión *in vitro* son necesarios para caracterizar sistemáticamente el efecto causado por estas mutaciones sobre la estabilidad, función y regulación de la proteína, y además para

determinar si las variantes alélicas nuevas son causantes de enfermedad. Para ello, en este trabajo hemos realizado estudios *in vivo* a partir de fibroblastos de piel de pacientes CDG Ia en los que se analizaba los niveles de expresión de la proteína PMM 2 mediante *Western blot* y los niveles de expresión del gen *PMM2* mediante qRT-PCR. Además hemos realizado estudios funcionales de las variantes alélicas por cambio de aminoácido mediante su expresión en un sistema procariota.

Los análisis de expresión de la proteína PMM 2 en fibroblastos de piel de pacientes CDG Ia nos mostró, que excepto el paciente 22682, con genotipo D209G/ P113L, que presentaba un 74% de proteína inmunorreactiva, el resto de pacientes presentaban una disminución significativa en los niveles de expresión de la proteína, lo que podría ser debido a que las mutaciones causan inestabilidad del mRNA y/o inestabilidad de la proteína. A excepción de las líneas celulares portadoras de la mutación IVS7-9T>G que presentaron niveles disminuidos de mRNA cuando se analizó por qRT-PCR, en el resto de las líneas celulares portadoras de mutaciones *missense* los resultados sugieren que no hay un efecto sobre la estabilidad del mRNA. Lo que parece indicar que la disminución significativa encontrada en los niveles de proteína PMM 2 inmunorreactiva son debidos a un efecto sobre la estabilidad de la proteína por aumento en la tasa de degradación y/o agregación proteica.

Con los estudios de expresión *in vitro* a 37°C de las mutaciones *missense* llevadas a cabo en *E.coli*, se ha detectado una actividad deficiente de la proteína PMM 2 en todas las variantes alélicas analizadas, incluidas las nuevas D209G, P184T y T118S identificadas en este trabajo, lo que confirma que son causantes de enfermedad, excepto E197A con valores cercanos a la proteína salvaje y que por lo tanto, ha sido catalogada como un SNP (Le Bizec et al. 2005). El resto de las mutaciones pueden ser clasificadas en grupos según su actividad residual: mutaciones de actividad intermedia (54-44%) como T118S, L32R, T237M y P113L, mutaciones de baja actividad residual (21-16%) como D65Y y V44A y por último mutaciones con actividad nula (<1%) como son F157S, P184T, F207S, R123Q, R141H y D209G. Además estos estudios también nos ha permitido clasificar las mutaciones en aquellas que parecen estar afectando a la función catalítica de la proteína y 5 posibles mutaciones que podrían estar afectando al plegamiento y/o estructura de la PMM 2, D65Y, V44A, F207S, F157S y P184T, pues se detectaba una disminución en la cantidad de proteína inmunorreactiva, como ya se había detectado en los estudios realizados en las líneas celulares de los pacientes. Podemos observar que los niveles de proteínas obtenidos en los estudios de expresión en el sistema procariota son ligeramente más elevados que los obtenidos en los estudios de estabilidad llevada a cabo en fibroblastos de pacientes, dónde hay disminución de proteína inmunorreactiva prácticamente en todos los casos. Probablemente, este hecho sea debido a que la proteína GST fusionada a la PMM 2, utilizada en los estudios de expresión, estabiliza a las proteínas mutantes. Este hallazgo parece indicar que para confirmar que las mutaciones catalogadas como catalíticas son, finalmente, mutantes que no afectan al plegamiento de la proteína, sería necesario realizar otros estudios, como perfiles de degradación que permiten el cálculo de vida media o estudios de coexpresión con chaperonas (Bross et al. 1993; Bross et al. 1999; Pey et al. 2003).

En muchas ocasiones el análisis de expresión de alelos *missense* se traduce en niveles reducidos de proteína, que se corresponden con una actividad enzimática disminuida,

resultado de la degradación acelerada de las proteínas mutantes debido a su inestabilidad. Este parece ser un mecanismo común patogénico característico de muchas enfermedades genéticas (Gregersen et al. 2001b; Mohsen et al. 1998). Además se ha visto en ciertas enfermedades como las deficiencias en acil-CoA deshidrogenasas (Bross et al. 1995; Corydon et al. 1998) o la fenilcetonuria (Gamez et al. 2000; Pey et al. 2003), que la estabilidad de péptidos mutantes puede ser modulada *in vitro* mediante cambios en la temperatura de cultivo y en los niveles de chaperonas (Chaudhuri and Paul 2006). Para conocer si las mutaciones D65Y, V44A, F207S, F157S y P184T podrían estar afectando al plegamiento o estructura de la PMM 2 desarrollamos una aproximación experimental combinando estudios de estabilidad de las proteínas normal y mutantes mediante su expresión a 26 y 37°C, con una metodología que permite analizar el recambio proteico mediante la determinación de la vida media de la proteína normal o mutante. Expresando dichas proteínas a 26°C, es decir, favoreciendo el plegamiento, detectamos un aumento en la expresión de las proteínas portadoras de las mutaciones F157S, F207S y P184T, haciéndolas candidatas a ser mutaciones que afectan al plegamiento o estructura de la PMM 2. Los perfiles de degradación a 37°C confirmaron esta hipótesis al observarse una drástica disminución en la vida media de 2 de estas proteínas mutantes.

Los defectos observados en el plegamiento y estabilidad de estas proteínas mutantes podrían catalogar a los Defectos Congénitos de Glicosilación Ia como una **enfermedad conformacional**, como lo son otras enfermedades genéticas, por ejemplo la fibrosis quística (Gelman and Kopito 2003), la fenilcetonuria (Pey et al. 2003) y las deficiencias en acil-CoA deshidrogenasas (Gregersen et al. 2001b). Nuestros resultados indican que el control de calidad proteico celular (*protein quality control*), actuando sobre su plegamiento y/o degradación, puede ser un importante agente modulador de la actividad PMM2 *in vivo*, especialmente en el caso de las mutaciones estructurales. Esto permite el planteamiento de realizar futuros estudios mediante el uso de chaperonas farmacológicas que abrirían nuevas expectativas terapéuticas en este tipo de defectos (Chaudhuri and Paul 2006; Pey et al. 2008). El rescate de proteínas mutantes con defecto en el plegamiento mediante el uso de fármacos es ahora considerado como una posible opción para la corrección de varias enfermedades genéticas como fibrosis quística, enfermedad de Pompe o diabetes neonatal, ilustrando que la combinación de la farmacología y la genética ofrecen la posibilidad de identificar nuevas dianas terapéuticas específicas del genotipo (Cai et al. 2006; Chaudhuri and Paul 2006; Parenti et al. 2007; Pearson et al. 2006).

Las mutaciones que afectan al correcto procesamiento del mRNA se han analizado en un sistema celular mediante minigenes. Los resultados del ensayo de *splicing in vitro* sugieren que los 3 cambios (IVS7-9T>G, IVS3-1G>C y IVS7-15479C>T) son causantes de enfermedad, lo que apoya que ninguno de ellos fuera encontrado en las bases de datos de SNPs. Los perfiles transcripcionales de las líneas celulares de estos pacientes fueron similares a los obtenidos en los minigenes.

La precisa descripción del efecto que las mutaciones tienen sobre el mecanismo de *splicing*, es importante debido a la elevada frecuencia de variantes alélicas identificadas que alteran este proceso. En este trabajo se ha analizado el posible efecto de 3 mutaciones, IVS7-9T>G, IVS3-1G>C y IVS7-15479C>T, identificadas en el gen *PMM2* sobre el procesamiento del mensajero.

En el análisis del perfil transcripcional de los fibroblastos portadores de la mutación IVS7-9T>G se observó que este cambio de nucleótido en la posición -9 del intrón 7 del gen *PMM2* provoca una alteración en el mecanismo de maduración del mRNA debido a la activación de un sitio críptico de *splicing* que da como resultado la inserción de 66 bp entre el exon 7 y el exon 8. Este transcrito aberrante parece ser diana de los sistemas de vigilancia de la célula (NMD) ya que no aparece en los transcritos analizados. Se ha postulado que la imposibilidad de analizar algunas de estas mutaciones a nivel de mRNA mediante RT-PCR, cuando se presentan en heterocigosis en el gDNA, es debida a que la disminución de la estabilidad y, por tanto, cantidad de los transcritos que las portan respecto al mRNA procedente del otro alelo, daría lugar a la retrotranscripción y amplificación favorecida de este último (Jacobson 1996; Maquat 1996). El estudio realizado sobre el efecto de las mutaciones identificadas sobre los niveles de expresión del mRNA del gen *PMM2* ha revelado que la mutación IVS7-9T>G parece tener efecto sobre la estabilidad del mRNA, pues los fibroblastos de piel de los pacientes que portan esta mutación (20484 y 22692) tienen una bajada de expresión entre el 60-40%, siendo más acusada en el paciente con sintomatología más severa, lo que apoyaría la idea de que hay una degradación por el sistema propio de la célula, el sistema NMD, a pesar de no presentar un codon stop prematuro (PTC) al menos a 50-55 pb antes de un sitio de unión exon-exon formado tras el proceso de maduración (*splicing*) (Lejeune and Maquat 2005; Wang et al. 2002). Este hallazgo podría estar indicando que el determinante para que se dispare la reacción del sistema NMD es mucho más complejo que la regla de los 50-55 nt corriente arriba de la unión exon-exon.

Aunque el estudio de las probabilidades de *splicing*, estimadas informáticamente, que poseen el donador y los aceptores no parecen explicar el proceso responsable del efecto de la mutación, las evidencias *in vitro* permiten postular que la mutación IVS7-9T>G afecta a la unión del factor de *splicing* U2AF⁶⁵ al tracto polipirimidínico (Hollins et al. 2005), lo que provoca el no reconocimiento del aceptor de *splicing* normal y la activación del aceptor críptico antes mencionado. Además este cambio nucleotídico no se había encontrado en el estudio por secuenciación de 100 alelos.

Para confirmar que este cambio nucleotídico es causante de enfermedad se analizó *in vitro* mediante minigenes cómo afectaba esta mutación al proceso de *splicing*. Como se trataba del estudio del último exon, el minigen era una construcción artificial del exon 8 con su zona intrónica adyacente portador del 3' aceptor de *splicing*, unido al exon 2 con su zona intrónica adyacente que le aportara el donador 5' de *splicing* (Abuhatzira et al. 2005). En este sistema no se pudo reproducir el *splicing* aberrante observado en fibroblastos de los pacientes genotipados, pues aunque se demostraba que en ninguno de los transcritos se realizaba *splicing* normal, tampoco se obtuvieron transcritos portadores de la inserción de 66 pb. Este hecho puede ser explicado o bien porque los transcritos portadores de la inserción sean resultado del alelo mutante pero de forma minoritaria y que sea otro transcrito el mayoritario y responsable de la degradación por el sistema NMD o porque el sistema de minigenes, aunque es más aproximado a la situación *in vivo*, puede no estar reproduciendo el efecto de algunas mutaciones analizadas probablemente porque carecen de la secuencia genómica adyacente, cuyo contexto es importante para la correcta definición exonica, tal y como sucede en la paraplegia espástica hereditaria (Svenson et al. 2001), y más si tenemos en

cuenta que se trata de un “exon” construido artificialmente y que en el minigen no es el último exon. Probablemente, si la mutación estuviera localizada en el sitio 3’ de *splicing* de un exon interno el perfil transcripcional de los fibroblastos portadores de la mutación provocaría el *skipping* del correspondiente exon, como ocurre en el minigen.

En el análisis del perfil transcripcional de los fibroblastos portadores de la mutación IVS3-1G>C se observó que este cambio de nucleótido en la posición -1 del intrón 3 del gen *PMM2* da lugar a una alteración en el mecanismo de maduración del mRNA provocando la desaparición de la secuencia consenso del 3’ donador de *splicing* del intrón 3 y con ello, el *skipping* de los exones 3 y 4. Este transcrito aberrante no parece ser diana de los sistemas de vigilancia de la célula (NMD), a pesar de presentar un codon stop prematuro (PTC) a más de 55 nucleótidos antes del sitio de unión exon-exon formado tras el *splicing* (Lejeune and Maquat 2005; Wang et al. 2002) pues es amplificado por RT-PCR convencional y en los estudios de estabilidad del mRNA por qRT-PCR no se observa bajada de expresión. Además con el estudio de las probabilidades de *splicing*, estimadas informáticamente, que poseen el donador y los aceptores de los distintos intrones, podemos postular que la eliminación de estos 2 exones podría ser debido a que se afecta la unión del factor U2AF⁶⁵ en el intrón 3 y además podría realizarse de forma natural el *skipping* del exon 3, ya que la probabilidad de *splicing* del aceptor del intrón 2 estimada es del 18%.

Para analizar cómo afectaba la mutación al proceso de *splicing*, se construyó un minigen que contenía los exones 3 y 4 con sus zonas intrónicas adyacentes y el intrón 3 completo. En este sistema se reprodujo lo que observamos en fibroblastos de pacientes mediante qRT-PCR convencional, pues de forma mayoritaria esta mutación genera un transcrito con *skipping* de los dos exones 3 y 4, aunque también se produce un transcrito minoritario, que no se observa en pacientes, en el que sólo hay *skipping* del exon 4. El que una alteración en el aceptor 3’ de *splicing* del intron 3 afecte al proceso de maduración del intrón 2, parece indicar que el proceso de *splicing* en un mismo gen está fuertemente regulado y que la alteración del proceso en uno de los intrones puede modificar la intensidad del *splicing* en intrones adyacentes (Hertel 2008).

En el análisis del perfil transcripcional de los fibroblastos portadores de la mutación IVS7-15479C>T se observó que este cambio de nucleótido en la posición -15479 del intrón 7 del gen *PMM2* provoca una alteración en el mecanismo de maduración del mRNA dando lugar a una inserción en fase de 123 pb entre los exones 7 y 8 (Schollen et al. 2007). Como era esperable, al no generar un PTC, dicho transcrito no es diana del sistema NMD. Los estudios *in silico* de las regiones 3’ y 5’ de este pseudoexón incorporado en el gen *PMM2* predijeron *scores* de *splicing* elevados, lo que explicaba que se produzca dicha inserción. Mediante el estudio con minigenes se comprobó que el efecto de dicho cambio nucleotídico es la activación de un 5’ donador de *splicing* y que dicha secuencia tiene los elementos necesarios para ser procesada como un exon, generando un solo transcrito con la inserción de 123 pb. El hecho de que las regiones consenso de *splicing* sean tan abundantes en el interior de las secuencias intrónicas indica que los intrones tienen la habilidad potencial de codificar falsos exones, los que comúnmente son llamados pseudoexones (Buratti et al. 2006). Se ha propuesto la teoría de que la inserción de pseudoexones represente un sustrato para la evolución de nuevos exones o incluso que estas secuencias participen en la regulación del

proceso de *splicing*. Por otro lado, se ha observado la relación entre la inclusión de pseudoexones en el mRNA maduro y diversas enfermedades genéticas (Buratti et al. 2006; Gurvich et al. 2008; Rincon et al. 2007).

5.3 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO Y DISEÑO DE TERAPIAS ESPECÍFICAS DE MUTACIÓN.

Uno de los fines del análisis funcional de las variantes alélicas es poder clasificar las mutaciones en cuanto a su severidad, correlacionarlo con el fenotipo clínico y bioquímico de los pacientes y así, en base al genotipo predecir el pronóstico y evolución de los pacientes. Esta correlación es difícil de establecer en pacientes con CDG Ia debido a la gran heterogeneidad genética de los mismos, y a que la mayor parte de ellos son compuestos heterocigotos (92%). En general, en nuestra serie de pacientes CDG Ia no se ha encontrado una correlación genotipo-fenotipo clara, y aunque todos permanecen vivos en la actualidad, debido al reciente desarrollo de los sistemas de diagnóstico y la ausencia de un tratamiento eficaz para este tipo de defectos, la mayoría de ellos presentan graves secuelas.

La relación genotipo-fenotipo es más evidente cuando los pacientes son homocigotos para una mutación o funcionalmente hemocigotos (portadores de una mutación PTC), pues se predice más claramente el efecto de dicha mutación. Así, en numerosas enfermedades genéticas las mutaciones severas, bien por afectar a la fase de lectura de la proteína y generar PTC (deleciones, inserciones) o bien por presentar actividad residual nula *in vitro* (*missense*) están, generalmente, asociadas a las formas más graves de la enfermedad. En nuestra serie de pacientes, con excepción del paciente 18440 homocigoto para la mutación T237M con actividad residual intermedia que presenta un fenotipo leve, el resto de los pacientes son hemocigotos de una mutación nula de *splicing* o *missense* (D209G, P184T, F207S, F157S, R123Q y R141H) y una mutación que retiene actividad residual (T118S, T237M, L32R, P113L, D65Y y V44A). Entre los hemocigotos funcionales podemos distinguir pacientes con un fenotipo más leve que podría estar asociado a mutaciones con actividades *in vitro* intermedias (R162W, L32R, P113L) y pacientes más graves asociados a mutaciones con actividades inferiores (D65Y, V44A) también descritas en otras series de pacientes (Grunewald et al. 2001). Sin embargo, la mutación T237M en heterocigosis y con una actividad residual intermedia está asociada a fenotipos leves y moderados, y aunque los estudios de estabilidad *in vitro* no indican que afecte al plegamiento de la proteína, en las líneas celulares de los pacientes la estabilidad está fuertemente comprometida, especialmente en el paciente homocigoto donde se detecta un 50% de PMM 2 inmunorreactiva. Las inconsistencias en la relación fenotipo-genotipo en los pacientes portadores de esta mutación podrían ser explicados por las diferencias interindividuales en el sistema de control celular proteico, como se han descrito en otras enfermedades conformacionales (Bross et al. 1995; Pey et al. 2003).

En cualquier caso, las discrepancias observadas entre el genotipo mutante y la manifestación fenotípica de las enfermedades monogénicas ilustran la idea, cada vez más aceptada, de que la expresión del producto de un locus principal no es el único factor responsable de la manifestación del fenotipo, sino que existen múltiples factores, tanto

genéticos (diferencias intertisulares e interindividuales en la expresión génica de los genes responsables de los factores de *splicing* (Nissim-Rafinia et al. 2004; Nissim-Rafinia and Kerem 2005; Tazi et al. 2005), sistema NMD (Khajavi et al. 2006), control de calidad de proteínas (Bernier et al. 2004) entre otros) como epigenéticos y ambientales, que afectan al fenotipo y que demuestran el carácter complejo también de los defectos monogénicos (Scriver and Waters 1999).

En varias enfermedades genéticas el análisis funcional de las mutaciones ha resultado ser esencial no sólo para el diagnóstico del defecto sino también para diseñar aproximaciones terapéuticas específicas. Se han utilizado fármacos inhibidores de histonas desacetilasas que son capaces de aumentar la transcripción de ciertos factores de *splicing* o proteínas SR regulando el *splicing* alternativo (Brichta et al. 2003; Gottlicher 2004; Shi et al. 2008). Por último, se están creando como una potente alternativa al tratamiento convencional de defectos genéticos terapias basadas en el RNA como diana terapéutica. Estas nuevas terapias se basan en distintas estrategias de reparación del mRNA mediante modificación del *splicing* con el uso de oligonucleótidos antisentido o mediante el silenciamiento de alelos o transcritos específicos mediante RNA interferente (Wood et al. 2007).

En este trabajo hemos utilizado dos aproximaciones terapéuticas capaces de modular el *splicing*: la sobreexpresión de factores de *splicing* y el uso de oligonucleótidos antisentido. Con la sobreexpresión de factores de *splicing*, más concretamente con el factor U2AF⁶⁵, se ha podido activar un sitio 3' de *splicing* débil, sin embargo no recuperamos el *splicing* normal en mutaciones que afectan al tracto polipirimidínico o cuando desaparece la secuencia consenso del sitio 3', indicando que probablemente son cambios mecanísticamente diferentes.

Tras la cotransfección con varios factores de *splicing* (SRp40, SRp55, SC35 y SF2/ASF), hemos visto que la sobreexpresión de SC35 o SF2/ASF provoca una modulación del *splicing* en los pacientes portadores de la mutación IVS7-9T>G ya que se produce la activación del sitio crítico presente en el intrón 7. Varios estudios indican que las proteínas SR juegan un papel importante a la hora de seleccionar el sitio de *splicing*. SC35 y SF2/ASF, considerados activadores de *splicing*, parece que son requeridos en este proceso y seleccionan el sitio de *splicing* en pre-mRNAs que contienen múltiples sitios 5' o 3' (Fu et al. 1992). Se ha visto que la sobreexpresión de ciertos factores de *splicing* incrementan los niveles de mRNA correctamente procesados (Nissim-Rafinia et al. 2004), más concretamente, la sobreexpresión de los factores de *splicing* SC35 y SF2/ASF parecen tener un efecto activador de *splicing* normal en mutaciones que se encuentran localizadas en el tracto polipirimidínico, pues participan en el reclutamiento y estabilización de la unión del factor U2AF a esta región (Manley and Tacke 1996).

Este hecho podría utilizarse para el estudio de nuevas dianas terapéuticas en pacientes portadores de dicha mutación si la proteína mutante resultante, con la inserción de 22 aminoácidos, fuera funcionalmente activa y fuera posible aumentar la expresión de este transcrito en fibroblastos del paciente. Se ha visto que hay fármacos capaces de modular el *splicing* en algunas enfermedades genéticas pues provocan un aumento en la transcripción de ciertos factores de *splicing*. Este es el caso de la cafeína que parece modular el *splicing* mediante el aumento de transcripción del factor SC35. Esto ha sido observado en genes

asociados a cáncer (Shi et al. 2008). Según esto la regulación del *splicing* también podría estar influyendo en los parámetros fenotípicos en los CDG Ia. La modulación del perfil transcripcional por factores proteicos o compuestos químicos, podría constituir un nuevo campo para la aplicación de posibles terapias.

La segunda aproximación terapéutica utilizada fue el uso de oligonucleótidos antisentido. Cuando se llevó a cabo el tratamiento con AMOs en fibroblastos de piel del paciente 25232, portador del pseudoexón, se observó que el perfil transcripcional obtenido a partir del RNA total y mediante RT-PCR cuando la concentración de AMO era de 20 μ M presentaba un 100% de transcritos correctamente procesados. Aunque no se puede afirmar que en la población de células tratadas sólo exista mRNA correctamente procesado, la cantidad de éste parece suficiente para paliar el defecto enzimático. Esto se deduce por el aumento de proteína inmunorreactiva detectada por *Western blot* y el aumento de la actividad PMM 2 a valores cercanos a la normalidad, lo que parece indicar que el mRNA es procesado correctamente y traducido en proteínas activas. Además la recuperación de la actividad a niveles cercanos a la normalidad al impedir la incorporación del pseudoexón en los mRNA, demuestra que la mutación IVS7-15479C>T, la cual genera la inserción de 123 pb, es la causa de la enfermedad. La modulación del *splicing* mediante el uso de oligonucleótidos antisentido (AMOs) ha sido utilizada con éxito en el tratamiento de varias enfermedades genéticas como la fibrosis quística (Friedman et al. 1999), la distrofia muscular de Duchene (Takeshima et al. 2006) y la β -talasemia (Suwanmanee et al. 2002) por interferir en el proceso de *splicing* y originar proteína funcional. La existencia de un paciente con CDG Ia cuyas características genéticas permitía postular una posibilidad de beneficio con la aplicación de esta terapia nos impulsó a realizar estos ensayos, pues la utilización de AMOs podría ser una terapia génica potencialmente aplicable a pacientes con Defectos Congénitos de Glicosilación.

Las terapias basadas en el RNA, dentro de las cuales se encuentra la terapia con AMOs presentan toda una serie de ventajas con respecto a las terapias convencionales de reemplazamiento génico. ya que no presentan peligro de integración en el genoma huésped y permiten modificar la expresión génica sin alterar la regulación normal del gen a nivel de gDNA (Wood et al. 2007). Una gran ventaja de estos oligonucleótidos antisentido tipo morfolinos es que tienen una gran estabilidad, son muy resistentes a nucleasas y a la degradación por RNAsaH cuando forman híbridos con el RNA. Si embargo, las mayores dificultades para la utilización *in vivo* de estos AMOs son su vehiculización para que puedan llegar a los tejidos de interés y la determinación de la dosis óptima que permita obtener de forma simultánea la recuperación de los transcritos de interés sin una toxicidad elevada. Un ejemplo de su utilización *in vivo* es la distrofia muscular de Duchene en la que los oligonucleótidos antisentido han sido utilizados en pacientes de forma intramuscular restaurándose parcialmente la distrofina (Aartsma-Rus et al. 2007; van Deutekom et al. 2007). El efecto que los AMOs han producido *in vitro* en las células del paciente nos hace especular que este tipo de terapia pudiera ser una estrategia terapéutica eficiente y prometedora en este tipo de defectos.

En las enfermedades metabólicas hereditarias el porcentaje de variantes alélicas identificadas, analizando los fragmentos exónicos con la región codificante más las regiones

intrónicas adyacentes de cada exon, está entre el 95-98 % de los alelos. El resto de variantes alélicas no identificadas (2-5%) se postula que podrían encontrarse en regiones promotoras, regiones de poliadenilación o podrían producir inserciones de pseudoexones que generarían un mRNA aberrante. Las inserciones o deleciones que no provocan PTC serían detectadas por RT-PCR convencional pero las que provocan cambio en la fase de lectura y generan PTC serían diana del sistema NMD, siendo degradado el mRNA de manera acelerada y no pudiendo ser detectado por los sistemas tradicionales de detección de mutación. En estos casos, con la utilización de compuestos (emetina o puromicina) que inhiben este sistema NMD, se podrían detectar transcritos aberrantes, algunos con pseudoexones, por lo que potencialmente podría haber un mayor número de pacientes que los identificados actualmente susceptibles de ser tratados con terapia antisentido, tanto en ésta como en otras enfermedades genéticas humanas.

Las estrategias basadas en la modulación de los procesos de *splicing* representan en la actualidad una opción terapéutica que podría ser aplicada en ésta y otras enfermedades genéticas humanas. El siguiente reto es la investigación de vehículos seguros y efectivos basados en la tecnología de las nanopartículas que nos permitan dirigir específicamente los oligonucleótidos a los tejidos diana, así como la generación de modelos animales *knock-in* para su ensayo *in vivo*.

6. CONCLUSIONES

1. La utilización de la transferrina como marcador sérico es muy útil para la detección de los Defectos Congénitos de Glicosilación, aunque es necesario para una correcta clasificación, que se complementa con el análisis de otros marcadores séricos como la α 1-antitripsina y la apolipoproteína CIII.
2. El estudio del proteoma sérico de pacientes CDG representa una buena herramienta para investigar los sistemas biológicos afectados. Podría ser también de gran utilidad para la búsqueda de nuevas aproximaciones terapéuticas dirigidas hacia una mejor prevención sintomatológica y un mejor seguimiento de la evolución clínica del paciente.
3. El espectro mutacional de nuestra serie de pacientes CDG Ia difiere al descrito en otras poblaciones europeas, siendo las mutaciones T237M (15%) y R141H (15%) las más frecuentemente encontradas y con una presencia inusualmente elevada de mutaciones de *splicing*.
4. El análisis funcional de las variantes identificadas en el gen *PMM2* ha demostrado que todos los cambios nuevos identificados en este estudio son causantes de enfermedad y que varias de ellas afectan al plegamiento de la proteína (**enfermedad conformacional**). Este hecho permitirá, posiblemente, la futura aplicación de chaperonas farmacológicas como tratamiento en numerosos pacientes.
5. Con este estudio hemos identificado mutaciones severas con actividad residual nula (D209G, P184T, R141H, R123Q, F207S, F157S, IVS3-1G>C, IVS7-9T>G y IVS7-15479T>C) y mutaciones que presentan cierta actividad residual (T118S, L32R, T237M, P113L, D65Y y V44A). Todos los pacientes genotipados son hemocigotos funcionales de una mutación severa y una que retiene actividad residual.
6. Aunque la relación genotipo-fenotipo es difícil de establecer en una enfermedad genotípicamente tan heterogénea como los CDG Ia, podemos concluir que las mutaciones V44A y D65Y parecen estar asociadas a fenotipos clínicos más severos, mientras que las mutaciones L32R, P113L, R162W y T237M parecen estar asociadas a fenotipos clínicos más leves.
7. El uso de oligonucleótidos antisentido en fibroblastos de un paciente con CDG Ia ha demostrado que la inserción detectada en su perfil transcripcional es causante de enfermedad, y que la terapia antisentido aplicada *in vitro* es efectiva para mutaciones que generan inserción de pseudoexones. Este tipo de terapia pudiera ser una opción prometedora en pacientes CDG Ia, para los cuales, hasta la fecha, no hay tratamiento efectivo.

8. Los estudios de las bases moleculares de las enfermedades genéticas y el conocimiento de los mecanismos de acción de las variantes alélicas aportan una base científica para la aplicación e investigación de nuevas dianas terapéuticas, y demuestran que el estudio molecular de las enfermedades genéticas humanas además de tener un valor diagnóstico tiene un valor terapéutico añadido.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aartsma-Rus A, Janson AA, van Ommen GJ, van Deutekom JC (2007) Antisense-induced exon skipping for duplications in Duchenne muscular dystrophy. *BMC Med Genet* 8: 43
- Aartsma-Rus A, van Ommen GJ (2007) Antisense-mediated exon skipping: a versatile tool with therapeutic and research applications. *Rna* 13: 1609-24
- Abuhatzira L, Makedonski K, Galil YP, Gak E, Zeev BB, Razin A, Shemer R (2005) Splicing mutation associated with Rett syndrome and an experimental approach for genetic diagnosis. *Hum Genet* 118: 91-8
- Adamowicz M, Pronicka E (1996) Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome--like transferrin isoelectric focusing pattern in untreated fructosaemia. *Eur J Pediatr* 155: 347-8
- Albahri Z, Marklova E, Dedek P, Hojdikova H, Fiedler Z, Lefeber D, Wevers RA, Morava E, Wopereis S (2006) CDG: a new case of a combined defect in the biosynthesis of N- and O-glycans. *Eur J Pediatr* 165: 203-4
- Allen AC, Harper SJ, Feehally J (1995) Galactosylation of N- and O-linked carbohydrate moieties of IgA1 and IgG in IgA nephropathy. *Clin Exp Immunol* 100: 470-4
- Andreassi C, Angelozzi C, Tiziano FD, Vitali T, De Vincenzi E, Boninsegna A, Villanova M, Bertini E, Pini A, Neri G, Brahe C (2004) Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet* 12: 59-65
- Andreassi C, Jarecki J, Zhou J, Coovert DD, Monani UR, Chen X, Whitney M, Pollok B, Zhang M, Androphy E, Burghes AH (2001) Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients. *Hum Mol Genet* 10: 2841-9.
- Arnoux JB, Boddaert N, Valayannopoulos V, Romano S, Bahi-Buisson N, Desguerre I, de Keyzer Y, Munnich A, Brunelle F, Seta N, Dautzenberg MD, de Lonlay P (2008) Risk assessment of acute vascular events in congenital disorder of glycosylation type Ia. *Mol Genet Metab* 93: 444-9
- Aronica E, van Kempen AA, van der Heide M, Poll-The BT, van Slooten HJ, Troost D, Rozemuller-Kwakkel JM (2005) Congenital disorder of glycosylation type Ia: a clinicopathological report of a newborn infant with cerebellar pathology. *Acta Neuropathol (Berl)*
- Axford JS, Sumar N, Alavi A, Isenberg DA, Young A, Bodman KB, Roitt IM (1992) Changes in normal glycosylation mechanisms in autoimmune rheumatic disease. *J Clin Invest* 89: 1021-31
- Bean P, Sutphin MS, Liu Y, Anton R, Reynolds TB, Shoenfeld Y, Peter JB (1995) Carbohydrate-deficient transferrin and false-positive results for alcohol abuse in

- primary biliary cirrhosis: differential diagnosis by detection of mitochondrial autoantibodies. *Clin Chem* 41: 858-61
- Bernier V, Lagace M, Bichet DG, Bouvier M (2004) Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases. *Trends Endocrinol Metab* 15: 222-8
- Blank C, Smith LA, Hammer DA, Fehrenbach M, Delisser HM, Perez E, Sullivan KE (2006) Recurrent infections and immunological dysfunction in congenital disorder of glycosylation Ia (CDG Ia). *J Inher Metab Dis*
- Blencowe BJ (2000) Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem Sci* 25: 106-10.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Brichta L, Hofmann Y, Hahnen E, Siebzehnrubl FA, Raschke H, Blumcke I, Eyupoglu IY, Wirth B (2003) Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 12: 2481-9
- Briones P, Vilaseca MA, Schollen E, Ferrer I, Maties M, Busquets C, Artuch R, Gort L, Marco M, van Schaftingen E, Matthijs G, Jaeken J, Chabas A (2002) Biochemical and molecular studies in 26 Spanish patients with congenital disorder of glycosylation type Ia. *J Inher Metab Dis* 25: 635-46
- Bross P, Andresen BS, Winter V, Krautle F, Jensen TG, Nandy A, Kolvraa S, Ghisla S, Bolund L, Gregersen N (1993) Co-overexpression of bacterial GroESL chaperonins partly overcomes non-productive folding and tetramer assembly of *E. coli*-expressed human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) carrying the prevalent disease-causing K304E mutation. *Biochim. Biophys. Acta* 1182: 264-274
- Bross P, Corydon TJ, Andresen BS, Jorgensen MM, Bolund L, Gregersen N (1999) Protein misfolding and degradation in genetic diseases. *Hum Mutat* 14: 186-98
- Bross P, Jespersen C, Jensen TG, Andresen BS, Kristensen MJ, Winter V, Nandy A, Krautle F, Ghisla S, Bolundi L, Jung-Ja PK, Gregersen N (1995) Effects of two mutations detected in medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD)-deficient patients on folding, oligomer assembly and stability of MCAD enzyme. *J. Biol. Chem.* 270: 10284-10290.
- Buratti E, Baralle M, Baralle FE (2006) Defective splicing, disease and therapy: searching for master checkpoints in exon definition. *Nucleic Acids Res* 34: 3494-510
- Butler M, Quelhas D, Critchley AJ, Carchon H, Hebestreit HF, Hibbert RG, Vilarinho L, Teles E, Matthijs G, Schollen E, Argibay P, Harvey DJ, Dwek RA, Jaeken J, Rudd PM (2003) Detailed glycan analysis of serum glycoproteins of patients with congenital disorders of glycosylation indicates the specific defective glycan processing step and provides an insight into pathogenesis. *Glycobiology* 13: 601-22

- Cai Z, Taddei A, Sheppard DN (2006) Differential sensitivity of the cystic fibrosis (CF)-associated mutants G551D and G1349D to potentiators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl⁻ channel. *J Biol Chem* 281: 1970-7
- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3: 285-98.
- Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR (2003) ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 31: 3568-71
- Cohen FE, Kelly JW (2003) Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature* 426: 905-9
- Cooper DN, Stenson PD, Chuzhanova NA (2006) The Human Gene Mutation Database (HGMD) and its exploitation in the study of mutational mechanisms. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 1: Unit 1 13
- Cooper TA (2005) Use of minigene systems to dissect alternative splicing elements. *Methods* 37: 331-40
- Corydon TJ, Bross P, Jensen TG, Corydon MJ, Lund TB, Jensen UB, Kim JJ, Gregersen N, Bolund L (1998) Rapid degradation of short-chain acyl-CoA dehydrogenase variants with temperature-sensitive folding defects occurs after import into mitochondria. *J. Biol. Chem.* 273: 13065-13071.
- Cromphout K, Vleugels W, Heykants L, Schollen E, Keldermans L, Sciot R, D'Hooge R, De Deyn PP, von Figura K, Hartmann D, Korner C, Matthijs G (2006) The normal phenotype of Pmm1-deficient mice suggests that Pmm1 is not essential for normal mouse development. *Mol Cell Biol* 26: 5621-35
- Chang JG, Hsieh-Li HM, Jong YJ, Wang NM, Tsai CH, Li H (2001) Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9808-13
- Charlwood J, Clayton P, Keir G, Mian N, Winchester B (1998) Defective galactosylation of serum transferrin in galactosemia. *Glycobiology* 8: 351-7
- Chaudhuri TK, Paul S (2006) Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. *Febs J* 273: 1331-49
- Davis RL, Homer VM, George PM, Brennan SO (2008) A deep intronic mutation in FGB creates a consensus exonic splicing enhancer motif that results in afibrinogenemia caused by aberrant mRNA splicing, which can be corrected in vitro with antisense oligonucleotide treatment. *Hum Mutat*
- de Koning TJ, Dorland L, van Diggelen OP, Boonman AM, de Jong GJ, van Noort WL, De Schryver J, Duran M, van den Berg IE, Gerwig GJ, Berger R, Poll-The BT (1998) A novel disorder of N-glycosylation due to phosphomannose isomerase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 245: 38-42

- de Loos F, Huijben KM, van der Kar NC, Monnens LA, van den Heuvel LP, Groener JE, de Moor RA, Wevers RA (2002) Hemolytic uremic syndrome attributable to *Streptococcus pneumoniae* infection: a novel cause for secondary protein N-glycan abnormalities. *Clin Chem* 48: 781-4
- Desviat LR, Perez B, Gamez A, Sanchez A, Garcia MJ, Martinez-Pardo M, Marchante C, Boveda D, Baldellou A, Arena J, Sanjurjo P, Fernandez A, Cabello ML, Ugarte M (1999) Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain: molecular survey by regions. *Eur J Hum Genet* 7: 386-92
- Dinopoulos A, Mohamed I, Jones B, Rao S, Franz D, deGrauw T (2007) Radiologic and neurophysiologic aspects of stroke-like episodes in children with congenital disorder of glycosylation type Ia. *Pediatrics* 119: e768-72
- Du L, Pollard JM, Gatti RA (2007) Correction of prototypic ATM splicing mutations and aberrant ATM function with antisense morpholino oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6007-12
- Durand G, Seta N (2000) Protein glycosylation and diseases: blood and urinary oligosaccharides as markers for diagnosis and therapeutic monitoring. *Clin Chem* 46: 795-805
- Fang J, Peters V, Korner C, Hoffmann GF (2004) Improvement of CDG diagnosis by combined examination of several glycoproteins. *J Inherit Metab Dis* 27: 581-90
- Faustino NA, Cooper TA (2003) Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* 17: 419-37
- Fiumara A, Barone R, Buttitta P, Musso R, Pavone L, Nigro F, Jaeken J (1996) Haemostatic studies in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Thromb Haemost* 76: 502-4
- Foulquier F, Vasile E, Schollen E, Callewaert N, Raemaekers T, Quelhas D, Jaeken J, Mills P, Winchester B, Krieger M, Annaert W, Matthijs G (2006) Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1 deficiency reveals a previously uncharacterized congenital disorder of glycosylation type II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 3764-9
- Freeze HH, Aebi M (2005) Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. *Curr Opin Struct Biol* 15: 490-8
- Friedman KJ, Kole J, Cohn JA, Knowles MR, Silverman LM, Kole R (1999) Correction of aberrant splicing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by antisense oligonucleotides. *J Biol Chem* 274: 36193-9
- Fu XD, Mayeda A, Maniatis T, Krainer AR (1992) General splicing factors SF2 and SC35 have equivalent activities in vitro, and both affect alternative 5' and 3' splice site selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 11224-8

- Gamez A, Perez B, Ugarte M, Desviat LR (2000) Expression analysis of phenylketonuria mutations: effect on folding and stability of the phenylalanine hydroxylase protein. *J Biol Chem* 275: 29737-29742
- Garcia-Silva MT, Matthijs G, Schollen E, Cabrera JC, Sanchez del Pozo J, Marti Herreros M, Simon R, Maties M, Martin Hernandez E, Hennet T, Briones P (2004) Congenital disorder of glycosylation (CDG) type Ie. A new patient. *J Inherit Metab Dis* 27: 591-600
- Gelman MS, Kopito RR (2003) Cystic fibrosis: premature degradation of mutant proteins as a molecular disease mechanism. *Methods Mol Biol* 232: 27-37
- Gottlicher M (2004) Valproic acid: an old drug newly discovered as inhibitor of histone deacetylases. *Ann Hematol* 83 Suppl 1: S91-2
- Gravel P, Walzer C, Aubry C, Balant LP, Yersin B, Hochstrasser DF, Guimon J (1996) New alterations of serum glycoproteins in alcoholic and cirrhotic patients revealed by high resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun* 220: 78-85
- Greer WL, Higgins E, Sutherland DR, Novogrodsky A, Brockhausen I, Peacocke M, Rubin LA, Baker M, Dennis JW, Siminovitch KA (1989) Altered expression of leucocyte sialoglycoprotein in Wiskott-Aldrich syndrome is associated with a specific defect in O-glycosylation. *Biochem Cell Biol* 67: 503-9
- Gregersen N, Andresen BS, Corydon MJ, Corydon TJ, Olsen RK, Bolund L, Bross P (2001a) Mutation analysis in mitochondrial fatty acid oxidation defects: Exemplified by acyl-CoA dehydrogenase deficiencies, with special focus on genotype-phenotype relationship. *Hum Mutat* 18: 169-89.
- Gregersen N, Bross P, Andresen BS (2004) Genetic defects in fatty acid beta-oxidation and acyl-CoA dehydrogenases. *Molecular pathogenesis and genotype-phenotype relationships. Eur J Biochem* 271: 470-82
- Gregersen N, Bross P, Andresen BS, Pedersen PL, Corydon MJ, Bolund L (2001b) The role of chaperone-assisted folding and quality control in inborn errors of metabolism: protein folding disorders. *J Inherit Metab Dis* 24: 189-212
- Gregersen N, Bross P, Jorgensen MM, Corydon TJ, Andresen BS (2000) Defective folding and rapid degradation of mutant proteins is a common disease mechanism in genetic disorders. *J Inherit Metab Dis* 23: 441-7.
- Grunewald S, Matthijs G (2000) Congenital disorders of glycosylation (CDG): a rapidly expanding group of neurometabolic disorders. *Neuropediatrics* 31: 57-9
- Grunewald S, Matthijs G, Jaeken J (2002) Congenital disorders of glycosylation: a review. *Pediatr Res* 52: 618-24

- Grunewald S, Schollen E, Van Schaftingen E, Jaeken J, Matthijs G (2001) High residual activity of PMM2 in patients' fibroblasts: possible pitfall in the diagnosis of CDG-Ia (phosphomannomutase deficiency). *Am J Hum Genet* 68: 347-54
- Gurvich OL, Tuohy TM, Howard MT, Finkel RS, Medne L, Anderson CB, Weiss RB, Wilton SD, Flanigan KM (2008) DMD pseudoexon mutations: splicing efficiency, phenotype, and potential therapy. *Ann Neurol* 63: 81-9
- Hauptle MA, Pujol FM, Neupert C, Winchester B, Kastaniotis AJ, Aebi M, Hennet T (2008) Human RFT1 deficiency leads to a disorder of N-linked glycosylation. *Am J Hum Genet* 82: 600-6
- Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y.
- Helander A, Eriksson G, Stibler H, Jeppsson JO (2001) Interference of transferrin isoform types with carbohydrate-deficient transferrin quantification in the identification of alcohol abuse. *Clin Chem* 47: 1225-33
- Helenius J, Ng DT, Marolda CL, Walter P, Valvano MA, Aebi M (2002) Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature* 415: 447-50
- Hendriksz CJ, McClean P, Henderson MJ, Keir DG, Worthington VC, Imtiaz F, Schollen E, Matthijs G, Winchester BG (2001) Successful treatment of carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type 1b with oral mannose. *Arch Dis Child* 85: 339-40
- Henry H, Tissot JD, Messerli B, Markert M, Muntau A, Skladal D, Sperl W, Jaeken J, Weidinger S, Heyne K, Bachmann C (1997) Microheterogeneity of serum glycoproteins and their liver precursors in patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I: apparent deficiencies in clusterin and serum amyloid P. *J Lab Clin Med* 129: 412-21
- Hertel KJ (2008) Combinatorial control of exon recognition. *J Biol Chem* 283: 1211-5
- Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE (2004) Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet* 36: 801-8
- Hollins C, Zorio DA, MacMorris M, Blumenthal T (2005) U2AF binding selects for the high conservation of the *C. elegans* 3' splice site. *Rna* 11: 248-53
- Jacobson A (1996) Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu Rev. Biochem* 65: 693-739
- Jaeken J, Hennet T, Freeze HH, Matthijs G (2008) On the nomenclature of congenital disorders of glycosylation (CDG). *J Inher Metab Dis*

- Jaeken J, Pirard M, Adamowicz M, Pronicka E, van Schaftingen E (1996) Inhibition of phosphomannose isomerase by fructose 1-phosphate: an explanation for defective N-glycosylation in hereditary fructose intolerance. *Pediatr Res* 40: 764-6
- Jaeken J, van Eijk HG, van der Heul C, Corbeel L, Eeckels R, Eggermont E (1984) Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome. *Clin Chim Acta* 144: 245-7
- John SW, Weitzner G, Rozen R, Sriver CR (1991) A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Res* 19: 408
- Kerr TP, Sewry CA, Robb SA, Roberts RG (2001) Long mutant dystrophins and variable phenotypes: evasion of nonsense-mediated decay? *Hum Genet* 109: 402-7
- Khajavi M, Inoue K, Lupski JR (2006) Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *Eur J Hum Genet* 14: 1074-81
- Kjaergaard S, Schwartz M, Skovby F (2001) Congenital disorder of glycosylation type Ia (CDG-Ia): phenotypic spectrum of the R141H/F119L genotype. *Arch Dis Child* 85: 236-9
- Kjaergaard S, Skovby F, Schwartz M (1998) Absence of homozygosity for predominant mutations in PMM2 in Danish patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1. *Eur J Hum Genet* 6: 331-6
- Kjaergaard S, Skovby F, Schwartz M (1999) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A: expression and characterisation of wild type and mutant PMM2 in *E. coli*. *Eur J Hum Genet* 7: 884-8
- Kobata A (1988) Structural changes induced in the sugar chains of glycoproteins by malignant transformation of producing cells and their clinical application. *Biochimie* 70: 1575-85
- Kranz C, Ng BG, Sun L, Sharma V, Eklund EA, Miura Y, Ungar D, Lupashin V, Winkel RD, Cipollo JF, Costello CE, Loh E, Hong W, Freeze HH (2007) COG8 deficiency causes new congenital disorder of glycosylation type IIIh. *Hum Mol Genet* 16: 731-41
- Krawczak M, Reiss J, Cooper DN (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 90: 41-54
- Kurreck J (2003) Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* 270: 1628-44
- Kuzmiak HA, Maquat LE (2006) Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends Mol Med* 12: 306-16

- Le Bizec C, Vuillaumier-Barrot S, Barnier A, Dupre T, Durand G, Seta N (2005) A new insight into PMM2 mutations in the French population. *Hum Mutat* 25: 504-5
- Lehmensiek V, Sussmuth SD, Brettschneider J, Tauscher G, Felk S, Gillardon F, Tumani H (2007) Proteome analysis of cerebrospinal fluid in Guillain-Barre syndrome (GBS). *J Neuroimmunol* 185: 190-4
- Lejeune F, Maquat LE (2005) Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 17: 309-15
- Liu HX, Chew SL, Cartegni L, Zhang MQ, Krainer AR (2000) Exonic splicing enhancer motif recognized by human SC35 under splicing conditions. *Mol Cell Biol* 20: 1063-71
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-75
- Lubke T, Marquardt T, Etzioni A, Hartmann E, von Figura K, Korner C (2001) Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency. *Nat Genet* 28: 73-6
- Madsen EC, Morcos PA, Mendelsohn BA, Gitlin JD (2008) In vivo correction of a Menkes disease model using antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3909-14
- Mangoni AA, Jackson SH (2002) Homocysteine and cardiovascular disease: current evidence and future prospects. *Am J Med* 112: 556-65
- Manley JL, Tacke R (1996) SR proteins and splicing control. *Genes Dev* 10: 1569-79
- Maquat LE (1996) Defects in RNA splicing and the consequence of shortened translational reading frames. *Am J Hum Genet* 59: 279-86
- Maquat LE (2004) Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 89-99
- Marquardt T, Denecke J (2003) Congenital disorders of glycosylation: review of their molecular bases, clinical presentations and specific therapies. *Eur J Pediatr* 162: 359-79
- Marquardt T, Freeze H (2001) Congenital disorders of glycosylation: glycosylation defects in man and biological models for their study. *Biol Chem* 382: 161-77
- Matthijs G, Schollen E, Bjursell C, Erlandson A, Freeze H, Imtiaz F, Kjaergaard S, Martinsson T, Schwartz M, Seta N, Vuillaumier-Barrot S, Westphal V, Winchester B (2000) Mutations in PMM2 that cause congenital disorders of glycosylation, type Ia (CDG-Ia). *Hum Mutat* 16: 386-94

- Matthijs G, Schollen E, Pardon E, Veiga-Da-Cunha M, Jaeken J, Cassiman JJ, Van Schaftingen E (1997) Mutations in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate-deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome). *Nat Genet* 16: 88-92
- Matthijs G, Schollen E, Van Schaftingen E, Cassiman JJ, Jaeken J (1998) Lack of homozygotes for the most frequent disease allele in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A. *Am J Hum Genet* 62: 542-50
- Meichenin M, Rocher J, Galanina O, Bovin N, Nifantev N, Sherman A, Cassagnau E, Heymann MF, Bara J, Fraser RH, Le Pendu J (2000) Tk, a new colon tumor-associated antigen resulting from altered O-glycosylation. *Cancer Res* 60: 5499-507
- Mills K, Mills PB, Clayton PT, Johnson AW, Whitehouse DB, Winchester BG (2001) Identification of alpha(1)-antitrypsin variants in plasma with the use of proteomic technology. *Clin Chem* 47: 2012-22
- Mills K, Mills PB, Clayton PT, Mian N, Johnson AW, Winchester BG (2003) The underglycosylation of plasma alpha 1-antitrypsin in congenital disorders of glycosylation type I is not random. *Glycobiology* 13: 73-85
- Mohsen AW, Anderson BD, Volchenboum SL, Battaile KP, Tiffany K, Roberts D, Kim JJ, Vockley J (1998) Characterization of molecular defects in isovaleryl-CoA dehydrogenase in patients with isovaleric acidemia. *Biochemistry* 37: 10325-35
- Motte P, Takahashi H, Ozturk M, Wilson BE, Wands JR (1989) Characterization of a malignant phenotype-associated cell surface glycoprotein common to various human tumor cells and preferentially expressed on adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res* 49: 1349-56
- Muchowski PJ, Wacker JL (2005) Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci* 6: 11-22
- Munch G, Thome J, Foley P, Schinzel R, Riederer P (1997) Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 23: 134-43
- Murawaki Y, Sugisaki H, Yuasa I, Kawasaki H (1997) Serum carbohydrate-deficient transferrin in patients with nonalcoholic liver disease and with hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 259: 97-108
- Nicholl ID, Bucala R (1998) Advanced glycation endproducts and cigarette smoking. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 44: 1025-33
- Niehues R, Hasilik M, Alton G, Korner C, Schiebe-Sukumar M, Koch HG, Zimmer KP, Wu R, Harms E, Reiter K, von Figura K, Freeze HH, Harms HK, Marquardt T (1998) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. *J Clin Invest* 101: 1414-20

- Nielsen KB, Sorensen S, Cartegni L, Corydon TJ, Doktor TK, Schroeder LD, Reinert LS, Elpeleg O, Krainer AR, Gregersen N, Kjems J, Andresen BS (2007) Seemingly neutral polymorphic variants may confer immunity to splicing-inactivating mutations: a synonymous SNP in exon 5 of MCAD protects from deleterious mutations in a flanking exonic splicing enhancer. *Am J Hum Genet* 80: 416-32
- Nihlen U, Montnemery P, Lindholm LH, Lofdahl CG (2001) Increased serum levels of carbohydrate-deficient transferrin in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Scand J Clin Lab Invest* 61: 341-7
- Nissim-Rafinia M, Aviram M, Randell SH, Shushi L, Ozeri E, Chiba-Falek O, Eidelman O, Pollard HB, Yankaskas JR, Kerem B (2004) Restoration of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function by splicing modulation. *EMBO Rep* 5: 1071-7
- Nissim-Rafinia M, Kerem B (2005) The splicing machinery is a genetic modifier of disease severity. *Trends Genet* 21: 480-3
- Ong SE, Pandey A (2001) An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomol Eng* 18: 195-205
- Pagani F, Baralle FE (2004) Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat Rev Genet* 5: 389-96
- Parenti G, Zuppaldi A, Gabriela Pittis M, Rosaria Tuzzi M, Annunziata I, Meroni G, Porto C, Donaudy F, Rossi B, Rossi M, Filocamo M, Donati A, Bembi B, Ballabio A, Andria G (2007) Pharmacological enhancement of mutated alpha-glucosidase activity in fibroblasts from patients with Pompe disease. *Mol Ther* 15: 508-14
- Pearson ER, Flechtner I, Njolstad PR, Malecki MT, Flanagan SE, Larkin B, Ashcroft FM, Klimes I, Codner E, Iotova V, Slingerland AS, Shield J, Robert JJ, Holst JJ, Clark PM, Ellard S, Sovik O, Polak M, Hattersley AT (2006) Switching from insulin to oral sulfonylureas in patients with diabetes due to Kir6.2 mutations. *N Engl J Med* 355: 467-77
- Peng J, Gygi SP (2001) Proteomics: the move to mixtures. *J Mass Spectrom* 36: 1083-91
- Perez-Cerda C, Quelhas D, Vega AI, Ecay J, Vilarinho L, Ugarte M (2008) Screening using serum percentage of carbohydrate-deficient transferrin for congenital disorders of glycosylation in children with suspected metabolic disease. *Clin Chem* 54: 93-100
- Pey AL, Desviat LR, Gamez A, Ugarte M, Perez B (2003) Phenylketonuria: Genotype-phenotype correlations based on expression analysis of structural and functional mutations in PAH. *Hum Mutat* 21: 370-8
- Pey AL, Ying M, Cremades N, Velazquez-Campoy A, Scherer T, Thony B, Sancho J, Martinez A (2008) Identification of pharmacological chaperones as potential therapeutic agents to treat phenylketonuria. *J Clin Invest* 118: 2858-67

- Pirard M, Matthijs G, Heykants L, Schollen E, Grunewald S, Jaeken J, van Schaftingen E (1999) Effect of mutations found in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type IA on the activity of phosphomannomutase 2. *FEBS Lett* 452: 319-22
- Pozzoli U, Sironi M (2005) Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. *Cell Mol Life Sci* 62: 1579-604
- Quintana E, Gala S, Garcia-Cazorla A, Montero R, Munoz-Almagro C, Vilaseca MA, Briones P, Artuch R (2007) Secondary alteration of the transferrin isoelectric focusing pattern in a case of bacterial meningitis. *J Inherit Metab Dis* 30: 267
- Richard E, Monteoliva L, Juarez S, Perez B, Desviat LR, Ugarte M, Albar JP (2006) Quantitative analysis of mitochondrial protein expression in methylmalonic acidemia by two-dimensional difference gel electrophoresis. *J Proteome Res* 5: 1602-10
- Rincon A, Aguado C, Desviat LR, Sanchez-Alcudia R, Ugarte M, Perez B (2007) Propionic and Methylmalonic Acidemia: Antisense Therapeutics for Intronic Variations Causing Aberrantly Spliced Messenger RNA. *Am J Hum Genet* 81
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7
- Scriver CR, Waters PJ (1999) Monogenic traits are not simple: lessons from Phenylketonuria. *Trends Genet.* 15: 267-272.
- Schollen E, Dorland L, de Koning TJ, Van Diggelen OP, Huijmans JG, Marquardt T, Babovic-Vuksanovic D, Patterson M, Imtiaz F, Winchester B, Adamowicz M, Pronicka E, Freeze H, Matthijs G (2000a) Genomic organization of the human phosphomannose isomerase (MPI) gene and mutation analysis in patients with congenital disorders of glycosylation type Ib (CDG-Ib). *Hum Mutat* 16: 247-52
- Schollen E, Keldermans L, Foulquier F, Briones P, Chabas A, Sanchez-Valverde F, Adamowicz M, Pronicka E, Wevers R, Matthijs G (2007) Characterization of two unusual truncating PMM2 mutations in two CDG-Ia patients. *Mol Genet Metab* 90: 408-13
- Schollen E, Kjaergaard S, Legius E, Schwartz M, Matthijs G (2000b) Lack of Hardy-Weinberg equilibrium for the most prevalent PMM2 mutation in CDG-Ia (congenital disorders of glycosylation type Ia). *Eur J Hum Genet* 8: 367-71
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68: 850-8
- Shi J, Hu Z, Pabon K, Scotto KW (2008) Caffeine regulates alternative splicing in a subset of cancer-associated genes: a role for SC35. *Mol Cell Biol* 28: 883-95

- Silvaggi NR, Zhang C, Lu Z, Dai J, Dunaway-Mariano D, Allen KN (2006) The X-ray crystal structures of human alpha-phosphomannomutase 1 reveal the structural basis of congenital disorder of glycosylation type 1a. *J Biol Chem* 281: 14918-26
- Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L (2001) Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44: 129-46
- Slaugenhaupt SA, Mull J, Leyne M, Cuajungco MP, Gill SP, Hims MM, Quintero F, Axelrod FB, Gusella JF (2004) Rescue of a human mRNA splicing defect by the plant cytokinin kinetin. *Hum Mol Genet* 13: 429-36
- Spaapen LJ, Bakker JA, van der Meer SB, Sijstermans HJ, Steet RA, Wevers RA, Jaeken J (2005) Clinical and biochemical presentation of siblings with COG-7 deficiency, a lethal multiple O- and N-glycosylation disorder. *J Inher Metab Dis* 28: 707-14
- Sparks SE (2006) Inherited disorders of glycosylation. *Mol Genet Metab* 87: 1-7
- Stibler H, Holzbach U, Tengborn L, Kristiansson B (1996) Complex functional and structural coagulation abnormalities in the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Blood Coagul Fibrinolysis* 7: 118-26
- Stibler H, von Döbeln U, Kristiansson B, Guthenberg C (1997) Carbohydrate-deficient transferrin in galactosaemia. *Acta Paediatr* 86: 1377-8
- Sturiale L, Barone R, Palmigiano A, Ndosimao CN, Briones P, Adamowicz M, Jaeken J, Garozzo D (2008) Multiplexed glycoproteomic analysis of glycosylation disorders by sequential yolk immunoglobulins immunoseparation and MALDI-TOF MS. *Proteomics* 8: 3822-32
- Sturla L, Fruscione F, Noda K, Miyoshi E, Taniguchi N, Contini P, Tonetti M (2005) Core fucosylation of N-linked glycans in Leukocyte Adhesion Deficiency/Congenital Disorder of Glycosylation IIc (LAD II/CDG IIc) fibroblasts. *Glycobiology*
- Suwanmanee T, Sierakowska H, Fucharoen S, Kole R (2002) Repair of a splicing defect in erythroid cells from patients with beta-thalassemia/HbE disorder. *Mol Ther* 6: 718-26
- Svenson IK, Ashley-Koch AE, Gaskell PC, Riney TJ, Cumming WJ, Kingston HM, Hogan EL, Boustany RM, Vance JM, Nance MA, Pericak-Vance MA, Marchuk DA (2001) Identification and expression analysis of spastin gene mutations in hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet* 68: 1077-85
- Takeshima Y, Yagi M, Wada H, Ishibashi K, Nishiyama A, Kakumoto M, Sakaeda T, Saura R, Okumura K, Matsuo M (2006) Intravenous infusion of an antisense oligonucleotide results in exon skipping in muscle dystrophin mRNA of Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Res* 59: 690-4
- Tazi J, Durand S, Jeanteur P (2005) The spliceosome: a novel multi-faceted target for therapy. *Trends Biochem Sci* 30: 469-78

- Thein SL (2004) Genetic insights into the clinical diversity of beta thalassaemia. *Br J Haematol* 124: 264-74
- Thiel C, Lubke T, Matthijs G, von Figura K, Korner C (2006) Targeted disruption of the mouse phosphomannomutase 2 gene causes early embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 26: 5615-20
- Tronchere H, Wang J, Fu XD (1997) A protein related to splicing factor U2AF35 that interacts with U2AF65 and SR proteins in splicing of pre-mRNA. *Nature* 388: 397-400
- Usuki F (2006) [Specific inhibition of nonsense-mediated mRNA decay has the potential to rescue the phenotype of muscular dystrophy]. *Rinsho Shinkeigaku* 46: 939-41
- Usuki F, Yamashita A, Higuchi I, Ohnishi T, Shiraishi T, Osame M, Ohno S (2004) Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay rescues the phenotype in Ullrich's disease. *Ann Neurol* 55: 740-4
- van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, den Dunnen JT, Koop K, van der Kooi AJ, Goemans NM, de Kimpe SJ, Ekhart PF, Venneker EH, Platenburg GJ, Verschuuren JJ, van Ommen GJ (2007) Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med* 357: 2677-86
- Van Schaftingen E, Jaeken J (1995) Phosphomannomutase deficiency is a cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *FEBS Lett* 377: 318-20
- Vetrini F, Tammaro R, Bondanza S, Surace EM, Auricchio A, De Luca M, Ballabio A, Marigo V (2006) Aberrant splicing in the ocular albinism type 1 gene (OA1/GPR143) is corrected in vitro by morpholino antisense oligonucleotides. *Hum Mutat* 27: 420-6
- Vuillaumier-Barrot S, Hetet G, Barnier A, Dupre T, Cuer M, de Lonlay P, Cormier-Daire V, Durand G, Grandchamp B, Seta N (2000) Identification of four novel PMM2 mutations in congenital disorders of glycosylation (CDG) Ia French patients. *J Med Genet* 37: 579-80
- Wang J, Chang YF, Hamilton JI, Wilkinson MF (2002) Nonsense-associated altered splicing: a frame-dependent response distinct from nonsense-mediated decay. *Mol Cell* 10: 951-7
- Wang J, Smith PJ, Krainer AR, Zhang MQ (2005) Distribution of SR protein exonic splicing enhancer motifs in human protein-coding genes. *Nucleic Acids Res* 33: 5053-62
- Waters PJ, Parniak MA, Nowacki P, Scriver CR (1998) *In Vitro* Expression Analysis of Mutations in Phenylalanine Hydroxylase: Linking Genotype to Phenotype and Structure to Function. *Hum. Mutat.* 11: 4-17
- Westphal V, Peterson S, Patterson M, Tournay A, Blumenthal A, Treacy EP, Freeze HH (2001) Functional significance of PMM2 mutations in mildly affected patients with congenital disorders of glycosylation Ia. *Genet Med* 3: 393-8

- Wood M, Yin H, McClorey G (2007) Modulating the expression of disease genes with RNA-based therapy. *PLoS Genet* 3: e109
- Wopereis S, Grunewald S, Morava E, Penzien JM, Briones P, Garcia-Silva MT, Demacker PN, Huijben KM, Wevers RA (2003) Apolipoprotein C-III isofocusing in the diagnosis of genetic defects in O-glycan biosynthesis. *Clin Chem* 49: 1839-45
- Wopereis S, Lefeber DJ, Morava E, Wevers RA (2006) Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review. *Clin Chem* 52: 574-600
- Wopereis S, Morava E, Grunewald S, Mills PB, Winchester BG, Clayton P, Coucke P, Huijben KM, Wevers RA (2005) A combined defect in the biosynthesis of N- and O-glycans in patients with cutis laxa and neurological involvement: the biochemical characteristics. *Biochim Biophys Acta* 1741: 156-64
- Wu X, Rush JS, Karaoglu D, Krasnewich D, Lubinsky MS, Waechter CJ, Gilmore R, Freeze HH (2003) Deficiency of UDP-GlcNAc:Dolichol Phosphate N-Acetylglucosamine-1 Phosphate Transferase (DPAGT1) causes a novel congenital disorder of Glycosylation Type Ij. *Hum Mutat* 22: 144-50
- Wu X, Steet RA, Bohorov O, Bakker J, Newell J, Krieger M, Spaapen L, Kornfeld S, Freeze HH (2004) Mutation of the COG complex subunit gene COG7 causes a lethal congenital disorder. *Nat Med* 10: 518-23
- Yagev H, Frenkel A, Cohen IR, Friedman A (1993) Adjuvant arthritis is associated with changes in the glycosylation of serum IgG1 and IgG2b. *Clin Exp Immunol* 94: 452-8
- Young G, Driscoll MC (1999) Coagulation abnormalities in the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: case report and review of the literature. *Am J Hematol* 60: 66-9
- Zuo P, Maniatis T (1996) The splicing factor U2AF35 mediates critical protein-protein interactions in constitutive and enhancer-dependent splicing. *Genes Dev* 10: 1356-68

8. PUBLICACIONES

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

Martín Hernández E, **Vega Pajares AI**, Pérez González B, Ecay Crespo MJ, Leal Pérez F, Manzanares López-Manzanares J, Ugarte Pérez M, Pérez-Cerdá Silvestre C. [Congenital disorder of glycosylation type 1b. Experience with mannose treatment]. *An Pediatr (Barc)*. 2008 Oct;69(4):358-65. Spanish.

Pérez-Cerdá C, Quelhas D, **Vega AI**, Ecay J, Vilarinho L, Ugarte M. Screening using serum percentage of carbohydrate-deficient transferrin for congenital disorders of glycosylation in children with suspected metabolic disease. *Clin Chem*. 2008 Jan;54(1):93-100. Epub 2007 Nov 16.

Richard E*, **Vega AI***, Pérez B, Roche C, Velázquez R, Ugarte M, Pérez-Cerdá C. Congenital disorder of glycosylation Ia: New differentially expressed proteins identified by 2-DE. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Feb 6;379(2):267-71. Epub 2008 Dec 25.

* Autores que contribuyen de igual forma en este trabajo

Vega AI, Pérez-Cerdá C, Desviat LR, Matthijs G, Ugarte M, Pérez B. Functional analysis of three splicing mutations identified in the PMM2 gene: towards a new therapy for Congenital Disorder of Glycosylation type Ia. *Human Mutation* En prensa.