

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



EPIDERMOLISIS BULLOSA DISTRÓFICA EN POBLACIÓN
ESPAÑOLA

EFECTO FUNDADOR Y DATACIÓN DE LA
MUTACIÓN c.6527insC EN EL GEN *COL7A1*

TESIS DOCTORAL DE:

CAROLINA SÁNCHEZ JIMENO

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

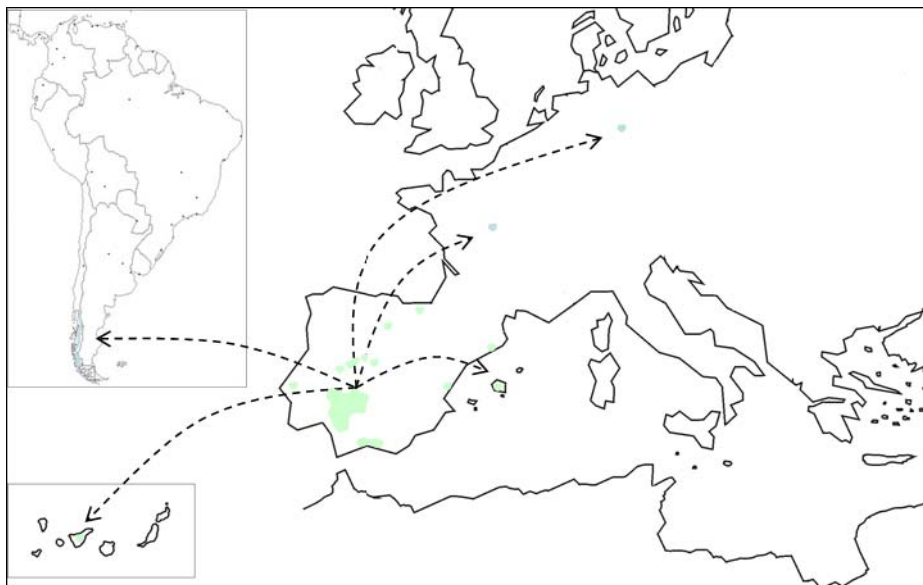
MARCELA DEL RÍO NECHAEVSKY

Madrid, 2013



Universidad Complutense de Madrid (UCM)
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

EPIDERMOLISIS BULLOSA DISTRÓFICA EN POBLACIÓN ESPAÑOLA: EFECTO FUNDADOR Y DATACIÓN DE LA MUTACIÓN c.6527insC EN EL GEN *COL7A1*



Tesis Doctoral

Carolina Sánchez Jimeno

Madrid, 2013

Universidad Complutense de Madrid (UCM)
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



EPIDERMOLISIS BULLOSA DISTRÓFICA EN POBLACIÓN
ESPAÑOLA: EFECTO FUNDADOR Y DATACIÓN DE LA
MUTACIÓN c.6527insC EN EL GEN *COL7A1*

Tesis Doctoral

Carolina Sánchez Jimeno

Madrid, 2013

Universidad Complutense de Madrid (UCM)
Facultad de Biología
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



EPIDERMOLISIS BULLOSA DISTRÓFICA EN POBLACIÓN
ESPAÑOLA: EFECTO FUNDADOR Y DATACIÓN DE LA
MUTACIÓN c.6527insC EN EL GEN *COL7A1*

VºBº Director de tesis

VºBº Tutor

Dra. Marcela del Río Nechaevsky.

Dra. Alicia Megías Fresno

Tesis Doctoral

Carolina Sánchez Jimeno

Madrid, 2013

El presente trabajo de investigación ha sido llevado a cabo dentro de la División de Biomedicina Epitelial de la Unidad de Medicina Regenerativa del Centro de Investigaciones Energéticas, Mediambientales y Tecnológicas (CIEMAT) de Madrid bajo la dirección de la Doctora Marcela Del Río Nechaevsky.

Tesis Doctoral realizada bajo el marco de los proyectos SAF2007-61019 y SAF2010-16976 concedidos por el Ministerio de Economía y Competitividad en colaboración con el CIBER de Enfermedades Raras (INTRA/09/758,2) y mediante la concesión de una beca FPI para la realización de la Tesis Doctoral (BES-2008-004882).

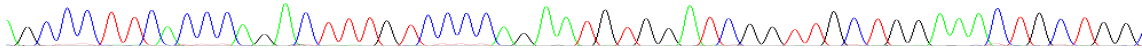
**A mis padres,
a mi hermano Mario.**



“lo esencial es invisible a los ojos”

El principito.

Agradecimientos



AGRADECIMIENTOS

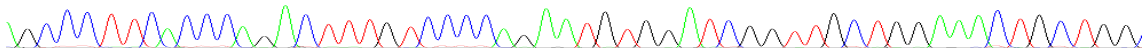
Primero quiero agradecer a mi directora de tesis, Marcela, por brindarme la oportunidad de trabajar en su equipo y realizar esta tesis doctoral, por su frase “el mundo es de los valientes” que me repetí tantas veces estos años de tesis. A Fernando, por sus consejos argentinos durante mi estancia y su ayuda en los últimos momentos.

Quiero agradecer principalmente a Nati, porque sin ti esta tesis no existiría, porque te debo cada letra aquí escrita, por haber estado ahí hasta el final, porque esta tesis es de las dos.

Gracias a mis “compis de labo” y sobre todo amigas, siempre apoyando, animando y con una sonrisa. En concreto a Blanca, por saber de todo y valer para todo, por enseñarme tanto y ser una amiga en todo momento. A Nuri, por ser mi “mami del labo”, por sus consejos e intuición, por cuadrarme cuando hacía falta y hacerme siempre todo más fácil. A Eli, por su sonrisa, siempre dispuesta a ayudar y a estar ahí para lo bueno y lo malo, fuera y dentro del laboratorio. A Rosa, por ser mi despiste-competencia, por hacerme reír, por echarme un cable mil veces, por escuchar. A “la Mari” por compartir mesa y poyata y hacerme reír en sus momentos buenos. A Sara, por ser mi apoyo incondicional, por salvarme y sacarme del hoyo cada vez que me hundía, por estar cuando la he necesitado. A Carre, por su sabiduría, siempre dispuesta a brindármela, por su risa contagiosa, por su apoyo en todo momento. A Martola, porque siempre que he necesitado algo de ella, ahí ha estado, por su dulzura y su sonrisa siempre. A Almu, la mejor profe de cultivos que he tenido. A Rodolfo, por su ayuda con los minigenes, por su manera de ver la ciencia, por sus ánimos al final. A Lucia y Mariajo, por echarme una mano con todo el papeleo, pacientes y todo eso que me volvía loca. A Edi y Jesus, por su amabilidad, por su ayuda en el animalario con “mis bebés”, por esos momentos que me hacían reír. A las nuevas adquisiciones, Angeles, Cris, Sergio, Chema...

También tengo que agradecer a mucha más gente del CIEMAT. A Maria, por ser más que una compañera, por ser una gran amiga, por los momentos de risas y sufrimientos compartidos dentro del laboratorio, y fuera con una buena cerveza, por supuesto. A Alberto, por tener siempre una sonrisa y una frase que me quitaba la preocupación, te mando este agradecimiento a Singapur. Agradecer a todos mis “compis” becarios (Ariza, Viki, Sandra, Rocio, Agueda, Javi, Cloti, Elena, Diego...) que han estado, están o estarán

Agradecimientos



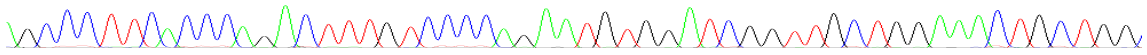
pronto en esta situación, con los que tantas veces he hablado de cómo nos iba esa tesis, por haber tenido la suerte de conocerlos. Y a todos los demás de los laboratorios “grande de epitelios” y “hemato”, Cris, Jose chica, Lara, Mónica, Parras... por echar un cable cuando ha hecho falta. A los de histología y citometría, Kiko, Pilar, Isra... por ser tan dispuestos. A Sergio, Aurora y Sole porque valeis un “puñao” siempre solucionando cualquier problema con los pedidos y el papeleo, porque siempre que he entrado a vuestro sitio he salido con una sonrisa... o risa. En especial a Angelines, porque siempre se echará de menos esa dulzura con la que ofrecias tu ayuda, porque de antemano se que has dejado un hueco en el corazón de todos nosotros. Y a todos los demás con lo que he ido tropezando a lo largo de estos años y siempre han echado una mano sin dudarlos, Maruja, Rosa, Oscar... y los que me dejaron en el tintero porque sois muchos.

Debo de hacer mención especial a aquellos que me hicieron disfrutar de la genética por primera vez, que me abrieron sus puertas y ofrecieron la oportunidad de aprender con ellos, el laboratorio de genética de la Fundación Jimenez Díaz. En especial a las Cármenes, por su confianza en mí. A Carmen Ramos por ser “mi madre” en la genética. A Isa, Marta, Fer... por darme la oportunidad de aprender con ellos. A Mariajo (Trujillo), por brindarme siempre su apoyo, por contagiarme su entusiasmo, por su amistad. A todos vosotros por ofrecerme la oportunidad de estudiar a mi hermano y lograr diagnosticarlo, porque ha sido lo más emotivo que he hecho en este mundo de investigación, por ello lucharé para trabajar en esto toda mi vida.

Y por supuesto, gracias a Carlos San Roman y todo mis nuevos compañeros, por acogermelos, hacerme sentir tan agusto con ellos y darme la oportunidad de seguir haciendo lo que me gusta.

Lejos de las batas, debo de agradecer principalmente a mis padres, a su apoyo incondicional. A mi madre, por estar ahí siempre ayudándome y haciendome la vida más fácil, por confiar en mí y en lo que valgo. A mi padre, por enseñarme que los grandes logros se consiguen con grandes esfuerzos, por sentirse orgulloso de mí y darme fuerzas para que no me rinda. A Mario, mi hermano, en especial a ti, justo por eso, por ser especial, por hacernos especiales a todos, por darnos tu amor sin decir una sola palabra, porque es a ti a quien debo mi entusiasmo por el diagnóstico genético, porque por ti y por todos los que son como tú, debemos seguir investigando.

Agradecimientos



A todo el resto de familia, que andan siempre pendientes de cómo me va y dándome ánimos constantes porque... ¡ya queda menos!

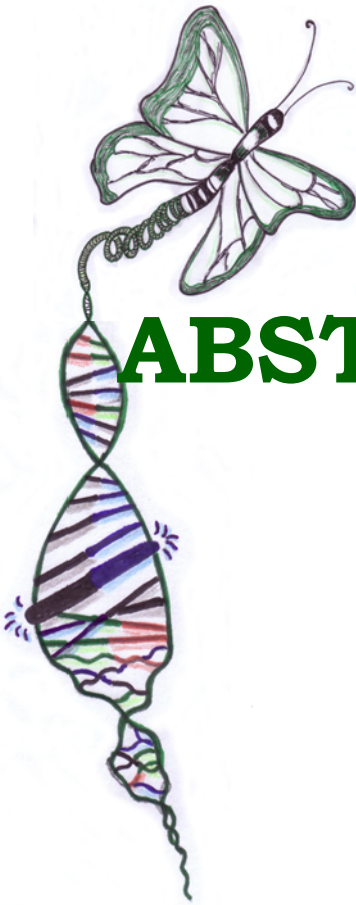
Debo agradecerle a ti Victor, mi compañero, por aguantarme, que no es fácil, en estos momentos tan desesperantes, por cuidarme y quererme, por sentirte orgulloso de mí, por estar ahí. Y por supuesto, a toda tu familia, por acogerme como una más y quererme como soy.

Y por último a todos y cada uno de mis amigos, desde los que aún conservo de la infancia, Maria, Patri, Bea, Jorge, Canca, Ruben, Siles, Alberto, Rosa, Pepelu... porque estais deseando que termine para darme la enhorabuena y celebrarlo; hasta los que conocí recientemente en Argentina, algunos también doctorándose y otros ya buscándose la vida, porque dentro de poco nos reuniremos en alguna parte de Europa para celebrar. Por supuesto a mi hermanita Maribel que siempre está ahí, a Irene por empezar siendo mi compi de piso y quedarse como compi de vida, a Topi por gustarle e interesarle siempre tanto lo que hago, porque quizá algún día trabajemos cerca. A mis ya no tan recientes adquisiciones, Angie, Vico, Miguel, Sonia, Lopez, Juancar, Raquel, Cris, Vir, David... porque sois geniales y punto! A mis viejos amigos Salva, Jose, Juanma y Kike de Valencia, a Elena y Marta de Segovia, porque estais ahí desde siempre y... prometo visitaros a todos en cuanto termine esta tesis!!

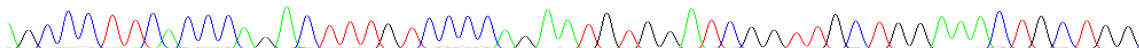
GRACIAS A TODOS POR TODO.

Quiero añadir un último y especial agradecimiento, a todos los pacientes con Epidermolisis Bullosa Distrófica que se han brindado a este estudio, a los niños mariposa, porque gracias a ellos hemos logrado aportar nuestro granito de arena en la investigación de esta enfermedad. Porque nunca hay que olvidar a los que están detrás de todo esto. A vosotros, gracias por luchar.





ABSTRACT



patients in Chile, was also extremely frequent in the Spanish patient population (46.3% of alleles).

OBJECTIVES

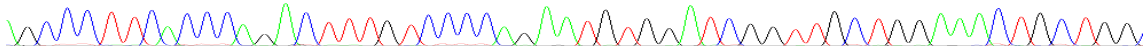
The identification of a collection of DEB pedigrees carrying the c.6527insC mutation in Spain raises the question of the origin of this mutation from a common ancestor or as a result of a hotspot mutation. The aim of this study was to investigate the origin of the c.6527insC mutation.

MATERIALS AND METHODS

A total of 50 DEB patients were included in this study. Eleven DEB patients carried the c.6527insC mutation in both alleles. Seventeen DEB patients were heterozygote, exhibited the c.6527insC mutation on one allele and contained different mutations on the other allele. Twenty-two DEB patients carried other mutations of the *COL7A1* gene. In addition, 93 non-affected individuals and 50 parent-offspring trios from the general population of Spain were incorporated to this study as a reference group.

To investigate the common ancestor, intragenic haplotypes were constructed by genotyping nine single nucleotides polymorphisms (SNPs) throughout the *COL7A1* gene. Haplotypes were determined in DEB patients and control samples, both of Spanish origin.

To analyze the genetic history of this mutation in the Spanish population, 6 extragenic polymorphic markers were used to map a 2.1232 cM region around *COL7A1* gene. The age of the c.6527insC mutation was estimated using three different approaches. The estimation of the age to first mutational event was calculated with the programs DMLE+, BDMC21 and the estimation of the age of the most recent common ancestor was calculated with de Colombo's methods.



RESULTS

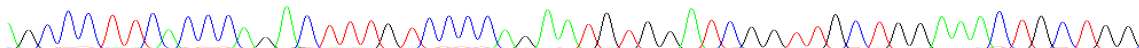
Founder effect of the mutation c.6527insC

The existence of a complete two-generation pedigree in all of our patients allowed the construction of different intragenic haplotypes formed by nine intragenic SNPs. We determined twelve intragenic haplotypes in DEB patients (from Hi.1 haplotype to Hi.6 haplotype, Hi.7, Hi.10, Hi.11, Hi.13, Hi.14, Hi.15 and Hi.16 haplotypes) and fourteen intragenic haplotypes in the Spanish population (from Hi.1 to Hi.14). The overall distribution of the estimated haplotypes was significantly different between healthy controls and patients.

The total number of the alleles ($n = 39$) that carried the c.6527insC mutation cosegregated exclusively with Hi.5 intragenic haplotype (CCGCTCAAA), namely all alleles were carriers of c.6527insC mutation were CCGCTCAAA_6527insC. On the other hand, the frequency of Hi.5 haplotype in the Spanish population was 7.81 %. Consequently, the c.6527insC mutation in the Spanish cluster is a result of a single mutational event, and the affected pedigrees must descend from one genetic founder who exhibited the Hi.5 intragenic haplotype.

Out of 28 pedigrees bearing at least one CCGCTCAAA_6527insC allele, 18 stemmed from ancestors who had been living in the southern half of the Iberian Peninsula for at least 3 generations. The other lineage bearing the CCGCTCAAA_6527insC allele comes from ancestors who had been living in Northern Spain for over 3 generations. In addition, we analyzed a Portuguese pedigree carrier of the CCGCTCAAA_6527insC allele.

These results reveal that the c.6527insC mutation is not the result of separate mutations occurring independently in different individuals, but is the result of a one-time mutation occurring in a common ancestor of all the families. Furthermore, we also found a pedigree where the chromosome carrying the mutation cosegregated with G2520V Hi.5 intragenic haplotype. The other 41 pathogenic mutations cosegregate with other 11 different intragenic haplotypes.

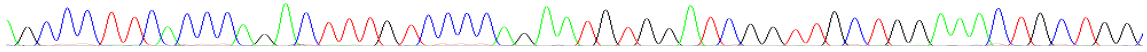


Dating of the mutation c.6527insC

To date the mutation, this study analyzed in-depth a wide region of the short arm of chromosome 3, spanning 1 cM on each side of the COL7A1 gene. We selected seven extragenics SNPs within this region for construct extragenics haplotypes. We determined five extragenics haplotypes in index cases (E03, E06, E08, E14 and E18 haplotypes) and thirty-seven haplotypes in the Spanish population (from E01 haplotype to E37 haplotype). Extragenics haplotype analysis on the chromosomes bearing c.6527insC mutation showed a conserved haplotype, haplotype E08 (CGACAC_Hi.5_G). This extragenic haplotype was the most frequent at 86.11% (31/36) in our patient cohort, followed by the haplotype E18 (CGACAT_H5_G) with a frequency of 5.56% (2/36). Each of the remaining extragenics haplotypes, carriers of the mutation c.6527insC, had a frequency of 2.8% (1/36).

The calculation to the allelic age of mutation c.6527insC takes into account these extragenics haplotypes, association between every extragenics tag SNPS and the mutation, extragenics tag SNPs frequency, genetics distances between extragenics tag SNPs and the mutation, the proportion population sample (f) as well as the population growth rates (r).

Therefore, the age estimated to the first mutational event, calculated with the programs DMLE+ and BDMC21, is the 122nd and 124th generation respectively. Assuming a generation time of 28 years, the mutation arose for the first time around 3300 years ago. The most recent common ancestor of chromosomes carriers to the c.6527insC mutation in Spain calculated with de Colombo's methods was estimated in 40 generations or 1100 years ago.

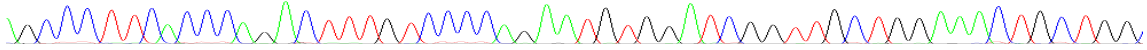


DISCUSSION

Interestingly, the most prevalent COL7A1 mutation causing RDEB in Spain, c.6527insC, exhibits an unusually high recurrence being prevalent among patients from the southern half of the Iberian Peninsula. We suggested a founder effect for c.6527insC as Spanish patients carrying this mutation share an intragenic ancestral haplotype (Hi.5) of approximately 30 kb, which is present at a low frequency in the general, ethnically matched population. In agreement, the c.6527insC mutation recurrence has also been recently disclosed in the RDEB population in Chile, where waves of Spanish migration occurred at different historical periods. Notably, this mutation has also been found in isolated patients from France and Germany, two countries with a long history of mid-20th century Spanish immigration.

Herein, the genetic history of this recurrent mutation was further investigated using three mathematical approaches. The age of the most recent common ancestor of the c.6527insC chromosome was estimated to be around 40 generations old, and the mutation first occurred about 120 generations ago. As a result, the first mutational event occurred 80 generations before the first common ancestor arose. Assuming a generation time of 28 years, the time at which the c.6527insC mutation first occurred was between 3204 and 3416 years ago (13th-15th century BC). In this period, various pre-Roman communities settled in the southern half of the Iberian Peninsula (the Spanish geographic area with a high c.6527insC recurrence). The estimated age of the most recent common ancestor is about 1131 years ago suggesting that the founder effect occurred between the late first to early second millennium AD. Notably, it coincides with a 'golden age' of Sephardic Jews in Al-Andalus, a closed inbred community. Due to the fact that c.6527insC is a mutation that has not been identified among Sephardic Jewish populations, we hypothesize that families carrying the c.6527insC mutation belonged to the group of Jews who converted to Catholicism and remained in Andalusia after being expelled from Spain in the 15th century (bottleneck population).

Abstract



The fact that all the carriers to c.6527insC mutation presented the same genetic background in the COL7A1 gene, allows to design personalized gene therapy strategies for repairing the mutation

CONCLUSION

Intragenic haplotype analysis showed that all alleles carrying the c.6527insC mutation shared the same haplotype cosegregating with this mutation (CCGCTCAAA_6527insC), thus suggesting the presence of a common ancestor.

By expanding the haplotype construction on a large segment of 2 cM flanking the COL7A1 gene, we were able to confirm unequivocally that the c.6527insC mutation originated from a single ancestor.

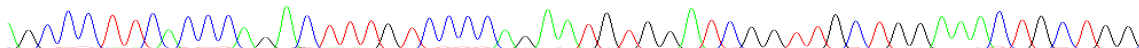
This mutation arose for the first time around 3300 years ago and it penetrated into a bottleneck population about 1131 years ago. These estimates coincide with the historical outline of the Spanish population.

To our knowledge this is the first study dating a mutation in the COL7A1 gene. In our opinion, carrier screening for the c.6527insC COL7A1 mutation should be encouraged in couples with ancestry from the Iberian Peninsula in analogy with Tay-Sachs disease in persons of European-Jewish ancestry

The high recurrence c.6527insC mutation in our population permits a rapid screening accelerating molecular diagnostics. Moreover, in our case, the high number of EBD patients carriers to c.6527insC mutation in homozygous manner allows us to provide a more accurate prognosis.



ABREVIATURAS



ABSTRACT

INTRODUCTION

Dystrophic epidermolysis bullosa (DEB) is a rare genodermatosis condition characterized by blistering of the skin as a result of minimal friction or mechanical trauma. The clinical manifestations of DEB are highly variable from nail dystrophy to life-threatening blistering, making early molecular diagnosis and prognosis of utmost importance for the affected families.

Ultrastructurally, DEB is characterized by numerous abnormalities and morphology of anchoring fibrils, microstructures composed of type VII collagen present at the dermal-epidermal junction.

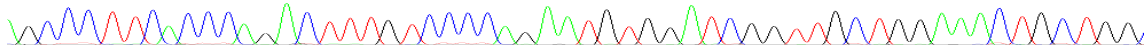
This pathology is caused by more than 520 different mutations in the *COL7A1* gene and its inheritance pattern is autosomal dominant (DDEB [MIM#131750, #131800]) or recessive (RDEB [MIM#226600]). Most mutations are family specific, although a few appear to be recurrent in specific populations.

The complex of genotype-phenotype correlation has not been completely dissected, while only a general relationship has been concluded. Specifically, forms of DDEB which are typically caused by glycine substitutions in the triple helix collagenous domain of collagen VII. While the most severe type, severe generalized RDEB (RDEB-sev gene), is frequently associated with truncating mutations on both alleles leading to a complete absence of type VII collagen. Mild to moderate recessive forms are usually associated with reduced amount of collagen VII synthesis, resulting from a genetic combination that comprises at least a missense or a splice site mutation.

As a first analysis of the cohort of patients with EBD in Spain, 49 Spanish patients with different mutations in *COL7A1* gene were identified. Thirty-five mutations were identified, 20 of which are novel.

Notably, the pathogenic c.6527insC mutation previously reported in two unrelated patients in France and Germany and most recently in a cluster of

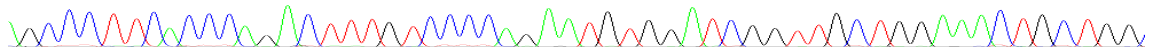
Abreviaturas



ABREVIATURAS

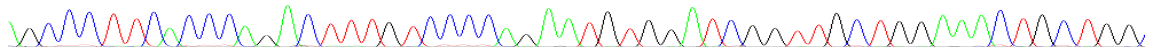
%	Por ciento
°C	Grados centígrados
μl	Microlitros
χ^2	Chi-Cuadrado
aC	Antes de Cristo
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BrEt	Bromuro de etidio
C	Citosina
cM	Centimorgans
Col IV	Colágeno tipo IV
Col VII	Colágeno tipo VII
<i>COL7A1</i>	Colágeno 7 α 1
CpG	Dinucleótido CG
dC	Después de Cristo
ddATP	Didesoxiadenosina trifosfato
ddCTP	Didesoxicitidina Trifosfato
ddGTP	Didesoxiguanosina trifosfato
ddNTP	Didesoxinucleótido trifosfato
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
ddTTP	Didesoxitimidina Trifosfato
DTC	Del inglés <i>delayed termination codón</i> (codon de terminación retrasado)
EB	Epidermolisis bullosa
EBD	Epidermolisis bullosa distrófica
EBDD	Epidermolisis bullosa distrófica dominante
EBDD-ac	Epidermolisis bullosa distrófica dominante acral
EBDD-BDN	Epidermolisis bullosa distrófica dominante del recién nacido
EBDD-na	Epidermolisis bullosa distrófica dominante solo uñas
EBDD-pr	Epidermolisis bullosa distrófica dominante pruriginosa
EBDD-pt	Epidermolisis bullosa distrófica dominante pretival
EBDR	Epidermolisis bullosa distrófica dominante generalizada
EBDR-ac	Epidermolisis bullosa distrófica recesiva acral

Abreviaturas



EBDR-BDN	Epidermolisis bullosa distrófica recesiva del recién nacido
EBDR-ce	Epidermolisis bullosa distrófica recesiva centripetal
EBDR-I	Epidermolisis bullosa distrófica recesiva inversa
EBDR-O	Epidermolisis bullosa distrófica recesiva otras generalizadas
EBDR-pr	Epidermolisis bullosa distrófica recesiva pruriginosa
EBDR-pt	Epidermolisis bullosa distrófica recesiva petrivial
EBDR-sev gen	Epidermolisis bullosa distrófica recesiva severa generalizada
EDTA	Del inglés <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etilendiaminotetraacético)
Exo-SAP-IT	Del inglés <i>exonuclease I-shrimp alkaline phosphatase</i> (exonucleasa I-fosfatasa alcalina de camarón)
F	Del inglés <i>forward</i> (directo)
f	Proporción muestral
G	Guanina
g	Generaciones
Gly	Glicina
HCl	Ácido clorídrico
HM	Homocigoto
HLA	Del inglés <i>human leukocyte antigen</i> (antígenos de leucocitos humanos)
H₂O_d	Agua destilada
Hi-Di	Del inglés <i>highly deionized</i> (altamente deionizada)
HT	Teterocigoto
HW	Hardy-Weinberg
IC	Intervalo de confianza
INE	Instituto nacional de estadística
K14	Queratina 14
K15	Queratina 15
Kb	Kilobases
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodaltons
m²	Metro cuadrado
Mb	Megabase
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
mM	Milimolar
mm	milimetro

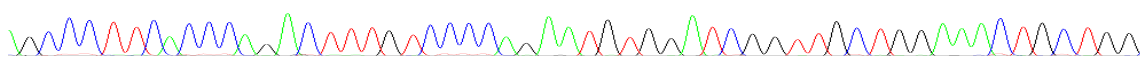
Abreviaturas



ml	Militros
LD (δ)	Del inglés <i>linkage disequilibrium</i> (desequilibrio de ligamiento)
NC-1	No colagenoso 1
NC-2	No colagenoso 2
ND	No determinada
ng	Nanogramos
NMD	Del inglés <i>non-sense mediated decay</i> (degradación mediada por mutaciones terminadoras)
Pb	Pares de bases
PCR	Del inglés <i>polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
pmol	Picomol
Proα1 (VII)	Pro α -1 de colágeno tipo VII
PTC	Del inglés <i>premature termination codón</i> (codon de terminación prematuro)
R	Del inglés <i>reverse</i> (reverso)
r	Tasa de crecimiento poblacional
Ref	Referencia
RFLP	Del inglés <i>restriction fragment length polymorphism</i> (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción)
rpm	Revoluciones por minuto
Seg	Segundos
SNP	Del inglés <i>single nucleotide polymorphism</i> (polimorfismo de un solo nucleótido)
T	Timina
tag SNP	SNP marcador
TBE	Tris-Borato-EDTA
Tm	Del inglés <i>temperatura melting</i> (temperatura de fusión)
WT	Del inglés <i>wild type</i> (tipo Silvestre)

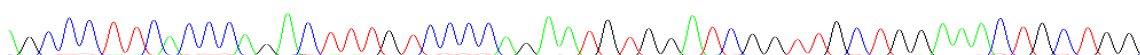


ÍNDICE

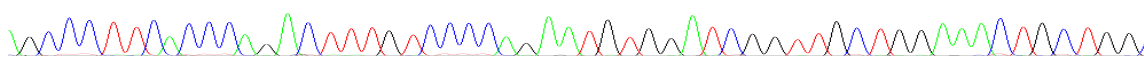


ÍNDICE

ABSTRACT	I
ABREVIATURAS	VIII
INDICE	XII
INTRODUCCIÓN	1
1. La piel	2
1.1. Estructura de la piel	2
1.2. Unión Demo-Epidérmica. Membrana Basal.....	4
2. Enfermedades genéticas de la piel: Epidermolisis Bullosa (EB)	6
2.1. Diagnóstico de la EB.....	9
3. Epidermolisis Bullosa Distrófica (EBD): Clasificación y Clínica	11
4. Genética de la EBD: Col VII y mutaciones en el gen COL7A1	14
5. EBD en España	18
5.1. Genotipo y fenotipo de la cohorte española.....	18
5.2. Identificación de una mutación altamente recurrente: c.6527insC.....	20
6. Mutaciones recurrentes y genética de poblaciones	22
6.1. Variabilidad y asociación genética.....	23
6.1.1. Polimorfismos como marcadores genéticos.....	23
6.1.2. Haplotipos y desequilibrio de ligamiento (LD)	25
6.1.3. Herramientas bioinformáticas:	
Proyecto-HapMap y Haploview.....	27
6.2. Estimación de la edad genética.....	29
6.2.1. Estimación de la edad del ancestro común más reciente.....	29
6.2.2. Estimación de la edad del primer evento mutacional.....	30
OBJETIVOS	31

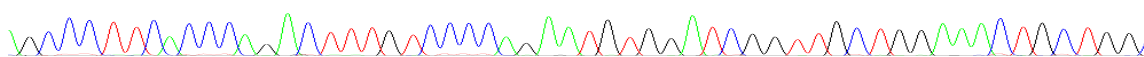


MATERIAL Y MÉTODOS	33
1. Pacientes.....	34
2. Población control.....	34
3. Extracción de ADN.....	38
4. Análisis del origen geográfico de la mutación c.6527insC.....	38
5. Selección de SNPs para la construcción de haplotipos.....	38
5.1. SNPs intragénicos del gen <i>COL7A1</i>	38
5.2. SNPs extragénicos al gen <i>COL7A1</i>	41
6. Amplificación de fragmentos de ADN.....	44
6.1. Diseño de cebadores.....	44
6.2. Diseño de las Reacciones en Cadena de la Polimerasa: PCRs.....	46
7. Análisis de SNPs.....	49
7.1. Técnica de SnaPshot.....	49
7.2. Secuenciación automática.....	51
7.3. Digestiones enzimáticas. Análisis de RFLPs.....	51
8. Análisis estadístico de los SNPs.....	52
9. Construcción de haplotipos.....	52
10. Cálculo de la edad genética.....	53
10.1. Cálculo de la tasa del crecimiento poblacional (r) y proporción muestral (f).....	53
10.2. Análisis del desequilibrio de ligamiento (LD) entre los SNPs y la mutación.....	54
10.3. Aproximaciones matemáticas para la datación.....	55
10.3.1. Algoritmo de Risch y factor de corrección de Luria y Delbrück (método aplicado por Colombo): Estimación de la edad del ancestro común más reciente.....	55



10.3.2. Programas DMLE+ y el BDMC21: Estimación de la edad del primer evento mutacional.....	56
RESULTADOS	57
1. Origen geográfico de la mutación c.6527insC.....	58
2. Haplotipos intragénicos en el <i>COL7A1</i>	59
2.1. Identificación de SNPs intragénicos.....	60
2.1.1. Nuevos SNPs en población española.....	60
2.1.2. Tag SNPs en pacientes con EBD y población español.....	61
2.2. Frecuencias alélicas y genotípicas de los tag SNPs intragénicos.....	65
2.3. Desequilibrio de Ligamiento (LD) entre tag SNPs intragénicos y mutaciones en <i>COL7A1</i>	68
2.4. Construcción de haplotipos intragénicos.....	70
2.4.1. Árboles genealógicos de pacientes con EBD.....	71
2.4.2. Identificación de haplotipos intragénicos y cosegregación con mutaciones en <i>COL7A1</i>	77
2.4.2.1. Análisis de cosegregación haplotípica en un caso clínico de mutación <i>de novo</i>	83
3. Haplotipos extragénicos a <i>COL7A1</i>	85
3.1. Identificación de tag SNPs extragénicos al gen <i>COL7A1</i>	86
3.1.1. Tag SNPs extragénicos en alelos portadores de c.6527ins.....	86
3.1.2. Selección de tag SNPs extragénicos para construcción de haplotipos.....	90
3.1.3. Separación de alelos en portadores de c.6527insC.....	91
3.1.4. Tag SNPs extragénicos en población control española.....	91
3.2. Frecuencias alélicas y genotípicas de los 7 tag SNPs extragénicos.....	91
3.3. Haplotipos extragénicos y análisis de cosegregación.....	94
4. Estimación de la edad de la mutación c.6527insC.....	100
4.1. Tasas de crecimiento poblacional (r) y proporción muestral (f)	100
4.2. Desequilibrio de ligamiento (LD) entre c.6527insC y los tag SNPs extragénicos al gen <i>COL7A1</i>	101

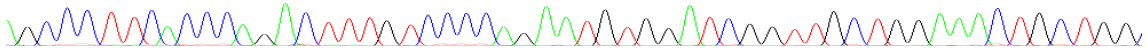
Índice



4.3. Origen del ancestro común más reciente de los cromosomas portadores de c.6527insC.....	104
4.4. Origen del primer evento mutacional de c.6527insC.....	106
DISCUSIÓN.....	108
1. Efecto fundador de c.6527insC y cosegregación haplotípica y mutacional en el gen <i>COL7A1</i>	109
1.1. Asociación entre SNPs intragénicos y la mutación c.6527insC.....	115
2. Origen de la mutación c.6527insC y del primer ancestro común de los cromosomas portadores.....	116
Segregación de los haplotipos extragénicos en portadores del alelo Hi.5_c.6527insC.....	116
Análisis geográfico de los haplotipos extragénicos en portadores del alelo Hi.5_c.6527insC.....	118
Asociación de tag SNPs extragénicos a la mutación c.6527insC.....	120
Estimación de la edad de la mutación c.6527insC.....	121
CONCLUSIONES.....	126
BIBLIOGRAFÍA.....	128
ANEXOS.....	140
1. Anexo I:	142
• Formulario de petición estudio genético	
• Consentimiento informado	
2. Anexo II:	155
• Ficha clínica	
3. Anexo III:	159
• Publicaciones	



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. La piel

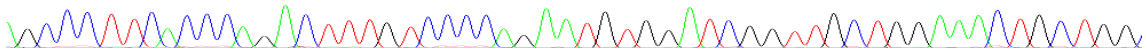
La piel, es el órgano más extenso del cuerpo humano, representando entre el 15 y el 20 % de la masa corporal y una superficie de 2 m² en un adulto. Su espesor varía entre 0.4 mm en los párpados y 5 mm en los talones. Posee una gran capacidad de regeneración y es la principal barrera física entre el organismo y el ambiente externo, protegiendo frente a lesiones y desempeñando también otras funciones como protección frente a la pérdida de agua, la regulación térmica, la comunicación sensorial y funciones inmunológicas y metabólicas (Ross 2007), (Fawcett 1999), (Louis 2006).

1.1. Estructura de la piel

Estructuralmente, la piel consta de tres capas bien diferenciadas, la epidermis, la dermis y la hipodermis (figura 1):

La epidermis es la capa más externa. Es una estructura muy dinámica con gran capacidad regenerativa, propiedad esencial para la función protectora que desempeña. Histológicamente, la epidermis es un epitelio estratificado y queratinizado en el que las células epiteliales o queratinocitos se disponen de forma ordenada, dependiendo de su grado de diferenciación, pudiéndose reconocer cuatro estratos: basal, espinoso, granular y corneo (Junqueira 2005), (Segre 2006) (figura 1). El estrato basal lo forman queratinocitos con alto potencial proliferativo. Dentro de esta capa se localiza la subpoblación de células madre epiteliales responsables de la renovación epidérmica. También están presentes otras células como las Merkel que tienen función sensorial (Ogawa 1996) y los melanocitos, responsables de la producción de la melanina, pigmento que contribuye al color de la piel y nos protege de los posibles efectos negativos de las radiaciones ultravioletas (figura 1). A medida que las células basales abandonan este estrato y empiezan a migrar hacia la superficie de la piel, paran de dividirse y experimentan un complejo programa de diferenciación, dando lugar a los estratos espinoso y granuloso. El estrato espinoso representa el primer estadio de diferenciación, en el cual sus células se unen entre sí formando un sólido armazón. Al pasar al estrato granuloso, los queratinocitos se van

Introducción



aplanando y entrando en un estadio de diferenciación terminal. Finalmente, las células epidérmicas se diferencian a células enucleadas y queratinizadas, que forman el estrato córneo (Kalinin AE 2002) (figura 1). Células como las de Langerhans con función inmunológica (Kimber I 2000) también forman parte de la epidermis.

La dermis constituye el verdadero soporte de este órgano y tiene un espesor de unos 4 mm. Está dividida en tres zonas que, de un nivel más superficial al profundo, reciben los siguientes nombres: Dermis papilar, dermis reticular y dermis profunda (figura 1). Ya no se trata de capas de células estratificadas, como en la epidermis, sino de un complicado sistema de fibras entrelazadas en la cual se sitúa una variedad de tipos celulares destacando el fibroblasto de origen mesenquimal. En la dermis se encuentran también los anejos cutáneos, que son de dos tipos: córneos (pelos y uñas) y glandulares (glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas). También se encuentran los vasos sanguíneos que irrigan la piel (la epidermis no posee vasos) y las terminaciones nerviosas (Junqueira 2005) (figura 1).

Los tipos de fibras que constituyen el armazón de la dermis y que dan lugar a la tersura, la flexibilidad y la elasticidad de la piel son las fibras de colágeno, elastina y reticulina (figura 1). Las fibras de colágeno son fundamentalmente de tipo I y son el principal componente de la dermis. Las fibras elásticas, aunque más escasas que las anteriores, tienen también gran importancia y son las responsables de la elasticidad de la piel. Por último, están las fibras de reticulina, que son muy escasas y se disponen alrededor de los anejos (pelos, uñas, glándulas) y de los vasos sanguíneos (Fawcett 1999).

Los fibroblastos dérmicos son los que se encargan de producir las fibras de colágeno y elásticas. Existen además distintas células del sistema inmunológico (linfocitos, macrófagos, eosinófilos y mastocitos) presentes en número variable dependiendo de las circunstancias de la piel, aumentando por ejemplo cuando existe inflamación.

La hipodermis es la capa más profunda de la piel. Constituida por adipocitos (células grasas) (figura1). La grasa forma un tejido metabólico muy activo que además protege al organismo proporcionándole amortiguación y aislamiento térmico (Junqueira 2005).

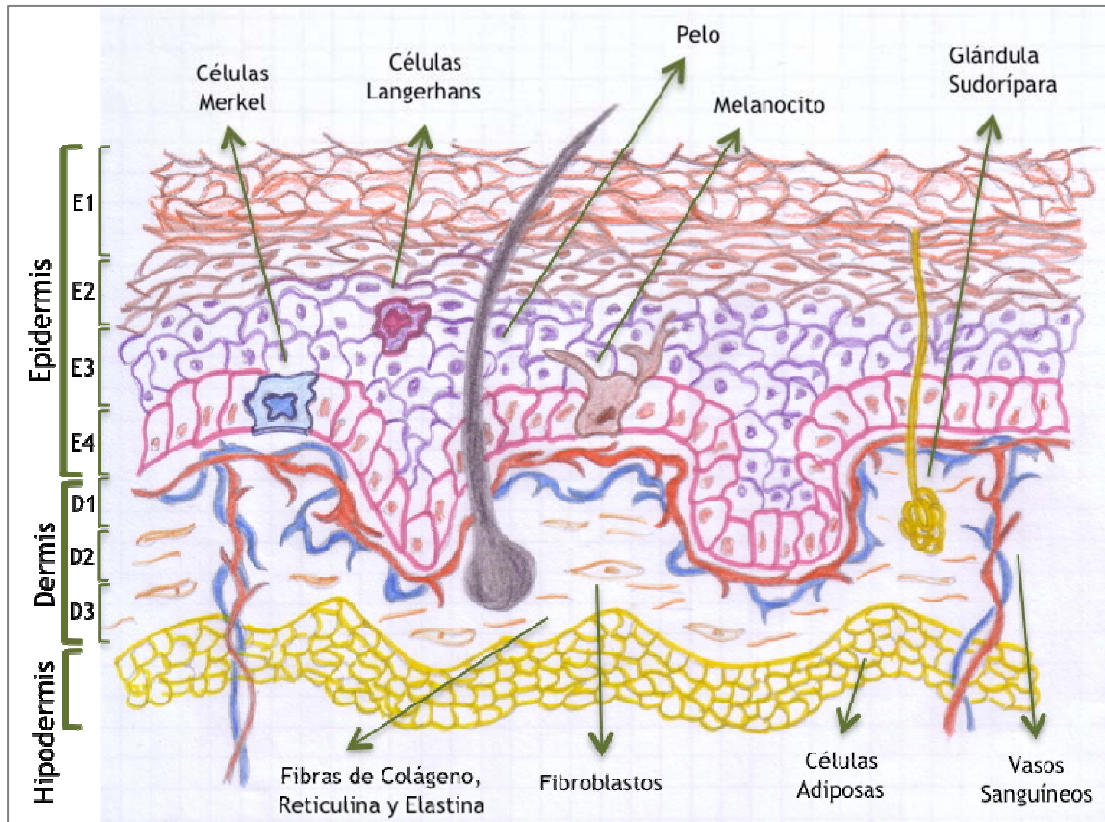
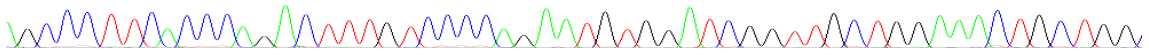


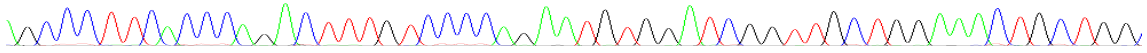
Figura 1: Estratos del tegumento y componentes que lo forman. Pueden observarse los diferentes estratos de la Epidermis. E1: Estrato córneo; E2: Estrato granuloso; E3: Estrato espinoso; E4: estrato basal. La dermis se subdivide en tres fases. D1: Dermis papilar; D2: Dermis reticular; D3: Dermis profunda.

1.2. Unión dermo-epidérmica. Membrana basal.

La membrana basal dermo-epidérmica es un conjunto complejo de proteínas situadas entre la epidermis y la dermis, que proporcionan adhesión entre estas dos capas, mediante la fijación de las células basales de la epidermis al tejido conectivo, sirviendo también de soporte mecánico. Regulan otros muchos procesos importantes tales como desarrollo, diferenciación y movilidad celular, cicatrización de heridas, entre otras. También juega su papel en la transmisión de señales extracelulares y como barrera de permeabilidad (Hashmi and Marinkovich 2011).

Esta unión dermo-epidérmica tiene dos zonas bien diferenciadas denominadas como lámina basal, sintetizada por las células epiteliales, y lámina reticular, sintetizada por los fibroblastos de la dermis (Jeffrey L. Melton 1996) (figura 2).

Introducción



En la lámina basal, los queratinocitos de la capa basal de la epidermis se anclan a la dermis a través de estructuras especializadas denominadas hemidesmosomas, que se unen a queratinas como la K5 y la K14 y de cuya integridad depende la unión dermis-epidermis (figura 2). Inmediatamente subyacente a estos hemidesmosomas y unidos a ellos están las integrinas y los filamentos de anclaje, que se extienden a través de la lámina lúcida y se insertan en la lámina densa (Keene, Marinkovich and Sakai 1997). Estas dos láminas son las que forman la lámina basal (figura 2). La lámina basal posee glicoproteínas como la laminina (presente en los filamentos de anclaje) y otras proteínas fibrilares como el Colágeno XVIII y XIII. Pequeños y delgados filamentos de Colágeno tipo IV (Col IV) se sitúan en la lámina densa, entrelazándose con los filamentos de anclaje y conectando todos ellos para formar un fuerte ensamblaje (Keene et al. 1997) (figura 2).

A continuación de la lámina basal, está la lámina reticular. En ella encontramos fibras reticulares, fibrillas de anclaje y placas de anclaje (figura 2). El ensamblaje de la lámina densa continúa entrelazándose con las fibrillas de anclaje que están formadas por el colágeno tipo VII (Col VII). Junto con el Col VII, proteínas como el colágeno tipo III que da lugar a las fibras reticulares y el Colágeno tipo IV que forma las placas de anclaje, aseguran la conexión entre la membrana basal y el tejido conectivo (Leblond and Inoue 1989) (figura 2).

Estas estructuras forman la membrana basal de todos los tejidos que están expuestos a fuerzas externas perturbadoras tales como el epitelio escamoso estratificado de la piel, el de la faringe y de las zonas gastrointestinales y genitourinarias así como mucosas respiratorias y corneas (Hashmi and Marinkovich 2011).

Cuando alguna de las proteínas que forman la membrana basal tienen su función alterada, esto da lugar, dependiendo de la gravedad, a la ruptura de la unión dermo-epidérmica produciéndose la formación de ampollas a nivel de la membrana basal. Enfermedades congénitas como las epidermólisis bullosas (EB) sufren este tipo de alteraciones en diferentes proteínas de esta membrana (Jeffrey L. Melton 1996). Entender la composición y estructura de la membrana basal permite comprender la fisiopatología de estos desórdenes ampollosos hereditarios. (Hashmi and Marinkovich 2011).

Introducción

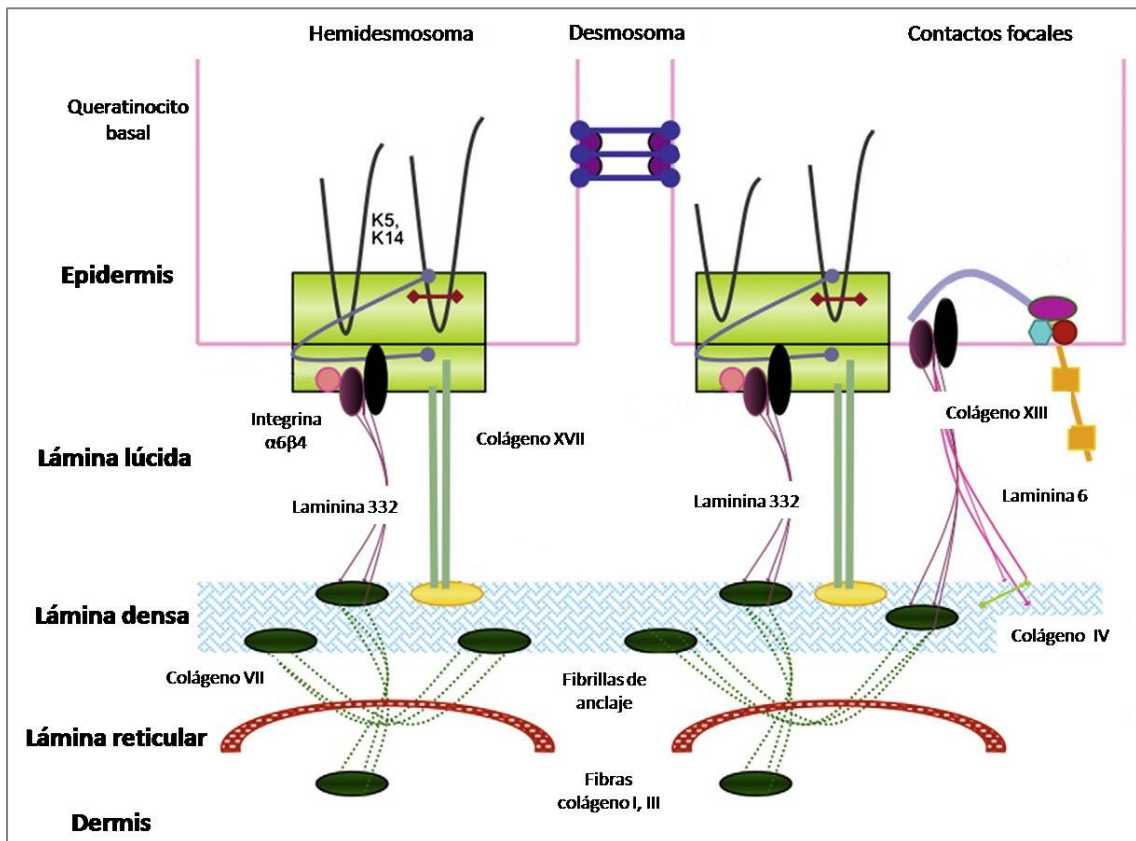
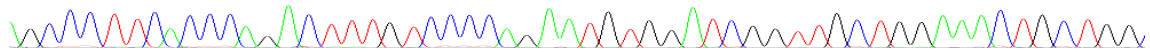
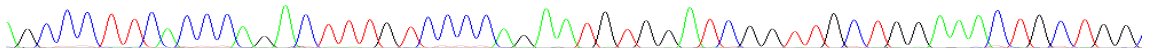


Figura 2: Estructura de la membrana basal y componentes que la forman (Intong and Murrell 2011).

2. Enfermedades genéticas de la piel: Epidermolisis Bullosa (EB)

Bajo la denominación de EB se encuadran un grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por una extrema fragilidad de la piel que da lugar a la formación de ampollas recurrentes en respuesta a una fricción menor o trauma mecánico, provocando en algunos casos una cicatrización anormal de heridas. En algunos casos también puede afectar a otros tejidos como las mucosas (Fine et al. 1991), (Christiano and Uitto 1996). Esta fragilidad está causada por mutaciones en genes que codifican para proteínas estructurales de la piel. Hasta la fecha, se han documentado más de 1000 mutaciones en al menos 17 genes estructurales que resultan en esa adhesión defectuosa en la piel (Fine 2010b), (Fine 2010a), (Intong and Murrell 2011), (Rao et al. 2012), (Bruckner-Tuderman and Has 2012). A pesar de esta gran cantidad de genes afectados, esta patología pertenece al grupo de enfermedades raras, aquellas cuya

Introducción



frecuencia es menor a 1 caso por cada 2000 individuos (0.05 %) (Hernandez-Martin and Torrelo 2010).

Esta enfermedad tiene un carácter muy heterogéneo tanto en sus características clínicas como en las histológicas, en su gravedad, pronóstico y modo de herencia (Bermejo 2005) (figura 3). Los genes asociados a esta enfermedad codifican para proteínas intracelulares, transmembranales y extracelulares involucradas en el citoesqueleto, en la unión célula-célula o célula-matriz (Shinkuma, McMillan and Shimizu 2011). Forman parte de las estructuras adhesivas de la piel que aseguran la integridad y la estabilidad mecánica del tegumento. El hecho de que exista un gran número de proteínas formando parte de estas estructuras explica la heterogeneidad de la enfermedad cuando se ven afectadas (Bruckner-Tuderman and Has 2012) .

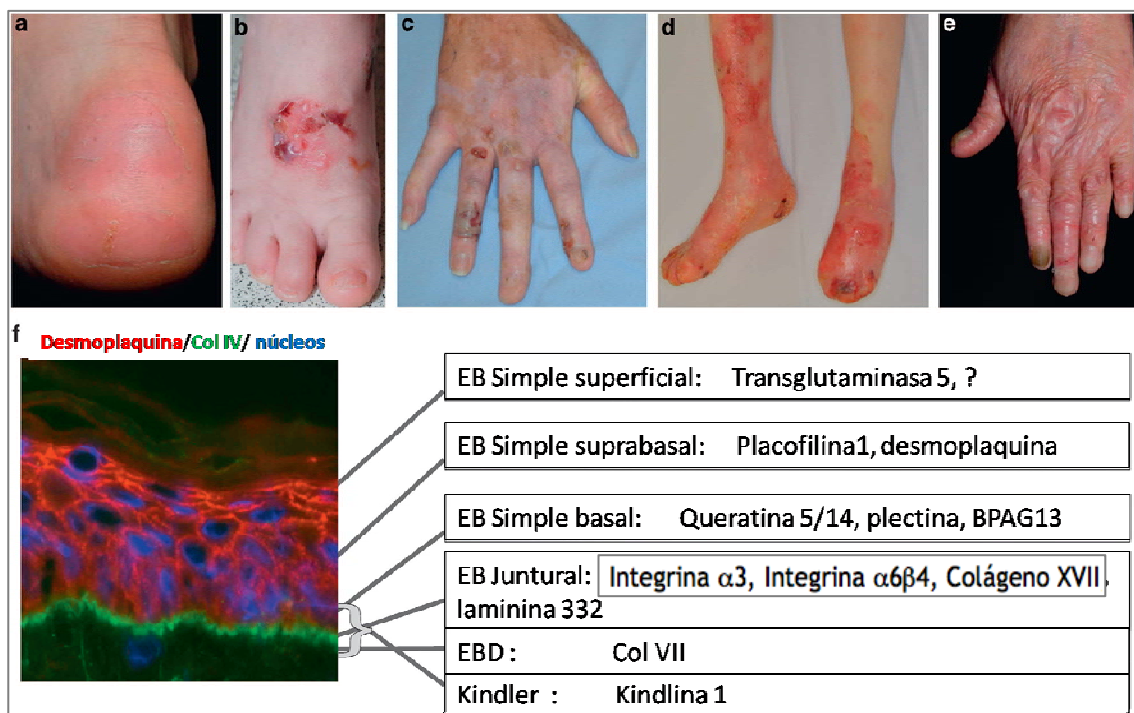
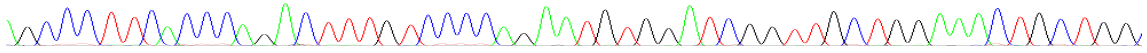


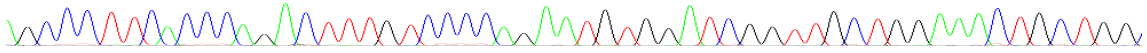
Figura 3: Heterogeneidad clínica y molecular de la EB. (a) Erosiones superficiales después de la formación de ampollas en el talón de un niño con EB simple superficial. (b) Grupo de ampollas y costras en el pie de una niña con EB simple basal. (c) Mano de una mujer con EB juntural que muestra ampollas, costras, erosiones, falta de pigmentación y pérdida de uñas. (d) Pies de un niño con EBD. Se observan cicatrices extensas, ampollas, fusión de los dedos con pérdida de uñas. (e) Mano izquierda de un hombre joven con síndrome de Kindler. Se observa la pronunciada atrofia de la piel. (f) El panel izquierdo muestra la tinción inmunofluorescente de una piel humana normal con los anticuerpos contra Desmoplaquina, Col IV y núcleos. En el lado derecho de la figura se muestran los diferentes tipos de EB, las proteínas que se ven afectadas y señalan los niveles de escisión de la piel según tipo de EB (Bruckner-Tuderman and Has 2012).

Introducción



La EB fue descrita por primera vez en 1886 (Fine 2010c) y se han producido varios avances en la clasificación de EB desde que se introdujo por primera vez en el siglo XIX (Pearson 1962). Se han descrito hasta 30 subtipos diferentes de EB (Fine 2010c), (Has 2011). La nueva clasificación (Fine et al. 2008) reconoce cuatro tipos principales, dependiendo de la localización de las proteínas diana y el nivel de las ampollas (Intong and Murrell 2011):

- **Tipo I (EB simple):** Engloba las formas intraepidérmicas de EB, debidas a la fragilidad de los queratinocitos basales, en las que las ampollas se forman a nivel superficial. Todas las formas son no cicatriciales, no suelen producir afectación extracutánea y pueden tener herencia autonómica dominante y autonómica recesiva. Las proteínas más afectadas son las queratinas K5 y K14 pero también se han encontrado mutaciones en genes que codifican para plectinas y para el antígeno 1 del penfigoide ampolloso (BPAG 1e) (figura 3). En la última clasificación de EB (Fine et al. 2008), el espectro de la simple ha sido ampliado incluyendo dos subtipos más muy poco comunes, en los que se ven afectadas proteínas desmosomales. Esto da lugar a la escisión en la capa suprabasal epidérmica, viéndose afectada la adhesión célula-célula que a nivel clínico está dominado por erosiones cutáneas en vez de ampollas.
- **Tipo II (EB de unión o juntural):** También denominada atrófica por el tipo de lesiones residuales a las que da lugar. Se produce por un fallo a nivel de la membrana basal que en condiciones normales une dermis y epidermis. Todos los subtipos que incluye tienen herencia autonómica recesiva. Las proteínas que se ven afectadas más comúnmente son Laminina 332 (previamente conocida como Laminina 5), Integrina y Colágeno XVII. Recientemente se han añadido otras como la Integrina $\alpha 3$ (figura 3).
- **Tipo III (EB distrófica, EBD):** Incluye las formas dérmicas de EB, en las que la separación tisular ocurre por debajo de la lámina densa, en la parte más superficial de la dermis. Dichas formas se caracterizan por presentar cicatrización distrófica. Pueden tener herencia autonómica dominante o recesiva. La proteína que se ve afectada es el Col VII (Hovnanian et al. 1992) (Christiano et al. 1994b) (figura 3).



- **Tipo IV (síndrome kindler):** Esta enfermedad ha sido recientemente clasificada como un tipo de EB. Su herencia es autosómica recesiva y la proteína afectada es la Kindlina-1, un componente recientemente descubierto en los contactos focales de los queratinocitos basales. La ruptura de la piel se produce a niveles variables y se caracteriza por la formación congénita de ampollas, iniciándose en la infancia, con una poiquilodermia progresiva, atrofia cutánea, fotosensibilidad, descamación y una predisposición al cáncer de piel en la edad adulta (Intong and Murrell 2011), (Fine 2010b), (Fine 2010a), (Fine et al. 2008), (Rao et al. 2012), (Bruckner-Tuderman and Has 2012) (figura 3).

2.1. Diagnóstico de la EB

La técnica de diagnóstico primaria empleada para la correcta distinción entre una EB y otra es el examen mediante mapeo antigénico para las proteínas candidatas a encontrarse afectadas. El examen histológico de una biopsia de piel no es la técnica de diagnóstico concluyente ya que puede dar lugar a fallos y en algunos de los casos es imposible la distinción entre tipos de EB. Por ello, tras realizar este examen y observar una posible EB en el paciente, es imprescindible realizar a continuación el mapeo antigénico como primer diagnóstico fiable. Este primer cribado diagnóstico es el paso previo para el posterior análisis genético, que puede realizarse tras saber que tipo de proteína está afectada (Rao et al. 2012).

Para la realización del mapeo antigénico mediante inmunofluorescencia, se usan anticuerpos específicos contra las proteínas estructurales de la piel que pueden estar afectadas en las distintas epidermolisis. Hasta ahora el estudio se realiza para queratina 5 y 14, Plectina, integrina $\alpha 6$ y $\beta 4$, el colágeno tipo XVII, la laminina 332 (anteriormente conocido como laminina 5) con sus cadenas de 3 ($\alpha 3$, $\beta 3$, y $\gamma 2$), y el Col VII. Para mejorar la visualización del plano de ruptura dermo-epidérmica, especialmente para la EBD, se usa el anticuerpo contra Col IV (presente en la lámina densa de la unión dermo-epidérmica) (Cepeda-Valdes et al. 2010) (figura 4).

Introducción

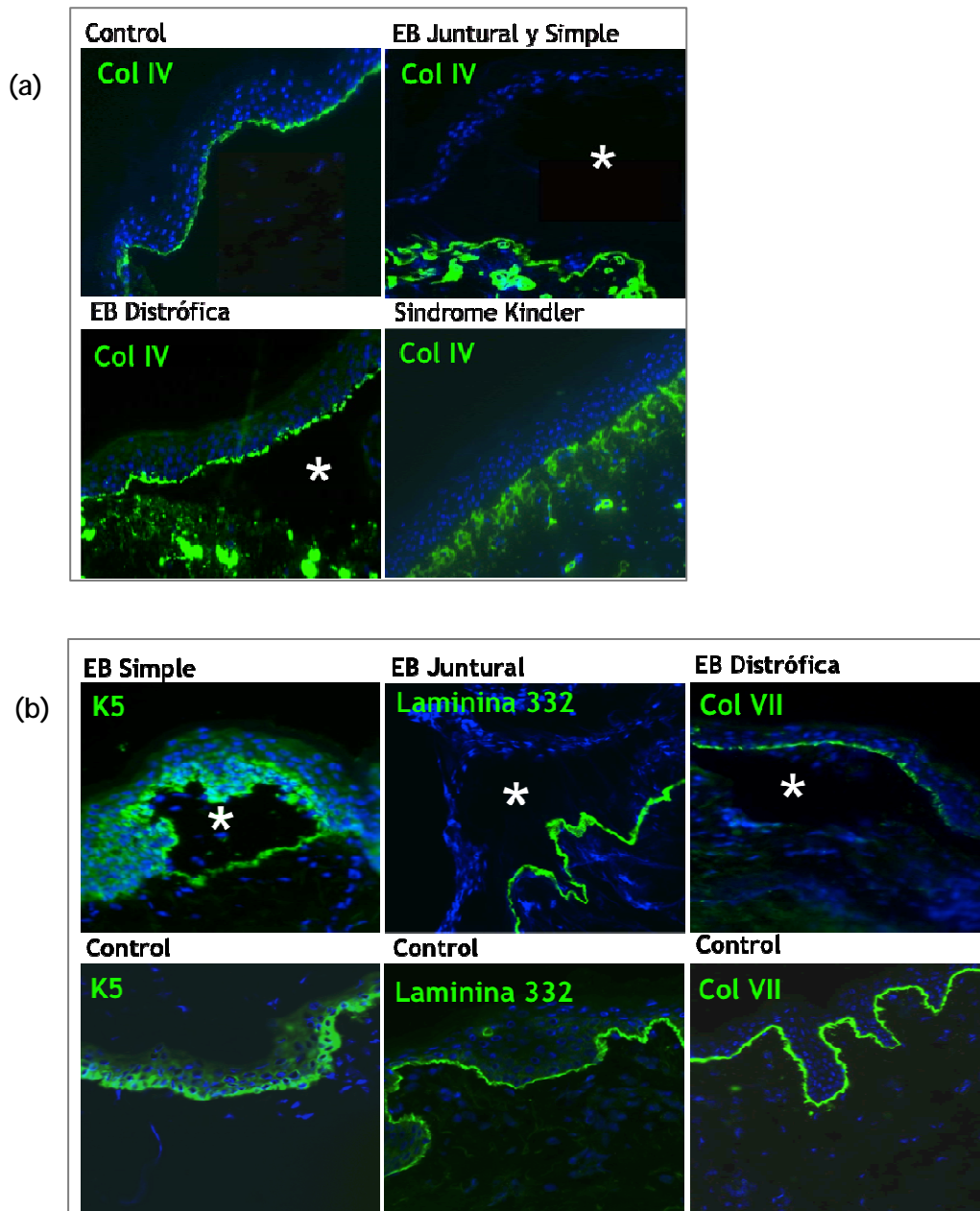
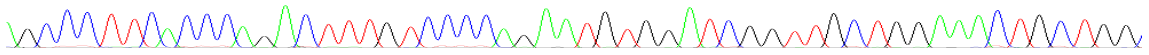
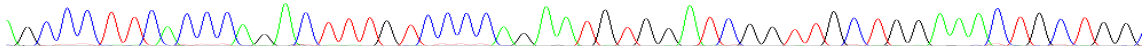


Figura 4: Inmunofluorescencias en cortes histológicos de biopsias de piel para el diagnóstico diferencial de tipos de EB. (a) Inmunofluorescias para el Col IV. Tanto en la EB juntural como en la EB simple puede observarse el col IV en el suelo de la ampolla. En la EB distrófica se observa el col IV en el techo de la ampolla mientras que en el Síndrome de Kindler se observa una reduplicación del col IV. (b) En la EB simple se observa la queratina K5 rodeando toda la pared de la ampolla. En la EB juntural se observa la laminina 332 en el suelo de la ampolla. En la EB distrófica, el Col VII se sitúa en el techo de la ampolla. En función de la proteína afectada en cada tipo de EB podría observarse en la inmunofluorescencia una disminución en la concentración de proteína o incluso la ausencia total de la misma.



3. Epidermolisis Bullosa Distrófica (EBD): Clasificación y Clínica.

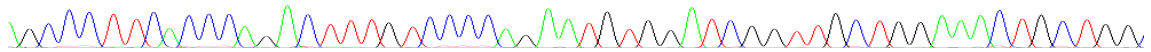
La EBD se caracteriza frente al resto de EB por una cicatrización distrófica. Esta genodermatosis presenta una extrema fragilidad cutánea y en algunos casos también de las mucosas, lo cual da como resultado la aparición de ampollas y úlceras en todo el cuerpo del individuo afecto, lo que la hace de las más agresivas. La pobre adhesión de la epidermis a la dermis deja a la epidermis vulnerable frente a una suave fricción o trauma (Varki et al. 2007).

Desde hace algo más de dos décadas, ya se conocen las bases moleculares de la enfermedad (Bruckner-Tuderman et al. 1988). La EBD se produce por la aparición de mutaciones en el gen *COL7A1* (Colágeno 7 α 1) que codifica para la cadena pro α -1 de colágeno tipo VII [Pro α 1 (VII)]. El Col VII es el constituyente principal de las fibrillas de anclaje, que en la piel se encuentran por debajo de la lámina basal en la membrana basal dermo-epidérmica (Burgeson et al. 1985). Las fibrillas de anclaje tienen función de adhesión entre la epidermis y la dermis y por ello, cuando su funcionamiento es defectuoso o sufren anomalías en el número y morfología, se generan rupturas a la altura de la sub-lámina densa de la piel, formándose las ampollas (Tidman and Eady 1985) (Burgeson 1993) (Jarvikallio, Pulkkinen and Uitto 1997).

La EBD se puede presentar con un patrón de herencia dominante (EBDD) o recesivo (EBDR) (Fine et al. 1991). Dentro de las formas dominantes se encuentran los siguientes subtipos: La EBDD generalizada (EBDD-gen), acral (EBDD-ac), pretibial (EBDD-pt), pruriginosa (EBDD-pr), solo uñas (EBDD-na, del inglés *nails*) y la EBDD del recién nacido (EBDD-BDN, del inglés *bullous dermolysis of the newborn*) (Fine et al. 2008). Las formas recesivas se pueden subdividir en EBDR severa generalizada (EBDR-sev gen), otras generalizadas (EBDR-O), acral (EBDR-ac), inversa (EBDR-I), pretibial (EBDR-pt), pruriginosa (EBDR-pr), centripetal (EBDR-ce) y la EBDR del recién nacido (EBDR-BDN) (Fine et al. 2008).

En la EBDD-gen se observan las fibrillas de anclaje normales o una disminución en el número. Sin embargo, tanto en la EBDD-BDN como en la EBDR-BDN pueden observarse al microscopio electrónico cuerpos electro-densos estrellados dentro de la lámina basal y las fibrillas de anclaje se ven reducidas. Solo durante el periodo de

Introducción



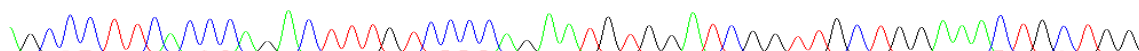
formación de ampollas, por inmunofluorescencia se observa tinción granular dentro de los queratinocitos basales y suprabasales y ausencia o marcada reducción de la tinción a lo largo de la unión dermo-epidérmica. Por otro lado, en la EBDR-sev gen, mediante microscopía electrónica se observan fibrillas de anclaje rudimentarias o ausentes y por inmunofluorescencia, el Col VII está ausente o marcadamente reducido. También en la EBDR-O se observan fibrillas de anclaje aparentemente rudimentarias o reducidas por microscopía electrónica y por inmunofluorescencia el Col VII está reducido. Por último, en la EBDR-I, el Col VII se observa de forma variable en la inmunofluorescencia. (Fine et al. 2008).

Clínicamente, la EBDR puede exhibir un amplio espectro de severidad, que va desde una simple distrofia ungular hasta la presencia generalizada de ampollas y deformidades (pseudosindactilia) (figura 5), así como contractura articular. La enfermedad también puede afectar a las mucosas (boca, garganta, esófago y ojos) lo cual limita notablemente la calidad de vida de estos pacientes y dificulta llevar a cabo actividades tan fundamentales como comer. La EBDR se complica frecuentemente con el desarrollo de carcinomas epidermoides agresivos en zonas con úlceras crónicas y muerte prematura del paciente en la segunda-tercera década de vida. Sin embargo, los mecanismos patogénéticos que subyacen a este espectro de manifestaciones clínicas de la EBDR son todavía poco conocidos (Varki et al. 2007).



Figura 5: Rasgos clínicos más significativos de los tipos de EBD más comunes. (a) EBDR-O. Los pacientes muestran ampollas generalizadas en todo el cuerpo. (b) EBDD. Los pacientes muestran un fenotipo suave centrado en las extremidades. (c) EBDR sev-gen. Característica por la pseudosindactilia en pies y manos.

Introducción



Los rasgos clínicos de los principales subtipos de EBD como los nuevos criterios de clasificación, se definen en las siguientes tablas:

Tabla 1: Subtipos de EBD: resumen clínico (EBDD generalizada, EBDR severa generalizada y EBDR otras generalizadas)

	EBDD generalizada	EBDR severa generalizada	EBDR otras generalizadas
Modo de transmisión (Usual)	AD	AR	AR
Comienzo (Usual)	Nacimiento	Nacimiento	Nacimiento
Distribución en la piel (predominante)	Generalizada	Generalizada	Generalizada
Hallazgos en la piel (frecuencia*)			
Ampollas	2-3+	4+	3-4+
Milia	3+	4+	3-4+
Cicatrices atróficas	3-4+	4+	3-4+
Uñas distróficas o ausentes	4+	4+	4+
Tejido de granulación	Ausente	Raro	Ausente
Cuero cabelludo anormal	2+	3+	2+
Queratodermia	Nada	Nada	Nada
otros	“Lesiones albopapuloides” (variable)	Nada	Nada
Relativo a la inducibilidad de ampollas	Variable	Alta	Alta
Implicación extracutánea*			
Anemia	1+	4+	2+
Retraso del crecimiento	Raro	4+	2+
Cavidad oral			
Alteraciones de Tejido blando	3+	4+	3+
Hipoplasia del esmalte	Ausente	Ausente	Ausente
Caries	Normal	Excesivo	Normal
Tracto gastrointestinal	2+	4+	3-4+
Tracto genitourinario	Raro	Raro	raro
Hallazgos oculares	Ausente	3+	2+
Seudosindactilia	Raro	4+	2+
Tracto respiratorio	Ausente	Ausente	Ausente
Otros	Ausente	Glomerulonefritis, Amiloidosis renal, Nefropatía IgA, FCR, Cardiomiopatía, Retraso en pubertad, Osteoporosis	Ausente
Riesgo a los 30 años de:			
Carcinoma de células escamosas	Ninguno	3+	2+
Melanoma maligno	Ninguno	1+	Ninguno
Carcinoma de células basales	Ninguno	Ninguno	Ninguno
Muerte relacionada con EB	Ninguno	4+	2+

AD, autosómico dominante; AR, autosómico recesivo; FCR, fallo crónico renal; EBDD, EBD dominante; EBD, EB distrófica; EBDR, EBD recesiva

* Escala: ausente, 1+, 2+, 3+, 4+

(Fine et al. 2008)

Introducción

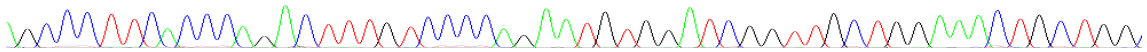


Tabla 2: Subtipos de EB distrófica: resumen clínico (EBD acral; EBD pretibial; EBD pruriginosa)

	EBD acral	EBD pretibial	EBD pruriginosa
Modo de transmisión (Usual)	AD o AR	AD o AR	AD o AR
Comienzo (Usual)	Infancia	Nacimiento o infancia	Niñez
Distribución en la piel (predominante)	Manos y pies	Pretibial; manos y pies; uñas	Generalizada o localizada
Hallazgos en la piel (frecuencia*)			
Ampollas	4+	4+	4+
Milia	4+	4+	4+
Cicatrices atróficas	4+	4+	4+
Uñas distróficas o ausentes	3+	4+	4+
Tejido de granulación	Ausente	Ausente	Ausente
Cuero cabelludo anormal	Ausente	Ausente	Ausente
Queratodermia	Ausente	Ausente	Ausente
otros	Nada	Liquen plano-como lesiones	Prurito severo
Relativo a la inducibilidad de ampollas	Variable	Variable	Variable
Implicación extracutánea*			
Anemia	Ausente	Ausente	Rara
Retraso del crecimiento	Ausente	Ausente	Rara
Cavidad oral			
Alteraciones de Tejido blando	Ausente	Ausente	Ausente
Hipoplasia del esmalte	Ausente	Ausente	Ausente
Caries	Normal	Excesivo	Normal
Tracto gastrointestinal	Ausente	Estreñimiento (común)	Estreñimiento (común)
Tracto genitourinario	Ausente	Ausente	Ausente
Hallazgos oculares	Ausente	Ausente	Ausente
Seudosindactilia	Ausente	Ausente	Ausente
Tracto respiratorio	Ausente	Ausente	Ausente
Riesgo a los 30 años de:			
Carcinoma de células escamosas	Ninguno	Ninguno	Ninguno†
Melanoma maligno	Ninguno	Ninguno	Ninguno
Carcinoma de células basales	Ninguno	Ninguno	Ninguno
Muerte relacionada con EB	Ninguno	Ninguno	Ninguno

AD, autosómico dominante; AR, autosómico recesivo; FCR, fallo crónico renal; EBDD, EBD dominante; EBD, EB distrófica; EBDR, EBD recesiva

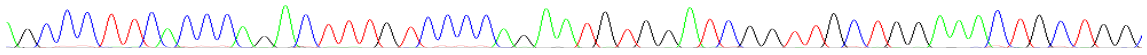
* Escala: ausente, 1+, 2+, 3+, 4+

† Puede haber un incremento en el riesgo de carcinoma de células escamosas después de los 30 años. (Fine et al. 2008)

4. Genética de la EBD: Col VII y mutaciones en el gen *COL7A1*

El gen *COL7A1* (<http://www.metallife.com/OMIM/120120>), gen afectado en todos los subtipos de EBD, se localiza en el cromosoma 3, exactamente a nivel del 3p21.3 (figura 6). Tiene 118 exones que codifican para 2944 aminoácidos. El tamaño total del gen es de 32 Kilobases (Kb). Este gen, se traduce en Pro α 1 (VII) que tiene un tamaño de 350 Kilodaltons (kDa) y contiene tres dominios. El dominio no colagenoso 1 (NC-1) terminal, el no colagenoso 2 (NC-2) terminal y el dominio colagenoso (Greenspan et al. 1993) (figura 6). Este último se une con otros dominios colagenosos

Introducción



de otros Pro α 1 (VII) formando la llamada triple hélice. Esta triple hélice se une formando dímeros antiparalelos. La unión de estos dímeros dan lugar a las fibrillas de anclaje que son las que unen la dermis con la lámina basal (Christiano et al. 1994b) (Brittingham et al. 2005)

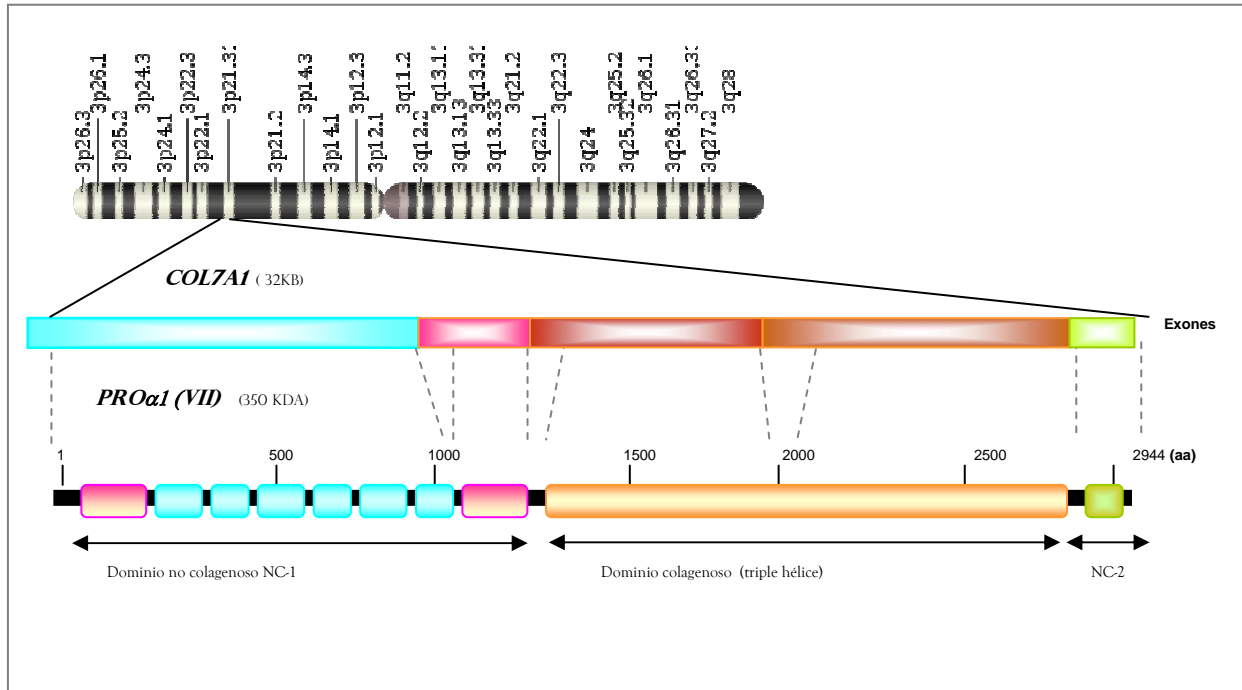
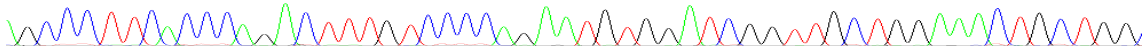


Figura 6: Localización del gen *COL7A1* en el cromosoma 3 y estructura del gen y de la cadena Pro α 1 (VII). (aa) Aminoácidos.

Hasta la fecha, hay aproximadamente 520 mutaciones patogénicas publicadas en el gen *COL7A1*, pero se han descrito más de 750 mutaciones sumando las variaciones de secuencia. Las dos bases de datos principales donde se publican las mutaciones descritas en este gen son www.col7.info y www.deb-central.org. (Wertheim-Tysarowska et al.), (van den Akker et al.)

Dependiendo del tipo de mutación, que influye en la formación, estabilidad y producción del Col VII, EBD se hereda de forma dominante o recesiva. Los tipos de mutaciones responsables de la herencia autosómica recesiva se encuentran en los 118 exones y se componen de Codones de Terminación Prematura (PTC, del inglés *premature termination codon*) y variantes de cambio de base principalmente. Por el contrario, las variantes autosómicas dominantes, hasta la fecha, se localizan principalmente en los exones que codifican para el dominio triple hélice y que

Introducción



comprenden, casi exclusivamente, las sustituciones de Glicina (Dang and Murrell 2008). No todos los cambios de aminoácidos en Glicina son dominantes, ya que casi el 50 % de ellos se heredan de modo recesivo (Christiano et al. 1996a), (Wertheim-Tysarowska et al. 2011).

La identificación de mutaciones en el gen nos permite hacer una correlación aproximada entre la naturaleza de la mutación y las características clínicas de la enfermedad. De acuerdo con lo que se observó en el punto anterior (Fine et al. 2008), hay 13 subtipos de EBD, que difieren con respecto al modo de herencia, el espectro y la gravedad de los resultados clínicos.

En particular y generalizando:

- PTC en ambos alelos del gen *COL7A1* habitualmente dan como resultado un Ácido Ribonucléico (ARN) truncado que da lugar a la falta de expresión de Col VII y ausencia de fibrillas de anclaje con la consecuente aparición de la forma más severa de la enfermedad EBDR-sev gen, debido a la ausencia total de proteína (Christiano et al. 1994a), (Christiano et al. 1997) (figura 7).
- Heterocigosis compuesta por una mutación de cambio de sentido, o intrónica y un PTC, compatible con la síntesis de una cantidad reducida de Col VII, a pesar de que pudiera funcionar de un modo irregular, da lugar a formas más suaves de la enfermedad (Christiano, McGrath and Uitto 1996b) (figura 7).
- Sustitución en heterocigosis de una glicina (Gly) en el dominio colagenoso genera un efecto dominante negativo que da lugar a un plegado y secreción anormal del Col VII y que causa la forma dominante de la EB (EBDD) caracterizada por una reducción del número y/o alteraciones estructurales de las fibrillas de anclaje y un fenotipo generalmente suave a veces prácticamente asintomático (Christiano, Ryyanen and Uitto 1994c) (figura 7).

Sin embargo, existen excepciones a estas reglas, con aparición de relaciones genotipo-fenotipo impredecibles y sorprendentes (Varki et al. 2007).

Introducción

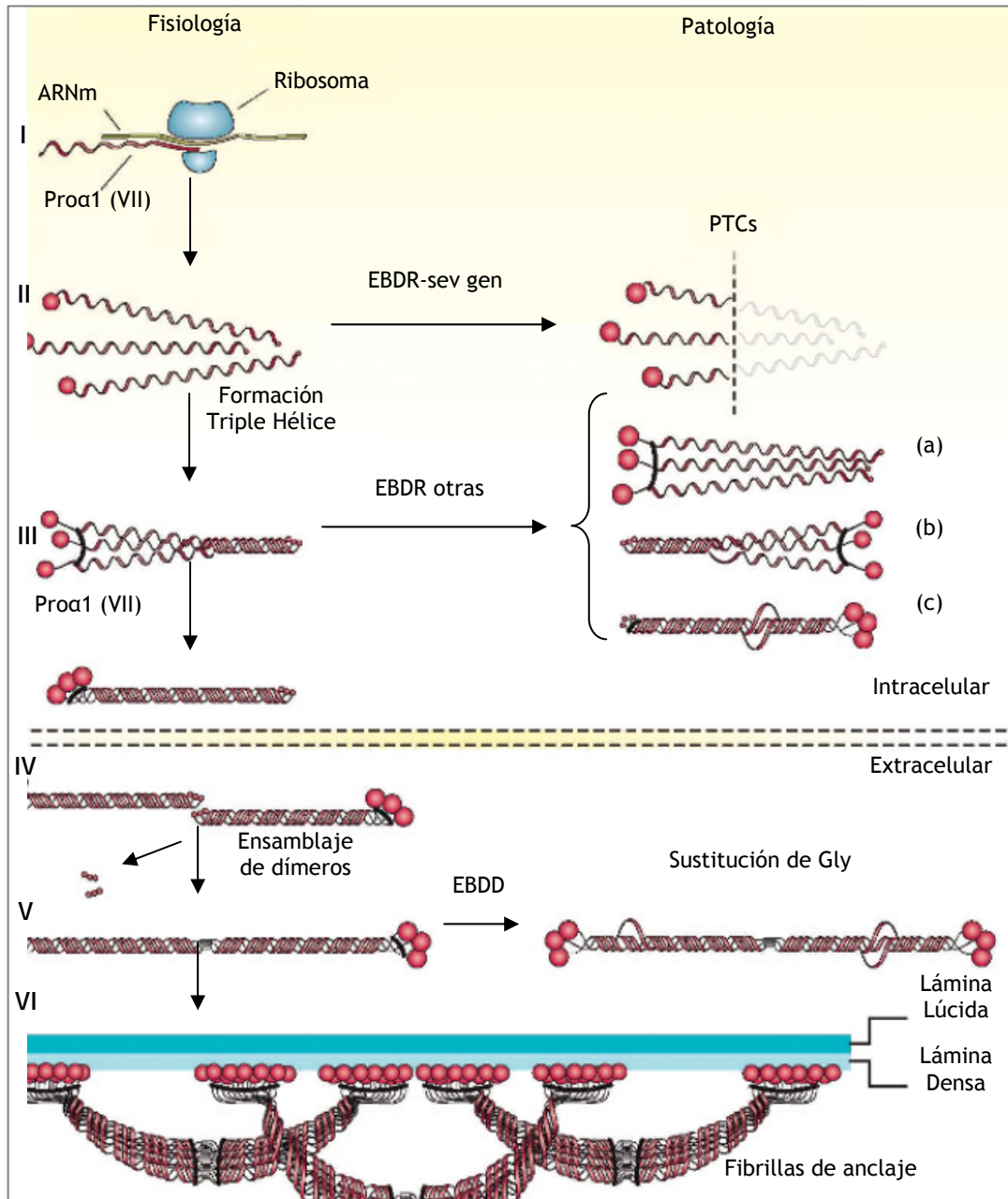
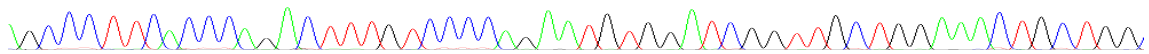
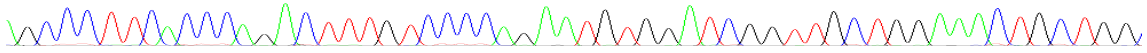


Figura 7: Síntesis del Pro α 1 (VII) de Colágeno y su ensamblaje a fibrillas de anclaje (condiciones fisiológicas, lado izquierdo de la figura) y perturbaciones en los procesos que conducen a diferentes formas de EBD (lado derecho). En el espacio intracelular de los queratinocitos y fibroblastos, Pro α 1 (VII) se sintetiza (I). Tres Pro α 1 (VII) asociados se enrollan en una formación característica de triple hélice (II) y (III). Después de su secreción al espacio extracelular, las moléculas de triple hélice forma dímeros antiparalelos (IV) que, después de la eliminación proteolítica de una parte del extremo carboxi-terminal, se estabilizan (V). Posteriormente, varias moléculas de dímeros ensamblados, se unen para formar el complejo llamado fibrillas de anclaje (VI). Los NC1 se unen a la lámina densa, estabilizando la asociación de la lámina densa con la dermis subyacente. Las mutaciones en el gen *COL7A1* pueden dar lugar a PTCs que se manifiestan con EBDR sev gen cuando están presentes en ambos alelos. Cuando el PTC está en heterocigosis con una mutacion de cambio de aminoácido, esta última puede interferir con: a) la cadena de asociación, b) la formación de la triple hélice o c) la estabilidad de la triple hélice dando formas más suaves de la EBD. Sustituciones de Gly en el dominio colagenoso desestabilizan la triple hélice y puede dar lugar, a una herencia dominante (EBDD). Modificado de (Varki et al. 2007).



Además, han sido descritas variaciones significativas de fenotipo (inter e intrafamiliares) en pacientes con las mismas mutaciones en *COL7A1*. Esto indica que alteraciones genéticas adicionales y factores epigenéticos o ambientales pueden contribuir al fenotipo clínico final por modulación y/o modificación de la evolución de la enfermedad. De hecho, se ha descrito variabilidad fenotípica dada por un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*) descrito en el gen de la metaloproteasa MMP1, que se ha correlacionado con la variabilidad de la pseudosindactilia en EBDR (Bodemer et al. 2003), (Kern et al. 2009) (Titeux et al. 2008).

5. EBD en España

5.1. Genotipo y fenotipo de la cohorte española

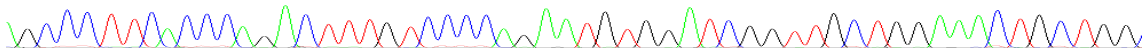
Como primer análisis de la cohorte de pacientes con EBD en España (Escamez et al. 2010), se identificaron mediante el mapeo antigénico 49 pacientes que posteriormente fueron confirmados como EBD tras realizar el análisis mutacional. A todos ellos se les realizó una biopsia de piel para su diagnóstico por inmunofenotipo y la extracción de sangre periférica para la búsqueda de mutaciones en su ADN (Ácido Desoxiribonucleico).

Todos los pacientes presentaban lesiones inducidas mecánicamente (mecanobulosas) en la piel, con o sin participación de las mucosas. En todas las biopsias de piel analizadas, el mapeo antigénico mostró la proteína Col IV localizada en el techo de la ampolla, indicando la fractura a la altura de la dermis papilar, lo que señala que se trata de una EBD (Escamez et al. 2010).

Cuarenta y un pacientes mostraron un patrón de herencia recesivo de los cuales 27 tenían EBDR-sev gen, 8 tenían el subtipo EBDR-O y 6 tenían un fenotipo localizado: 2 con EBDR-pt, 3 EBDR-ac y 1 EBDR-l. De los 8 pacientes con un patrón dominante, 2 exhibían un fenotipo generalizado, 4 acral y 2 solo de uñas (tabla 3).

El estudio genético de estos pacientes reveló un total de 35 mutaciones, de las cuales 32 muestran un patrón de herencia autosómico recesivo y 3 como autosómico dominante. Las mutaciones autosómicas recesivas encontradas fueron 8 inserciones y

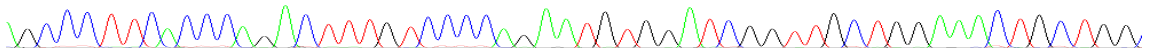
Introducción



delecciones, 7 mutaciones sin sentido, 12 cambios de aminoácido y 5 intrónicas. Las 3 mutaciones con patrón de herencia dominante se localizaron en los exones 73 y 74 y fueron todas sustituciones de Gly. Veinte de las 35 mutaciones identificadas no se habían descrito con anterioridad. Todas ellas quedan reflejadas en la tabla 3. El carácter intrafamiliar de estas mutaciones explicaría el gran número de mutaciones nuevas encontradas (Mellerio et al. 1997), (Tamai et al. 1999), (Salas-Alanis, Amaya-Guerra and McGrath 2000), (Gardella et al. 2002) (Csikos et al. 2005). La frecuencia de las mutaciones existentes en esta cohorte de pacientes no supera el 2 % a excepción de una, la inserción c.6527insC.

Patient	Clinical diagnosis	COLVII IFM	Mutation 1			Mutation 2		
			Region	cDNA	Protein/consequence	Region	cDNA	Protein/consequence
1-12	RDEB-sev gen	-	Ex 80	c.6527insC	PTC	Ex 80	c.6527insC	PTC
13, 14	RDEB-sev gen	-	Ex 80	c.6527insC	PTC	Ex 57	c.5131insCTCAC	PTC
15	RDEB-sev gen	-	Ex 80	c.6527insC	PTC	Ex 1	c.58del13	PTC ^a
16	RDEB-sev gen	-	Ex 80	c.6527insC	PTC	Ex 3	c.336C>G	p.Y112X ^c
17	RDEB-sev gen	-	Ex 80	c.6527insC	PTC	Ex 23	c.3130C>T	p.Q1044X
18	RDEB-sev gen	-	Ex 80	c.6527insC	PTC	Ex 54	c.5047C>T	p.R1683X
19	RDEB-sev gen	-	Ex 80	c.6527insC	PTC	ND	ND	ND
20	RDEB-sev gen	-	Ex 80	c.6527insC	PTC	ND	ND	ND
21	RDEB-sev gen	- ^b	Ex 80	c.6527insC	PTC	Ex 92	c.7097G>A	p.G2366D
22	RDEB-sev gen	+/- ^c	Ex 80	c.6527insC	PTC	Ex 104	c.7760G>A	p.G2587D
23	RDEB-sev gen	-	Ex 25	c.3294C>G	p.Y1098X	Ex 25	c.3294C>G	p.Y1098X
24	RDEB-sev gen	-	Ex 103	c.7756insC	PTC	ND	ND	ND
25	RDEB-sev gen	-	Ex 75	c.6266delCCCC	PTC	ND	ND	ND
26, 27	RDEB-sev gen	-/+ ^c	Ex 3	c.325insCG	PTC	IVS 24	c.3277-1G>C	PTC
28	RDEB-O	+	Ex 80	c.6527insC	PTC	IVS 92	c.710+5G>A	IF exon skipping
29	RDEB-O	ND	Ex 80	c.6527insC	PTC	Ex 36	c.4147G>A	p.G1383R
30	RDEB-O	+	Ex 80	c.6527insC	PTC	Ex 95	c.7300G>A	p.G2434R
31	RDEB-O	+	Ex 5	c.553C>T	p.R185X ^e	IVS 96	c.7380+2T>C	PTC
32	RDEB-O	++	Ex 12	c.1573C>T	p.R525X	Ex 33	c.3995G>A	p.G1332D
33	RDEB-O	+	Ex 74	c.6187C>T	p.R2063W	ND	ND	ND
34	RDEB-O	+	IVS 106	c.7930-1G>C	IF exon skipping	IVS 106	c.7930-1G>C	IF exon skipping
35	RDEB-O	++++	Ex 58	c.5797C>T	p.R1730X	Ex 73	c.6022C>T	p.R2008C
36	RDEB-pt	++	IVS 106	c.7930-1G>C	IF exon skipping	Ex 84	c.6662G>C	p.G2221A
37	RDEB-pt	++	Ex 101	c.7559G>T	p.G2520V	Ex 110	c.8209G>C	p.G2737R
38	RDEB-ac	+++	Ex 80	c.6527insC	PTC	Ex 63	c.5440C>T	p.R1814C
39	RDEB-ac	++	Ex 117	c.8717delC	DTC	IVS 111	c.8304+1G>A	IF exon skipping/PTC
40	RDEB-ac	+++	Ex 105	c.7864delC	PTC	ND	ND	ND
41	RDEB-i	++	Ex 5	c.553C>T	p.R185X ^e	Ex 105	c.7864C>T	p.R2622W
42, 43	DDEB-gen	+	Ex 74	c.6182G>T	p.G2061V			
44-47	DDEB-ac	+++	Ex 73	c.6127G>A	p.G2043R			
48, 49	DDEB-na	++	Ex 73	c.6034G>A	p.G2012S			

Tabla 3: Tabla publicada en *British Journal of Dermatology*. Mutation1/Mutation2 (Mutaciones 1 y 2 de cada paciente); Patients (Pacientes, numerados del 1 al 49); Clinical Diagnosis (Diagnóstico Clínico de cada paciente). Los pacientes 1-27 tienen EBDR-sev gen (*RDEB-sev gen*), pacientes 28-35 tienen EBDR-O (*RDEB-O*), pacientes 36 y 37 tienen EBDR-pt (*RDEB-pt*), pacientes 38-40 tienen EBDR-ac (*RDEB-ac*), paciente 41 tiene EBDR-i (*RDEB-i*), pacientes 42 y 43 tienen EBDD-gen (*DDEB-gen*), pacientes 44-47 tienen EBDD-ac (*DDEB-ac*) y pacientes 48 y 49 tienen EBDD-na (*DDEB-na*). COL7A1 IFM (Intensidad de la tinción del mapeo por Inmunofluorescencia (anticuerpo monoclonal LH7.2)). ++++normal, +++ligeramente reducida, ++reducida, +muy reducida, -ausente, ND (no determinado). Region (Región del gen donde se sitúa la mutación); cDNA (mutación nomenclatura según la secuencia NM000094); Protein/consequence (consecuencia de la proteína, nomenclatura según secuencia NG007065) DTC, del inglés *delayed termination codon* (codon de terminación retrasado), IF del inglés *in frame* (en marco) *exon splicing* (zona de empalme del exón) (Escamez et al. 2010).



5.2. Identificación de una mutación altamente recurrente: c.6527insC

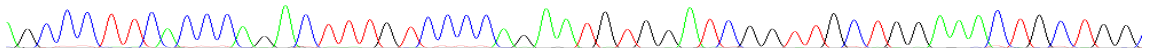
En la cohorte de pacientes españoles, se encontró la mutación c.6527insC (NM_000094.3:c. 6527_6528insC) con una frecuencia alélica inusualmente elevada, habiéndose identificado inicialmente en el 46.3 % de los alelos analizados (12 pacientes homocigotos y 14 heterocigotos para la mutación (Escamez et al. 2010).

Los pacientes portadores de la mutación c.6527insC en homocigosis presentan el fenotipo EBDR-sev gen. El rango de edad está comprendido entre 1 mes y 30 años lo que ayudó a observar la progresión de la enfermedad en estos pacientes (figura 8).



Figura 8: Características clínicas de los pacientes con EBDR con la mutación c.6527insC en el exón 80 en Homocigosis. Las fotos representan a estos pacientes a diferentes edades. Un mes (paciente 1), 2-5 años (paciente 3), 5 años (paciente 4), 21 años (paciente 9) y 30 años (paciente 12). (a) Todos los pacientes muestran un fenotipo severo generalizado desde que nacen y se va agravando con la edad. Presentan heridas y úlceras frecuentes sobre todo en la espalda y extremidades. (b) Poco después del nacimiento, la mucosa oral se ve afectada por erosiones y ampollas que cicatrizan con fibrosis y dan lugar a microstomía. Comienzan con contracturas en los dedos y acaban con una completa pseudosindactilia en manos y pies. En el caso del paciente de 21 años de edad puede observarse en la foto que mediante operaciones consecutivas se consiguió demorar la pseudosindactilia (Escamez et al. 2010).

Introducción



En todos ellos, la enfermedad estuvo presente desde el nacimiento y fue caracterizada por ampollas localizadas que progresaron difundiéndose por el resto de la piel afectando a las mucosas dentro de los primeros meses de vida y dando lugar también a la pérdida gradual de uñas distróficas, desarrollando pseudosindactilia en pies y manos, microstomía, retraso en el crecimiento, anemia durante la primera década y pérdida de dientes, a menudo al principio de la segunda década de vida (figura 8).

Dos de los pacientes que muestran la inserción c.6527insC en heterocigosis, tienen el fenotipo EBDR-sev gen ya la segunda mutación que expresan da lugar a un PTC. El resto de pacientes heterocigotos para la inserción c.6527insC, muestran un amplio rango de fenotipos por la combinación de este PTC con mutaciones de cambio de aminoácido o intrónicas (tabla 5).

La mutación, c.6527insC (NM_000094.3:c. 6527_6528insC), está situada en el exón 80 del gen *COL7A1*. En la posición 6527 de la secuencia codificante se inserta una Citosina (C) (figura 9 y 10). Esto provoca un desfase de lectura que 337 pares de bases (pb) más adelante da lugar a un PTC, a la altura del exón 87. En la secuencia silvestre (WT, del inglés *Wild Type*) aparece un triplete TGA (Timina, Guanina, Adenina) y en la secuencia mutada un codón de parada, un TAA (Timina, Adenina, Adenina) (figura 9).

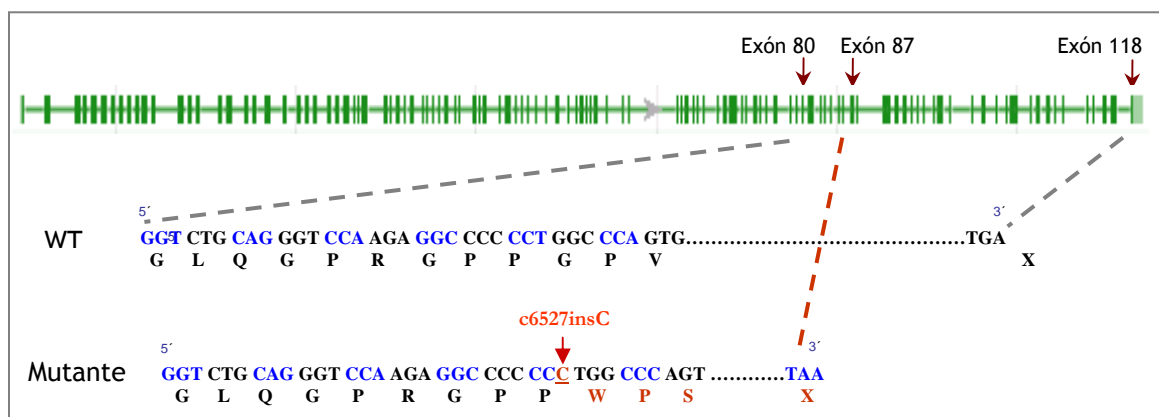
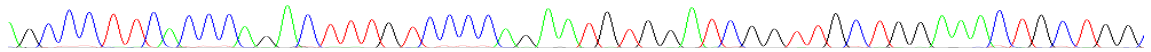


Figura 9: Posición de la mutación c.6527insC en el cromosoma 3 y en el gen *COL7A1*. La inserción de una C provoca un cambio de lectura y un codón de parada 337 pb después. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1294>).

Introducción



Esta mutación da lugar a un ARN truncado que posiblemente se degrade antes de salir del núcleo, por lo que conlleva la ausencia de la proteína Col VII. Cuando esta mutación está en homocigosis da lugar a los fenotipos más agresivos de la enfermedad (EBDR-sev gen).

En los casos homocigotos para la inserción, mediante el mapeo antigénico fluorescente puede observarse ausencia total de Col VII en la ampolla y en los casos heterocigotos podría verse algo de proteína o ausencia total dependiendo de la segunda mutación (figura 10).

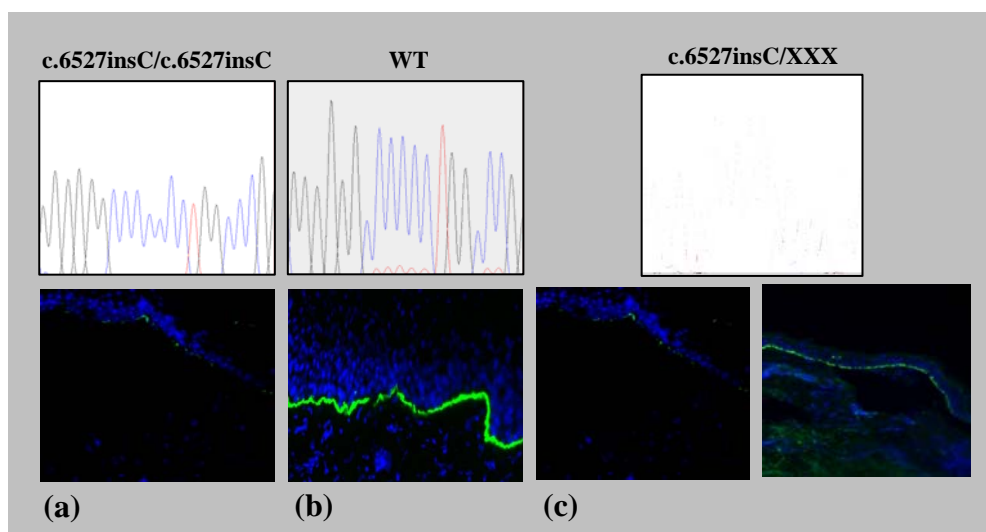
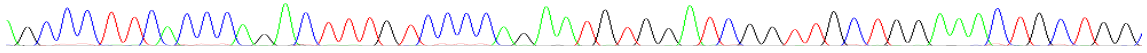


Figura 10: (a) Fragmento de la secuencia genómica del gen COL7A1 (exón 80) de un paciente con la inserción c.6527insC en homocigosis y la inmunofluorescencia con ausencia total de Col VII. (b) Fragmento de la secuencia WT e inmunofluorescencia con presencia de Col VII. (c) Fragmento de la secuencia genómica de un paciente con la c.6527insC en heterocigosis. Si la mutación presente en el otro alelo es un PTC, en la inmunofluorescencia se observa ausencia total de proteína. Si la mutación presente en el otro alelo no da lugar a un PTC, podría observarse tan solo la presencia de col VII disminuido. xxx representa la segunda mutación del paciente.

6. Mutaciones recurrentes y genética de poblaciones

La alta recurrencia de una mutación puntual en una población determinada puede ser resultado de un punto caliente en el gen o del efecto fundador de una mutación con origen común.

Un punto caliente en el genoma puede ser un dinucleótidos CpG en el cual, por desaminación, la citosina metilada da lugar a un cambio de base (Lewin 2001) o puede ser una región del ADN con una inusual y alta tasa de recombinación (Strachan



and Read 2004). Estas zonas hipermutables del ADN (8.5 veces mayor que el resto de dinucleótidos) (Cooper and Youssoufian 1988), se presentan con una frecuencia alta en la población.

Cuando en una población determinada, la incidencia de una mutación es muy elevada pero no está situada en una zona hipermutable del ADN, se puede plantear la hipótesis de un posible efecto fundador (Colombo 2007).

Para estudiar el posible efecto fundador de un evento mutacional se realizan estudios poblacionales que conllevan el análisis de haplotipos mediante marcadores moleculares filogenéticos.

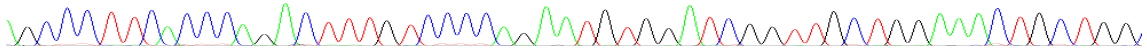
6.1. Variabilidad y asociación genética

6.1.1. Polimorfismos como marcadores genéticos

Una de las contribuciones más importantes de la secuenciación del genoma humano ha sido la caracterización e identificación de cientos de miles de locus polimórficos distribuidos a lo largo de los 3250 millones de nucleótidos que constituyen nuestro genoma. La coexistencia de múltiples alelos en un locus recibe el nombre de polimorfismo genético (Lewin 2001). Se ha estimado que hay una variante polimórfica por cada 1000 pb dentro del genoma humano (Iniesta R 2005).

Los polimorfismos genéticos son variantes del genoma que aparecen por mutaciones en algunos individuos, se transmiten a la descendencia y adquieren cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones. Se considera polimorfismo cuando aparece al menos en el 1 % de los cromosomas de una población (Consortium 2004). Estas variantes pueden estar localizadas en regiones codificantes o reguladoras de un gen o bien localizarse en regiones intergénicas. Puede consistir en la sustitución de una sola base nitrogenada (SNP) o puede ser más complicado, por ejemplo, la repetición de una secuencia determinada de ADN, donde los individuos pueden tener diferencias en el número de copias de una determinada secuencia (microsatélites y minisatélites).

Introducción



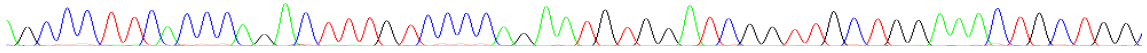
Los polimorfismos son la base de la evolución y los que se consolidan, bien pueden ser silenciosos, proporcionar ventajas a los individuos, o contribuir a causar enfermedades (Guttmacher and Collins 2002). El término polimorfismo describe la existencia en una población, de genomas con diferentes combinaciones alélicas. El polimorfismo puede ponerse de manifiesto produciendo diferentes fenotipos. Existen polimorfismos silenciosos, donde hay un cambio en el ADN que no produce ningún cambio en el aminoácido y polimorfismos no silenciosos, donde si hay un cambio de aminoácido. Los polimorfismos no se consideran patogénicos, pero a veces están relacionados con susceptibilidad genética y con variabilidad fenotípica.

Los polimorfismos más frecuentes son los SNPs. Estos polimorfismos son ampliamente utilizados en genética humana como marcadores genéticos, funcionando como señaladotes de diferentes regiones del genoma.

Se considera marcador genético a un polimorfismo en el ADN con una ubicación física identificable en un cromosoma y cuya herencia se puede rastrear. Dado que los segmentos del ADN que se encuentran contiguos en un cromosoma tienden a heredarse juntos, los marcadores se utilizan a menudo como formas indirectas de rastrear el patrón hereditario de un gen.

Para realizar estudios de asociación, los marcadores más utilizados son los SNPs por su baja tasa mutacional (10^{-8}), conservación y por tanto, herencia de forma estable. Dichos marcadores deben cumplir el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) en la muestra control (como representantes de la población general) (Iniesta R 2005). Para que se cumpla este equilibrio, la distribución de los genotipos depende del producto de las probabilidades alélicas, manteniendo una distribución independiente a factores de interpretación o genéticos (consanguinidad o asociación a una mutación o enfermedad).

Otros marcadores usados para estudios poblacionales son los microsatélites. Estos marcadores se consideran más informativos que los SNPs ya que, estas secuencias cortas repetidas en tandem, varían su número de repeticiones con mayor frecuencia entre individuos. Los SNPs, al solo poseer dos opciones, se consideran menos informativos, pero esto se suple por su amplia y uniforme distribución a lo largo del genoma (Kennedy et al. 2003). Los microsatélites tienen una tasa mutacional



más alta que los hace menos estables a lo largo del tiempo, lo que no los hace útiles para los estudios poblacionales que suelen incluir periodos de tiempo muy amplios. Además, el genotipo del SNP es más fácilmente automatizado, eficiente y con una baja tasa de error (Xing et al. 2005).

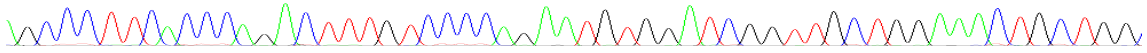
6.1.2. Haplotipos y Desequilibrio de Ligamiento (LD)

Para realizar estudios de asociación, se deben seleccionar un conjunto de SNPs. Estos marcadores deben mantener cierto grado de vinculación entre ellos denominado desequilibrio de ligamiento (LD, del inglés *linkage disequilibrium*). SNPs altamente asociados conocidos como tag SNPs (SNPs marcador) y por tanto con un alto LD se transmiten en bloque de generación en generación. Esta transmisión en bloque permite realizar estudios evolutivos a través de su herencia y asociación a una mutación o patología (Iniesta R 2005).

Un haplotipo es la constitución alélica de marcadores genéticos para un mismo cromosoma. Dada la alta variabilidad alélica en el genoma humano, la probabilidad de que dos individuos no relacionados presenten un mismo haplotipo, es prácticamente nula. Es por esto que el estudio de haplotipos se ha convertido en una herramienta útil en la determinación de relación génica entre individuos, y por lo tanto en el estudio del origen de mutaciones causantes de diversas enfermedades.

De este modo, podemos decir que una mutación dada, presente en dos individuos aparentemente no relacionados entre sí, tiene un origen común si al realizar un estudio de haplotipos, el haplotipo relacionado con la mutación en uno de los individuos es igual al haplotipo relacionado con la mutación en el otro individuo.

Mediante estos estudios se ha demostrado que los SNPs se heredan en grupos (estrechamente relacionados en el ADN), contrariamente a la tesis sostenida con anterioridad, en la que se planteaba la segregación al azar debido a la recombinación genética (Falconer and Mackay 1996).



mismos. Igualmente, cuanto mayor sea el tiempo de aparición de dos polimorfismos más alta será la frecuencia de recombinación entre ambos y menor el valor de LD (Falconer and Mackay 1996). Sin embargo, Se han observado regiones en el genoma con una frecuencia de recombiación muy baja, en las cuales no se cumplen estas premisas.

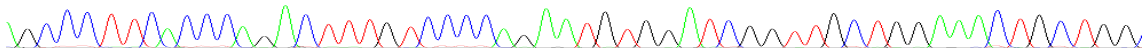
Las primeras se corresponden con segmentos de ADN de 1 a 2 Kb conocidas como puntos calientes de recombinación en las cuales se han descrito secuencias específicas a nivel de ADN, que favorecen la recombinación. Dichos puntos calientes están separados por regiones comparativamente más extensas que presentan una baja actividad recombinatoria. Los marcadores situados en dichas regiones presentan un alto LD y definen bloques de secuencia cromosómica con un tamaño medio de 50 Kb que se heredan de forma conjunta (Jeffreys, Kauppi and Neumann 2001). Puesto que la recombinación se produce en los límites de cada bloque, la frecuencia de recombinación y por tanto la diversidad de haplotipos dentro de un bloque es muy baja.

6.1.3. Herramientas bioinformáticas: Proyecto-HapMap y Haploview

Proyecto Hapmap

Es un proyecto internacional que se inició en el año 2002 en el cual colaboran diferentes países para identificar y catalogar similitudes y diferencias genéticas en las poblaciones humanas. El objetivo final del HapMap es proporcionar un recurso público para la investigación genética médica mediante el desarrollo de un mapa de haplotipos detallado del genoma humano que describe los patrones comunes de la variación genética (Hap-Map-Proyect) (<http://www.hapmap.org/>)

El desarrollo de esta gran base de datos es muy útil para la búsqueda de polimorfismos genéticos, el estudio de ligamiento entre ellos y el conocimiento de su variabilidad alélica entre diferentes poblaciones. En el proyecto se han analizados SNPs en diferentes poblaciones ancestrales para el conocimiento de su distribución y frecuencia en el mundo.



Haploview

El haploview es un programa informático que proporciona un conjunto completo de herramientas para el análisis de haplotipos de una amplia variedad de tamaños de datos. El haploview genera estadísticas de marcadores de calidad, información de los patrones de LD, bloques de haplotipos de la población de datos, sus frecuencias alélicas en diferentes poblaciones ancestrales, etc. Las características dadas son personalizables y todos los cálculos son a tiempo real (Barrett et al. 2005) (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) (Haploview-Program). Este programa puede usar datos de polimorfismos volcados en el proyecto hapmap, analizando la zonas del genoma y poblaciones humanas seleccionadas. Es una herramienta muy útil para la formación de bloques de tag SNPs para la construcción de haplotipos estables.

Para estudiar la transmisión de un bloque de una generación a la siguiente no es necesario caracterizar todas las variantes polimórficas presentes en dicho bloque, sino que solo con la caracterización de unas cuantas será posible capturar toda la variabilidad (representada como r^2) (figura 10).

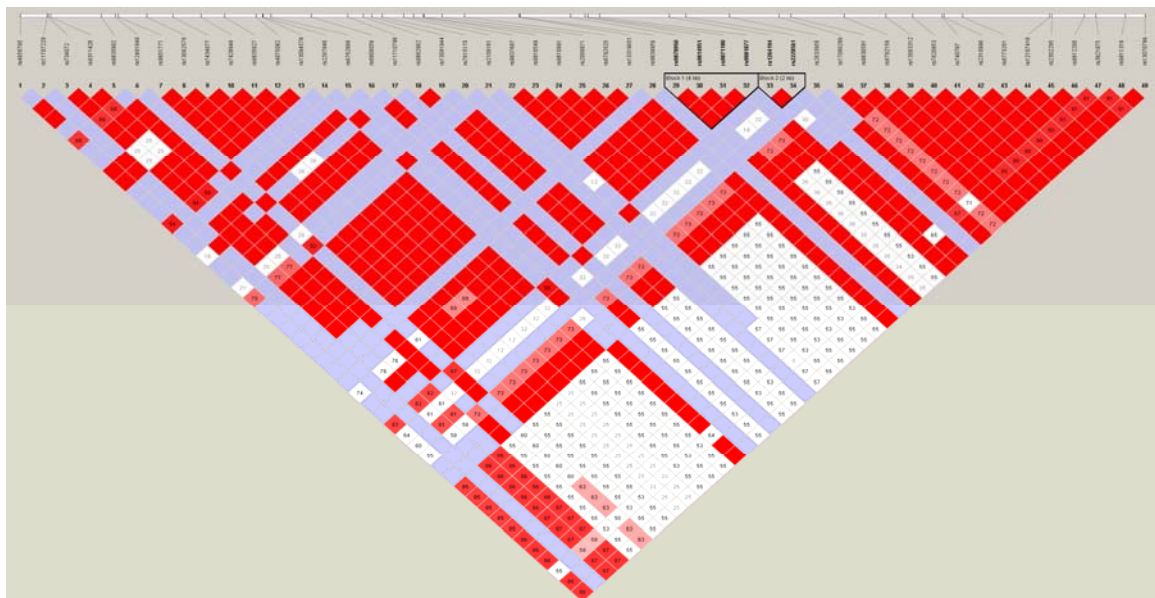
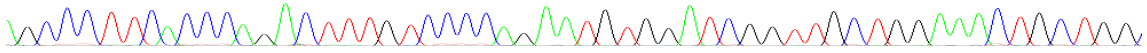


Figura 11: Representación de los bloques de tagSNPs en el programa haploview. Los rombos rojos muestran un alto LD entre SNPs y los rombos blancos un bajo LD entre SNPs. Pueden observarse grandes bloques rojos de SNPs que se heredan juntos (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) (Haploview-Program).



6.2. Estimación de la edad genética

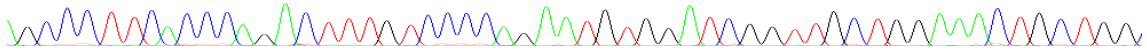
La edad de una mutación puede estimarse a través del estudio del LD de polimorfismos intragénicos o flanqueantes, debido a la recombinación y mutación y desde la frecuencia de la mutación en sí como de una consecuencia de la deriva genética. Existen varios métodos y los resultados de sus aplicaciones se pueden combinar con datos poblacionales para proporcionar una visión crítica sobre el origen y la historia natural de la mutación (Colombo 2007).

Se puede estimar la edad alélica mediante recombinación y mutación a partir del análisis de la decadencia exponencial a lo largo del tiempo del LD entre el alelo mutante y uno o más polimorfismos adyacentes y desde la frecuencia de la mutación en sí. Ambos enfoques se basan en la historia demográfica de la población en la que la mutación fue introducida y se extendió en presencia de la selección natural (Colombo 2007).

6.2.1. Estimación de la edad del ancestro común más reciente

La presencia de una asociación no aleatoria entre una mutación y polimorfismos cerca del locus, indica una historia genética compartida y se puede utilizar para estimar la edad de la mutación (Lander and Botstein 1986). El principio que rige este enfoque es simple y se llama reloj genético (Labuda, Zietkiewicz and Labuda 1997).

El método de Risch para el cálculo de edades genéticas es el método basado en este reloj genético $\ln P = -\sigma_g$, relativo al tiempo en generaciones, hasta el ancestro común más reciente de cromosomas mutados, la frecuencia de recombinación entre la mutación y los marcadores (σ) y la probabilidad de que los alelos marcados en un cromosoma enfermo esté en uno ancestral. Una estimación no sesgada del alelo ancestral es la proporción de haplotipos observados que son ancestrales (Risch et al. 1995). Al cálculo mediante el método de Risch, debe introducirse una corrección que tenga en cuenta el tiempo de crecimiento de la población que alberga la mutación. Esta corrección se lleva a cabo mediante el modelo de Luria y Delbrück (Luria and Delbruck 1943) (Labuda et al. 1996).



6.2.2. Estimación de la edad del primer evento mutacional

Existen otros métodos que utilizan el mapeo del LD a fina escala para una mutación patogénica, usando marcadores como los tag SNPs o microsatélites e incorporando información de una secuencia genómica conocida y desde una base de datos de mutaciones. Estos métodos tienen en cuenta los efectos demográficos poblacionales utilizando el método de Monte Carlo basado en las cadenas de Markov (MCMC, del inglés *Monte Carlo Markov Chain*) (Rannala and Reeve 2001). Estos métodos estiman la edad alélica mediante la información de la variación de los marcadores genéticos asociados (tag SNPs por ejemplo) y la frecuencia poblacional de la mutación (Slatkin and Rannala 2000), (Slatkin and Rannala 1997).

DMLE+

Rannala y Slatkin (Rannala and Slatkin 1998) usaron un proceso de nacimiento-muerte en tiempo continuo para desarrollar una probabilidad para la distribución de la coalescencia intra-alélica para una mutación de una enfermedad rara. Este método estima el momento en que la mutación se originó, que podría ser sustancialmente mayor que el momento del último evento de coalescencia. En el artículo de (Rannala and Reeve 2001) fue extendido al mapeo de múltiples puntos de LD mediante el cálculo de las transmisiones entre haplotipos marcadores, dada la posición del locus de la enfermedad. El método de MCMC fue usado para estimar la función de probabilidad, en la secuencia del árbol de topología y los tiempos de coalescencia, el haplotipo en que la mutación surgió, la posición del locus y los haplotipos ancestrales. El muestreo de probabilidad puede ser utilizado para estimar los parámetros de interés. El programa para aplicar este modelo de datación es el que se conoce como DMLE+ (Greenwood et al. 2010).

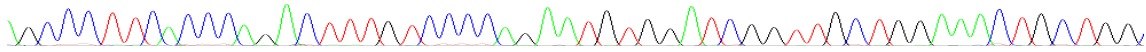
BDMC21

Otro programa para el cálculo de la edad alélica es el BDMC21. Éste calcula una estimación de máxima probabilidad del tiempo en el que una única mutación surgió por primera vez en una población observando el patrón de cambios en marcadores que están completamente ligados a la mutación (<http://www.rannala.com/bdmc21>) (Bdmc21).



OBJETIVOS

Objetivos



OBJETIVOS

La identificación, en un contexto de enfermedad rara, de una frecuencia elevada de pedigrís que expresan la mutación c.6527insC (NM_000094.3:c. 6527_6528insC), plantea si el origen de esta recurrencia es debido a un efecto fundador, o es resultado de un punto caliente mutacional. Por ello se proponen los siguientes objetivos:

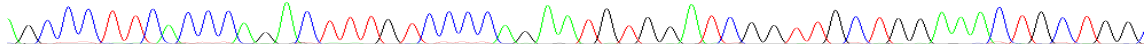
- 1- Analizar la distribución geográfica de la mutación c.6527insC en la Península Ibérica para determinar un posible punto de origen.
- 2- Caracterizar variantes polimórficas y estructura del desequilibrio de ligamiento (LD) de la región intragénica del gen *COL7A1* en la cohorte de pacientes y en la población general española.
- 3- Identificar haplotipos intragénicos del gen *COL7A1* y analizar la segregación haplotípica de los cromosomas portadores de la mutación c.6527insC, para determinar su posible origen común.

Tras confirmar el efecto fundador presente en los alelos portadores de la mutación c.6527insC, se considera investigar el origen y la historia de dicha mutación para analizar su situación actual. Para ello se plantean los siguientes objetivos:

- 4- Construir y analizar haplotipos extragénicos al gen *COL7A1* en alelos portadores de la mutación c.6527insC para determinar su evolución genética a lo largo del tiempo.
- 5- Estimar la datación del primer evento mutacional y el ancestro común más reciente de los cromosomas portadores de la mutación c.6527insC para rastrear su origen y esclarecer las frecuencias alélicas actuales.

MATERIALES Y MÉTODOS





MATERIAL Y MÉTODOS

1. Pacientes

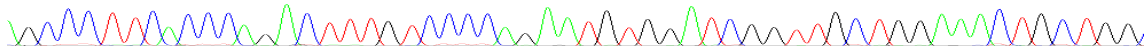
En el presente trabajo se estudiaron un total de 50 pacientes de origen español con EBD, así como sus progenitores. Los pacientes fueron reclutados de diferentes hospitales de toda España. De cada paciente se obtuvo un formulario de petición para el estudio genético junto con el consentimiento informado para la participación en el estudio (Anexo I). Se solicitó además rellenar una ficha clínica al médico de referencia (Anexo II) donde se recoge detalladamente a través de un cuestionario específico la historia familiar, médica y examen físico del paciente.

El estudio genético de estos pacientes se realizó en la Unidad de Medicina Regenerativa del Departamento de Investigación Básica del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT-U714 del CIBERER) bajo la supervisión de la Doctora Marcela del Río, directora de esta tesis e Investigadora Principal de los proyectos de Investigación SAF2007-61019 y SAF2010-16976, que abarcan estos estudios. El consejo genético se llevó a cabo en diferentes servicios de Genética pertenecientes al Sistema Nacional de Salud, incluyendo principalmente el servicio de Genética de la Fundación Jimenez Díaz (CIBERER-U704). De los 50 casos estudiados, 11 son portadores la mutación c.6527insC en ambos alelos y 17 la expresan de heterocigosis combinada con otras mutaciones en el otro alelo. Todos estos pacientes expresan una forma recesiva de EBD. Veintidós pacientes no son portadores de la mutación c.6527insC, expresan otras mutaciones en el gen *COL7A1*. De estos 22, 19 pacientes presentan una forma recesiva de EBD y 3 una forma dominante. (Tabla 3).

2. Población control

Para el análisis de la región intragénica del gen *COL7A1* se incorporó al estudio el ADN de un total de 93 individuos sanos cedidos por el servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid. Para el análisis de la región extragénica a *COL7A1* se analizaron 50 tríos de ADN formados por padre, madre e hijo. Este material genético fue donado por el Banco Nacional de ADN (Universidad de Salamanca, España. <http://www.bancoadn.org>). (Tabla 4).

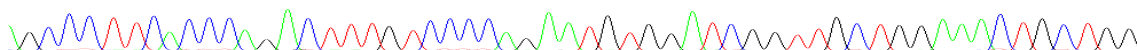
Materiales y Métodos



Númeroación Pacientes	Diagnóstico Clínico	Mutación en el gen COL7A1	
		Mutación 1	Mutación 2
11 (p1-p11)	EBDR-sev gen	c.6527insC	c.6527insC
1 (p12)	EBDR-sev gen	c.6527insC	p.Y112X
1 (p13)	EBDR-sev gen	c.6527insC	ND
1(p14)	EBDR-sev gen	c.6527insC	c.58del13
1 (p15)	EBDR-sev gen	c.6527insC	p.G2224X
2 (p16,p17)	EBDR-sev gen	c.6527insC	c.5131insCTCAC
1 (p18)	EBDR-sev gen	c.6527insC	p.G2366D
1 (p19)	EBDR-sev gen	c.6527insC	p.G2587D
1 (p20)	EBDR-sev gen	c.6527insC	ND
1 (p21)	EBDR-sev gen	c.6527insC	p.R525X
1 (p22)	EBDR-sev gen	c.6527insC	c.7929+2T>C
1 (p23)	EBDR-O	c.6527insC	p.G2434R
1 (p24)	EBDR-O	c.6527insC	p.G1383R
1 (p25)	EBDR-O	c.6527insC	c.7104+5G>A
1 (p26)	EBDR-ac	c.6527insC	p.R1814C
1 (p27)	EBDR-Pt	c.6527insC	p.G2114D
1(p28)	EBDR--sg	c.6527insC	p.R1683X
1 (p29)	EBDR-sev gen	c.7756 insC	ND
1 (p30)	EBDR-sev gen	c.267-3C>G	c.267-3C>G
2 (p31,p32)	EBDR-sev gen	c.325insGC	c.3277-1G>C
1 (p33)	EBDR-sev gen	p.Y1098X	p.Y1098X
1 (p34)	EBDR-sev gen	p.G2722V	ND
1 (p35)	EBDR-I	p.R185X	p.R2622W
1 (p36)	EBDR-O	c.7420A>G	c.5576delAA
1 (p37)	EBDR-O	p.R2808C	p.R1730X
1 (p38)	EBDR-O	p.R185X	c.7380+2T>C
1 (p39)	EBDR-O	p.G1338R	c.4401+1G>A
1 (p40)	EBDR-O	p.R525X	p.G1332D
1 (p41)	EBDR-O	c.7930-1G>C	c.7930-1G>C
1 (p42)	EBDR-O	p.R2063W	ND
1 (p43)	EBDR-Pt	p.G2520V	p.G2737X
1 (p44)	EBDR-Pt	c.G2221A	c.7930-1G>C
1 (p45)	EBDR-ac	c.8717delC	c.8304+1G>A
1 (p46)	EBDR-ac	c.2781insACGAC	p.R2424W
1 (p47)	EBDR-sev gen	ND	ND
1 (p48)	EBD-Pr	p.G1791E	WT
2 (p49,p50)	EBDD-gen	p.G2061V	WT

Tabla 4: Pacientes con EBD incorporados a este estudio, su diagnóstico clínico y las mutaciones en *COL7A1* que muestran en cada alelo.

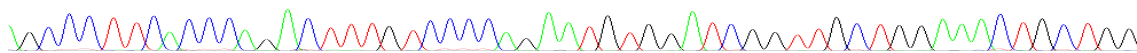
Materiales y Métodos



TRIO	Edad	Sexo	Año nacimiento
Trio01Ch	32	Mujer	1978
Trio01Fa	63	Hombre	1947
Trio01Mo	53	Mujer	1956
Trio02Ch	48	Mujer	1961
Trio02Fa	85	Hombre	1924
Trio02Mo	78	Mujer	1931
Trio03Ch	21	Hombre	1987
Trio03Fa	49	Hombre	1960
Trio03Mo	49	Mujer	1960
Trio04Ch	29	Hombre	1980
Trio04Fa	55	Hombre	1954
Trio04Mo	49	Mujer	1960
Trio05Ch	26	Hombre	1983
Trio05Fa	56	Hombre	1953
Trio05Mo	59	Mujer	1949
Trio06Ch	21	Mujer	1988
Trio06Fa	50	Hombre	1959
Trio06Mo	50	Mujer	1959
Trio07Ch	28	Mujer	1981
Trio07Fa	53	Hombre	1956
Trio07Mo	53	Mujer	1956
Trio08Ch	25	Mujer	1984
Trio08Fa	60	Hombre	1949
Trio08Mo	55	Mujer	1954
Trio09Ch	24	Mujer	1984
Trio09Fa	54	Hombre	1955
Trio09Mo	49	Mujer	1960
Trio10Ch	34	Hombre	1974
Trio10Fa	63	Hombre	1941
Trio10Mo	64	Mujer	1945
Trio11Ch	24	Hombre	1985
Trio11Fa	56	Hombre	1953
Trio11Mo	49	Mujer	1959
Trio12Ch	19	Hombre	1990
Trio12Fa	50	Hombre	1959
Trio12Mo	45	Mujer	1964

TRIO	Edad	Sexo	Año nacimiento
Trio13Ch	29	Hombre	1980
Trio13Fa	58	Hombre	1951
Trio13Mo	57	Mujer	1952
Trio14Ch	38	Hombre	1971
Trio14Fa	64	Hombre	1944
Trio14Mo	65	Mujer	1944
Trio15Ch	26	Mujer	1983
Trio15Fa	60	Hombre	1949
Trio15Mo	56	Mujer	1952
Trio16Ch	25	Hombre	1984
Trio16Fa	51	Hombre	1957
Trio16Mo	53	Mujer	1956
Trio17Ch	40	Hombre	1969
Trio17Fa	79	Hombre	1930
Trio17Mo	71	Mujer	1938
Trio18Ch	25	Hombre	1984
Trio18Fa	66	Hombre	1943
Trio18Mo	60	Mujer	1949
Trio19Ch	25	Mujer	1983
Trio19Fa	54	Hombre	1955
Trio19Mo	53	Mujer	1956
Trio20Ch	19	Hombre	1989
Trio20Fa	55	Hombre	1954
Trio20Mo	50	Mujer	1958
Trio21Ch	43	Mujer	1966
Trio21Fa	75	Hombre	1934
Trio21Mo	76	Mujer	1933
Trio22Ch	36	Mujer	1972
Trio22Fa	79	Hombre	1930
Trio22Mo	79	Mujer	1930
Trio23Ch	19	Hombre	1990
Trio23Fa	47	Hombre	1962
Trio23Mo	44	Mujer	1965
Trio24Ch	26	Hombre	1982
Trio24Fa	53	Hombre	1956
Trio24Mo	50	Mujer	1959

Materiales y Métodos



TRIO	Edad	Sexo	Año nacimiento
Trio25Ch	29	Mujer	1980
Trio25Fa	58	Hombre	1951
Trio25Mo	58	Mujer	1950
Trio26Ch	33	Hombre	1976
Trio26Fa	59	Hombre	1950
Trio26Mo	58	Mujer	1952
Trio27Ch	19	Hombre	1989
Trio27Fa	49	Hombre	1959
Trio27Mo	42	Mujer	1967
Trio28Ch	37	Hombre	1971
Trio28Fa	68	Hombre	1941
Trio28Mo	66	Mujer	1943
Trio29Ch	28	Hombre	1981
Trio29Fa	48	Hombre	1961
Trio29Mo	44	Mujer	1965
Trio30Ch	28	Mujer	1981
Trio30Fa	61	Hombre	1948
Trio30Mo	56	Mujer	1953
Trio31Ch	19	Mujer	1990
Trio31Fa	45	Hombre	1963
Trio31Mo	44	Mujer	1965
Trio32Ch	30	Hombre	1979
Trio32Fa	56	Hombre	1953
Trio32Mo	54	Mujer	1955
Trio33Ch	29	Mujer	1979
Trio33Fa	55	Hombre	1954
Trio33Mo	54	Mujer	1955
Trio34Ch	32	Mujer	1977
Trio34Fa	61	Hombre	1948
Trio34Mo	59	Mujer	1950
Trio35Ch	35	Mujer	1974
Trio35Fa	67	Hombre	1942
Trio35Mo	65	Mujer	1944
Trio36Ch	36	Hombre	1973
Trio36Fa	62	Hombre	1946
Trio36Mo	63	Mujer	1945
Trio37Ch	30	Hombre	1979
Trio37Fa	63	Hombre	1946
Trio37Mo	64	Mujer	1945

TRIO	Edad	Sexo	Año nacimiento
Trio38Ch	40	Hombre	1969
Trio38Fa	72	Hombre	1937
Trio38Mo	67	Mujer	1942
Trio39Ch	33	Hombre	1976
Trio39Fa	53	Hombre	1956
Trio39Mo	51	Mujer	1959
Trio40Ch	30	Mujer	1979
Trio40Fa	59	Hombre	1950
Trio40Mo	55	Mujer	1954
Trio41Ch	21	Mujer	1988
Trio41Fa	51	Hombre	1958
Trio41Mo	48	Mujer	1961
Trio42Ch	27	Hombre	1981
Trio42Fa	54	Hombre	1954
Trio42Mo	54	Mujer	1956
Trio43Ch	25	Hombre	1984
Trio43Fa	51	Hombre	1958
Trio43Mo	51	Mujer	1958
Trio44Ch	29	Mujer	1979
Trio44Fa	61	Hombre	1948
Trio44Mo	56	Mujer	1952
Trio45Ch	38	Mujer	1971
Trio45Fa	66	Hombre	1943
Trio45Mo	64	Mujer	1945
Trio46Ch	28	Mujer	1981
Trio46Fa	55	Hombre	1954
Trio46Mo	54	Mujer	1956
Trio47Ch	23	Hombre	1987
Trio47Fa	50	Hombre	1959
Trio47Mo	47	Mujer	1962
Trio48Ch	25	Hombre	1984
Trio48Fa	53	Hombre	1956
Trio48Mo	52	Mujer	1958
Trio49Ch	40	Hombre	1970
Trio49Fa	64	Hombre	1946
Trio49Mo	65	Mujer	1944
Trio50Ch	38	Mujer	1971
Trio50Fa	76	Hombre	1933
Trio50Mo	67	Mujer	1942

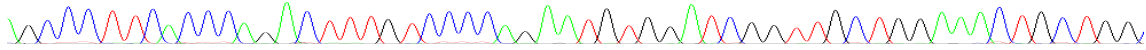


Tabla 5: Población control utilizada para el análisis de la región extragénica al gen *COL7A1*. Numeración por tríos de padre (trío-Nº-Fa), madre (trío-Nº-Mo) e hijo (trío-Nº-Ch).

3. Extracción de ADN

La extracción de ADN en el total de muestras se realizó a partir de sangre total periférica y se utilizó el *kit QIAamp DNA Blood Maxi Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)*.

Siguiendo el protocolo del fabricante, se parte de 2 mililitros (ml) de sangre en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en un tubo de 15 ml. Se añade 200 microlitros (µl) de Proteinasa K (20mg/ml) a cada muestra de sangre. Posteriormente se añade 2.4 ml de tampón AL y se mantiene en baño de agua a 70 grados Centígrados (°C) durante 10 minutos. Se añade 2 ml de etanol 96-100 %, se introduce cada muestra en tubos con columna de membrana de sílice y se centrifuga 3 minutos a 3000 revoluciones por minuto (rpm), 25°C. Se añade 2 ml de tampón AW1 y se centrifuga 1 minuto en las mismas condiciones previas. Se añade 2 ml de tampón AW2 y se vuelve a centrifugar 15 minutos a las mismas condiciones. Finalmente se inserta la columna en un tubo estéril y se añade en ella 300 µl de tampón AE y se centrifuga 5 minutos a 5000 rpm. Este paso se realiza varias veces y se obtiene aproximadamente 30 µg de ADN en 600 µl de tampón AE.

4. Análisis del origen geográfico de la mutación c.6527insC

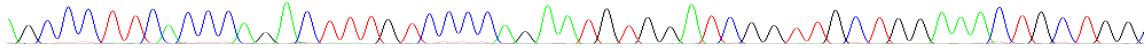
El origen geográfico de la mutación c.6527insC se estableció basándose en la procedencia de dos generaciones anteriores de cada uno de los pacientes portadores de dicha mutación.

5. Selección de SNPs para la construcción de haplotipos

5.1. SNPs intragénicos del gen *COL7A1*

El programa Haploview utiliza SNPs publicados en la base de datos HapMap. Hicimos uso de este programa para realizar una búsqueda de SNPs presentes en población caucásica (HapMap, CEU) entre la bases nucleotídicas 48576 y 48607 del cromosoma 3, zona exacta donde se sitúa el gen *COL7A1* en el genoma humano.

Materiales y Métodos



Los SNPs con un alto LD presentan una alta asociación y baja recombinación entre ellos por lo que viajan en bloque generación tras generación. De ese modo se pudieron formar los bloques que están presentes en el gen *COL7A1*.

Con una variabilidad 1 ($r^2=1$), importante para abarcar todos los posibles haplotipos existentes en la población a analizar y seleccionando los SNPs que presentan un patrón de alto LD entre ellos (tag SNPs), se obtuvieron dos bloques, el primero formado por 4 tag SNPs y el segundo por 2 tag SNPs (Figura 12). Haploview también muestra las frecuencias alélicas de los haplotipos que conforman estos dos bloques de tag SNPs en ancestros caucásicos.

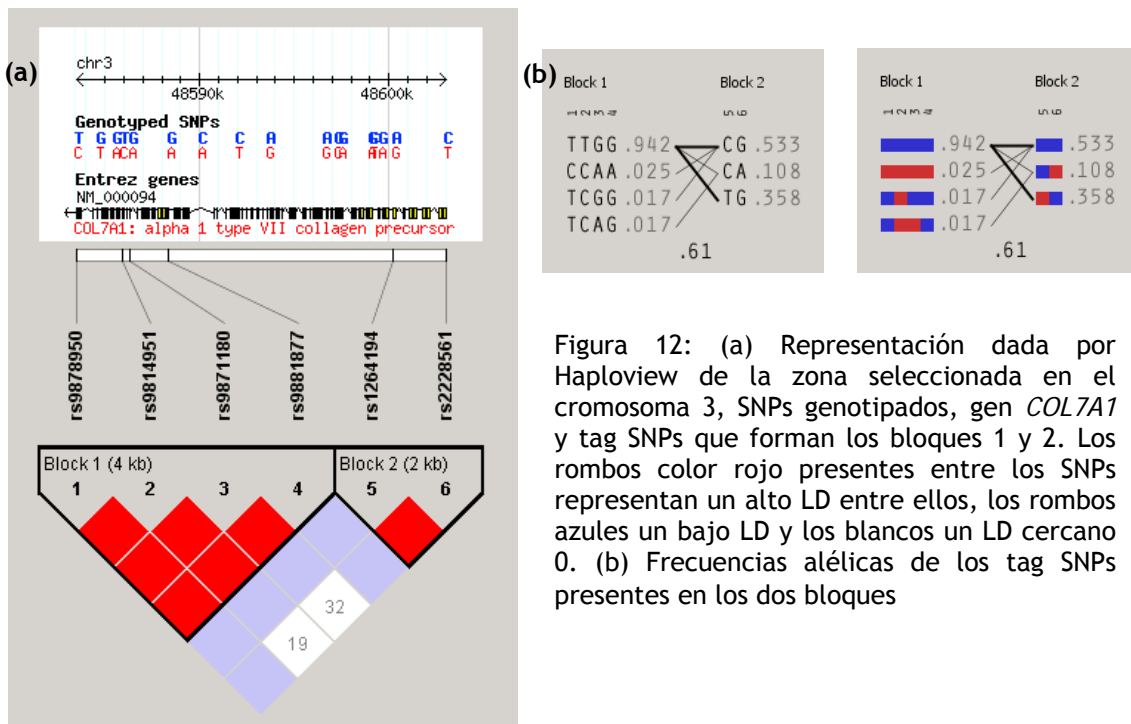
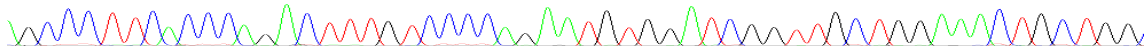


Figura 12: (a) Representación dada por Haploview de la zona seleccionada en el cromosoma 3, SNPs genotipados, gen *COL7A1* y tag SNPs que forman los bloques 1 y 2. Los rombos color rojo presentes entre los SNPs representan un alto LD entre ellos, los rombos azules un bajo LD y los blancos un LD cercano 0. (b) Frecuencias alélicas de los tag SNPs presentes en los dos bloques

Estos 6 tag SNPs seleccionados por el programa Haploview, han sido utilizados para la construcción de haplotipos intragénicos del gen *COL7A1* en nuestra población de estudio.

Además, durante la búsqueda de mutaciones en pacientes diagnosticados con EBD, se observó que tres cambios moleculares intragénicos, NM000094:c.11639C>T, NG007065.1:g.25215C>T y rs2532848 (tabla 6, figura 13) se expresaban en los pacientes con EBD, aparentemente, con frecuencias alélicas diferentes a la de la

Materiales y Métodos



población control. Por este motivo, se incluyeron también dichos SNPs en la construcción de haplotipos intragénicos del gen *COL7A1*.

NG_007065.1:g.11639C>T (inSNP1) y NG007065.1:g.25215C>T (inSNP2) no estaban descritos con anterioridad en la bibliografía científica por lo que para definirlos como polimorfismos, se les estudió su frecuencia alélica en la población general (n°=93 individuos).

Finalmente, para la construcción de haplotipos intragénicos en el gen *COL7A1*, se seleccionaron un total de 9 SNPs (Tabla 6, figura 13).

Nombre SNP	Posición COL7A1	Nomenclatura Ensembl	Nomenclatura NG007065	Nomenclatura NM000094
rs2228561	Exón 13	4672C>T	NG_007065.1:g.9672C>T	NM_000094.3:c.1784C>T
inSNP1	Exón 19	6639C/T	NG_007065.1:g.11639C>T	NM_000094.3:c.2587+28C>T
rs1264194	Exón 21	7420A>G	NG_007065.1:g.12420A>G	NM_000094.3:c.2817A>G
rs9881877	Intrón 70	19290C>T	NG_007065.1:g.24290C>T	NM_000094.3:c.5821-61C>T
inSNP2	Intrón 75	20215:C/T	NG007065.1:g.25215C>T	NM_000094.3:c.6279+26C>T
rs9871180	Intrón 79	21296C>T	NG_007065.1:g.26296C>T	NM_000094.3:c.6502-67C>T
rs9814951	Intrón 82	21761A>G	NG_007065.1:g.26761A>G	NM_000094.3:c.6618+21A>G
rs9878950	Intrón 93	24180A>G	NG_007065.1:g.29180A>G	NM_000094.3:c.7164+28A>G
rs2532848	Intrón 103	26621C>A	NG_007065.1:g.31621C>A	NM_000094.3:c.7759-98C>A

Tabla 6: Relación de SNPs seleccionados para la construcción de haplotipos intragénicos en el gen *COL7A1*

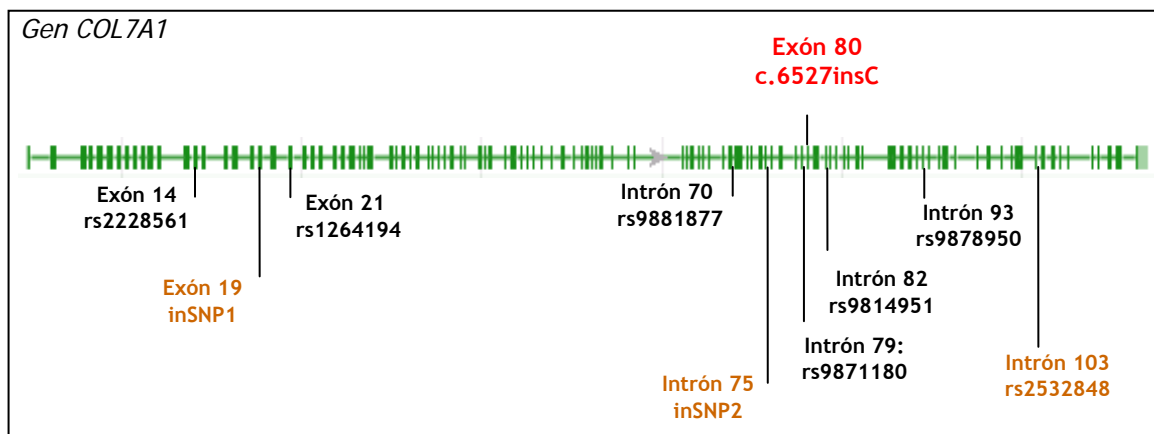
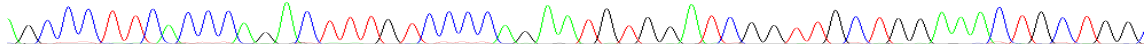


Figura 13: Representación del gen *COL7A1* (*COL7A1-Gene*) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1294>. Distribución y tamaño de sus exones e intrones y posición de la inserción c.6527insC y de los 9 tag SNPs seleccionados para la construcción de haplotipos intragénicos. En rojo se observa la mutación c.6527insC y su posición. En negro, los tag SNPs seleccionados por el programa Haploview y en naranja los incluidos por su posible asociación con la inserción.



5.2. SNPs extragénicos al gen *COL7A1*

Mediante el programa Haploview se realizó una búsqueda de SNPs flanqueantes a *COL7A1* (48576 - 48607) 1 megabase (Mb) hacia el extremo 5', aguas arriba del gen (en inglés, *upstream*) y 1 Mb hacia el extremo 3', aguas abajo del gen (en inglés, *downstream*). Haploview mostró un total de 756 SNPs presentes en ese fragmento de ADN. En la Figura 14 pueden observarse sus posiciones y el LD presente entre ellos.

Con una variabilidad de 1 ($r^2=1$) y seleccionando tan solo los tag SNPs, se logró reducir a un total de 76 SNPs distribuidos a lo largo de las 2 Mb. Mediante el uso de la base de datos del proyecto HapMap se obtuvo la información de las frecuencias alélicas y genotípicas de cada SNP. De los 76, se seleccionaron los 23 tag SNPs (Figura 15) que presentan en la población caucásica una frecuencia homogénea de las tres combinaciones posibles de genotipos y de los dos alelos existentes y se descartaron los demás por no ser considerados polimórficos en nuestra población y por tanto no aportar información al estudio.

Los 23 tag SNPs seleccionados para la construcción de haplotipos extragénicos son rs13059519, rs11716779, rs17785248, rs4858825, rs17079785, rs319690, rs319685, rs777016, rs11707679, rs124486033, rs6800730, rs6787500, rs6442112, rs12486944, rs4558783, rs11130171, rs4858819, rs9311428, rs1264194, rs4858800, rs4974078, rs4955411 y rs6784820. En la figura 15 puede observarse la posición de cada uno de ellos.

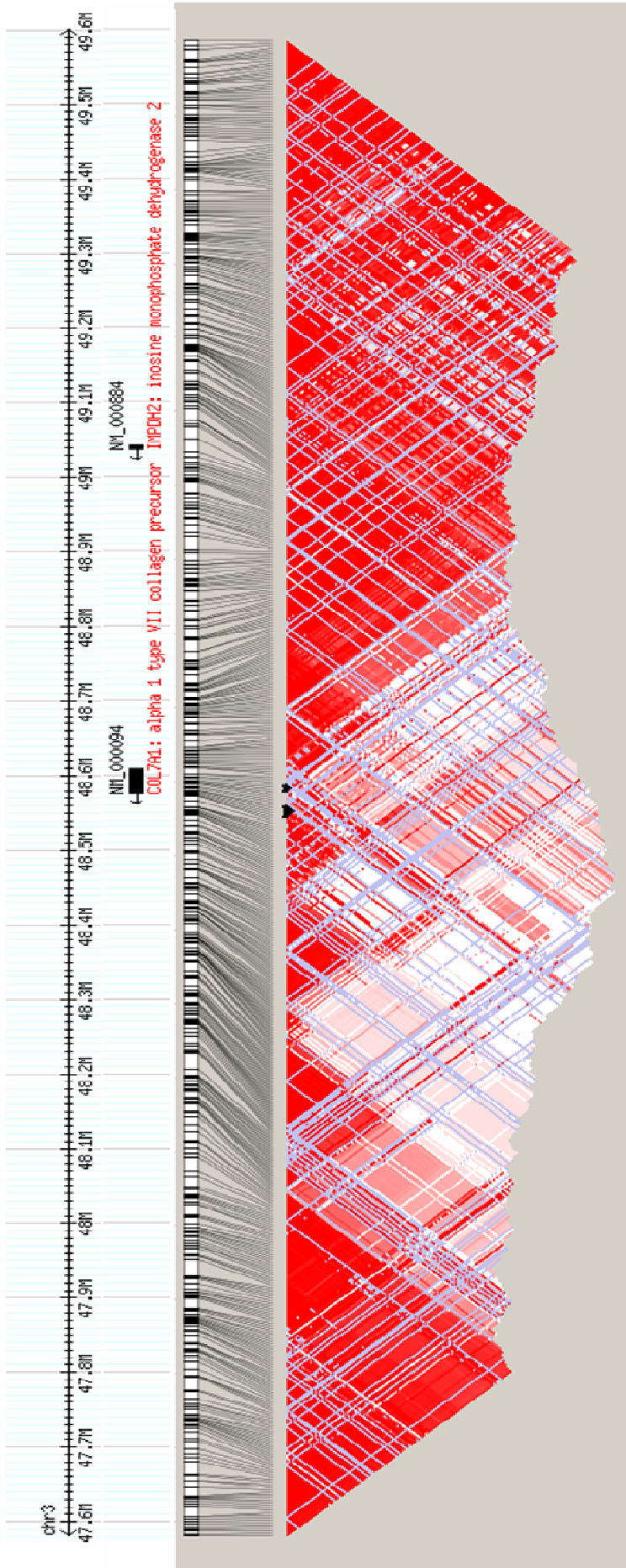
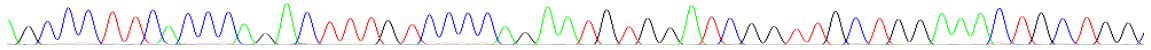


Figura 14: Representación dada por Haploview de los SNPs presentes en las 2 Mb flanqueantes a COL7A1 y el LD existente entre ellos.

Materiales y Métodos

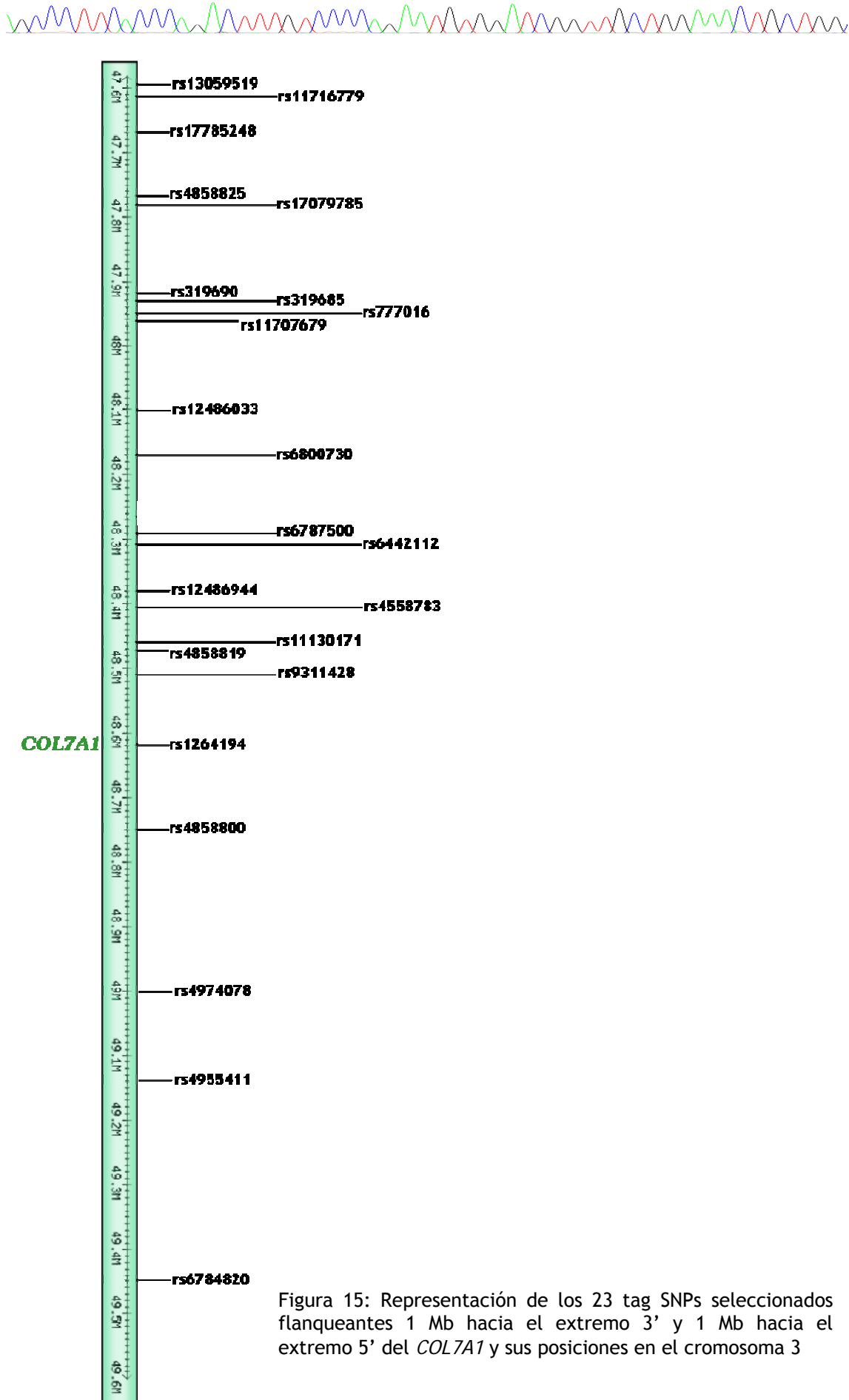
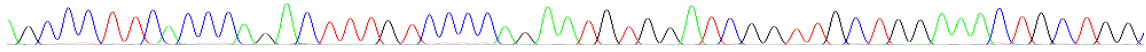


Figura 15: Representación de los 23 tag SNPs seleccionados flanqueantes 1 Mb hacia el extremo 3' y 1 Mb hacia el extremo 5' del *COL7A1* y sus posiciones en el cromosoma 3



6. Amplificación de fragmentos de ADN

6.1. Diseño de cebadores

Para el diseño de cebadores se utilizó la herramienta *web Primer* (Web-primer) (<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>). Este soporte informático ayuda a seleccionar los cebadores idóneos teniendo en cuenta el porcentaje de GC entre 45 y 55 %, la temperatura de fusión (T_m , del inglés *Temperature melting*) entre 52 y 65 °C y el tamaño del cebador entre 18 y 21 pb. Con el programa *megaBLAST* (Mega-Blast) (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/mtrace.shtml) se comprobó la especificidad en el genoma humano de cada oligonucleótido diseñado.

Siete de los 9 pares de cebadores necesarios para la amplificación de los fragmentos de ADN que contienen los SNPs intragénicos del gen *COL7A1*, fueron diseñados anteriormente (Christiano et al. 1997), (Christiano et al. 1992), (Gardella et al. 2000). Estas 7 parejas amplifican los fragmentos que contienen los SNPs rs222856, inSNP1, rs1264194, inSNP2, rs981495, rs987895 y rs253284. Los dos pares de cebadores que amplifican los fragmentos 4 y 6 para los SNPs rs9881877 y rs987118 respectivamente, se diseñaron en nuestro laboratorio. Los 9 cebadores se detallan en la Tabla 7.

<p>Fragmento 1: rs222856</p> <p>Directo: TGAGTACTGCAGGAGGCTTG 3'</p> <p>Reverso: 5' TGAGGTCAAGGGAAATGCT 3'</p>	<p>Fragmento 2: inSNP1</p> <p>Directo: 5' AACCCAGTTAACAGAGCCAG 3'</p> <p>Reverso: 5' GGAGGAGTCACTCAGAGTCG 3'</p>	<p>Fragmento 3: rs1264194</p> <p>Directo: 5' TGTAGCCCACTCAAGGGAA 3'</p> <p>Reverso: 5' TACCCCAAGCCCTAAACAA 3'</p>
<p>Fragmento 4: rs9881877</p> <p>Directo: 5' CCAGGAGAGTGAGGGAAGAG 3'</p> <p>Reverso: 5' TAGGGTCAGAAATCCAGGG 3'</p>	<p>Fragmento 5: inSNP2</p> <p>Directo: 5' ATGTGGATGTGTGTGTGCAG 3'</p> <p>Reverso: 5' AAGGTTCTGGGTACTCACCA 3'</p>	<p>Fragmento 6: rs987118</p> <p>Directo: 5' CCTTCTGTGTTAATCCCTG 3'</p> <p>Reverso: 5' CTCATTGCAGGAGATGACAGC 3'</p>
<p>Fragmento 7: rs981495</p> <p>Directo: 5' CCTGAGCTTGATCCGATGC 3'</p> <p>Reverso: 5' GGGAAATGGTCAATGCAGGAC 3'</p>	<p>Fragmento 8: rs987895</p> <p>Directo: 5' CGGGCTCGTTGTATTCTAAG 3'</p> <p>Reverso: 5' CAAAAGCTACCACACTGGT 3'</p>	<p>Fragmento 9: rs253284</p> <p>Directo: 5' TGAGTACTGCAGGAGGCTTG 3'</p> <p>Reverso: 5' TGAGGTCAAGGGAAATGCT 3'</p>

Materiales y Métodos

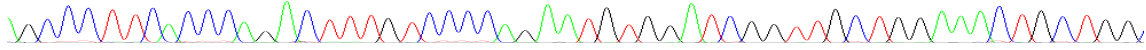


Tabla 7: Cebadores para la amplificación de los 9 fragmentos que contienen los SNPs intragénicos.

Los cebadores para el genotipado de los 23 SNPs extragénicos al gen *COL7A1* fueron todos diseñados en nuestro laboratorio. Estos cebadores se detallan en la Tabla 8.

Fragmento 1: rs13059519 Directo: 5´ TCAGATGGCTCTGATGACTG3´ Reverso: 5´ AGTTGTCCAGTAGGTGACTG3´	Fragmento 2: rs11716779 Directo: 5´ GTGCAGTGACATAAATGTCC3´ Reverso: 5´ AAGTGCAGCTCTACTTCACC3´	Fragmento 3: rs17785248 Directo: 5´ CGTTGTCCCAGAGCTAATAC3´ Reverso: 5´ CATTGCACCTGCTGACAAGC5´
Fragmento 4: rs4858825 Directo: 5´ CTGGAATGAGGTAGATGTTG3´ Reverso: 5´ TAGCCAGGATGGTCTTGATC3´	Fragmento 5: rs17079785 Directo: 5´ AGAGCTTCGTGCTACTAGAG3´ Reverso: 5´ TCTCATCTCTTGTGCCTCG3´	Fragmento 6: rs319690 Directo: 5´ GTGGCAGCTAGTTACACAAG3´ Reverso: 5´ CCATAGCCAACAACCTGTGC3´
Fragmento 7: rs319685 Directo: 5´ AGTCTCTCCTTCTCTCCCTG3´ Reverso: 5´ ACCAGATGATTCCTGAGCTC3´	Fragmento 8: rs777016 Directo: 5´ GAAACTGAAGCTAAGAGCAG3´ Reverso: 5´ TCTGTGTAAACTAGTCACCC3´	Fragmento 9: rs11707679 Directo: 5´ CTAACACAGAATCCTCCTCG3´ Reverso: 5´ TGAGGCAGGAGAATCACTTG3´
Fragmento 10: rs12486033 Directo: 5´ ATGGTGCACACCTGTAGTC3´ Reverso: 5´ GGTGCTTGTGCTATAGGTG3´	Fragmento 11: rs6800730 Directo: 5´ AGGATGGTCTCGATCTTTG3´ Reverso: 5´ GGGAAGTTACTCAGCAGTAG3´	Fragmento 12: rs6787500 Directo: 5´ TGTGAGGTTTtaggtgagg3´ Reverso: 5´ CAAAGCACGTTcatgggttg3´
Fragmento 13: rs6442112 Directo: 5´ CCTGGCAAAGAGAACAGCAC3´ Reverso: 5´ GTC AATATGGTGCTGGGATG3´	Fragmento 14: rs12486944 Directo: 5´ ACTCCTGACCTCAACTGATC3´ Reverso: 5´ TGTTTTTGCCACATTCCACC3´	Fragmento 15: rs4558783 Directo: 5´ TACTGCACTCCTATTGGAC3´ Reverso: 5´ CAGCACAGTTTCTCCACATC3´
Fragmento 16: rs11130171 Directo: 5´ TCACGGATACGTAGTCTGC3´ Reverso: 5´ T GACTGGTTCTGGTGTGATG3´	Fragmento 17: rs4858819 Directo: 5´ ATGACACACAGGCTGAGATC3´ Reverso: 5´ CATAGGAGACAGTAGCTGTC3´	Fragmento 18: rs9311428 Directo: 5´ ATCACCATCACCATTGTCACC3´ Reverso: 5´ GTCACCATATCTGACCACTAG3´
Fragmento 19: rs1264194 Directo: 5´ CAGTTAACAGAGCCAGTGAAG3´ Reverso: 5´ ATTGAAGCATCATGGGAGGTC3´	Fragmento 20: rs4858800 Directo: 5´ CACCTACATGTCAATCACTCC3´ Reverso: 5´ GGGCTGAGATGCTATCACTC3´	Fragmento 21: rs4974078 Directo: 5´ GGATCACAGCAGATTCAGAAG3´ Reverso: 5´ GCTGCAGTGAGCTATGATATG3´
Fragmento 22: rs4955411 Directo: 5´ TAGTGACTGTGATCCACCAC3´ Reverso: 5´ ATTGAGATCCTGACGATGCC3´	Fragmento 23: rs6784820 Directo: 5´ CTGGACAGTCCATCATCATG3´ Reverso: 5´ CGGGTTGTCTTTGTTCTCTG3´	

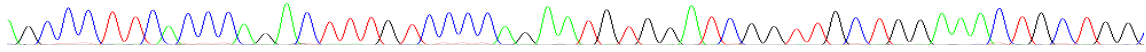


Tabla 8: Cebadores para la amplificación de los fragmentos de ADN que contienen los 23 SNPs extragénicos a *COL7A1*.

6.2. Diseño de las Reacciones en Cadena de la Polimerasa: PCRs

La amplificación de los fragmentos de ADN para el posterior genotipado de los polimorfismos de interés se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polimerase chain reaction*).

Se diseñaron un total de 3 PCRs *touchdown* (de toma de contacto) para la amplificación de los SNPs intragénicos y extragénicos. Estas PCRs *touchdown* consisten en un gradiente de T_m (Figura 16). El primer ciclo contiene la T_m más alta y el último ciclo la T_m más baja, repitiendo éste hasta 36 veces para que se produzca la amplificación de los fragmentos de ADN. De este modo, se consigue amplificar en un único programa del termociclador, distintos fragmentos de ADN.

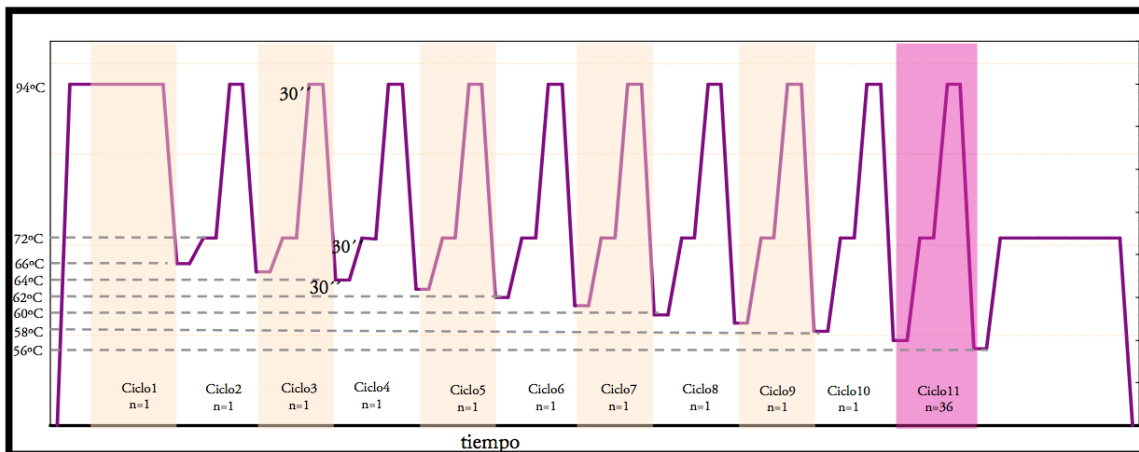
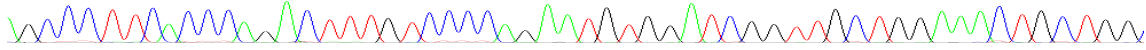


Figure 16: Esquema del gradiente de temperaturas y número de ciclos que se lleva a cabo en una PCR *touchdown* (Illera 2009)

Para la amplificación de cada uno de los fragmentos de ADN en un volumen final de 50 μl , se usaron por cada tubo de reacción 5 μl de tampón de Invitrogen, a una concentración 10x [200 milimolar (mM) de Tris-ácido clorídrico (Tris-HCl) (pH 8.4) y 500 mM de Cloruro de Potasio (KCl)], 1/1.5 μl (según PCR diseñada) a 50 mM de cloruro de magnesio (MgCl_2) de Invitrogen, 1 μl a una concentración de 10 mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) de Invitrogen, 1 μl a una concentración de 25 picomoles por microlitro ($\text{pmol}/\mu\text{l}$) del cebador directo (F, del inglés *forward*) y 1 μl del cebador reverso (R, del inglés *reverse*). Utilizamos 1 μl a una concentración de 50

Materiales y Métodos



nanogramos (ng)/ μl de ADN y ajustamos hasta 50 μl con 39 μl de agua destilada (H_2O_d).

Para la amplificación de los 9 fragmentos que contienen los SNPs intragénicos del gen *COL7A1*, se diseñó la siguiente PCR *touchdown* (tabla 9), usando 1 μl de MgCl_2 a 50 mM por reacción (1.5 mM en el volumen final de 50 μl):

Ciclo1		Ciclo2		Ciclo3		Ciclo4	
94°C 5'		94°C 30''		94°C 30''		94°C 30''	
		59.4°C 30''		59°C 30''		58°C 30''	
		72°C 30''		72°C 30''		72°C 30''	
Ciclo5		Ciclo6		Ciclo7 (36 rep.)		Ciclo8	
94°C 30''		94°C 30''		94°C 30''		72°C 7'	
57.4°C 30''		57°C 30''		55.3°C 30''		4°C ∞	
72°C 30''		72°C 30''		72°C 30''			

Tabla 9: Ciclos de PCR para la amplificación de los SNPs intragénicos del gen *COL7A1*.

(') Minutos; (') segundos (seg).

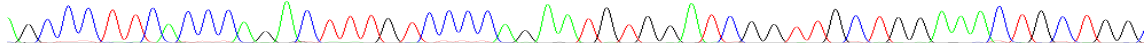
Para la amplificación de los 23 fragmentos que contienen los SNPs extragénicos a *COL7A1* se diseñaron dos PCRs *touchdown* con distintas concentraciones de MgCl_2 .

La primera PCR *touchdown* diseñada amplificó los fragmentos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22 y 23 (tabla 8) que contienen 17 de los 23 SNPs y la concentración de MgCl_2 fue de 1.5 mM en el volumen final de 50 μl por reacción (1 μl a 50 mM) (Tabla 10).

Ciclo1	Ciclo2	Ciclo3	Ciclo4	Ciclo5
94°C 5'	94°C 5''	94°C 5''	94°C 5''	94°C 5''
	60°C 30''	59°C 30''	58°C 30''	57°C 30''
	72°C 30''	72°C 30''	72°C 30''	72°C 30''
Ciclo6	Ciclo7	Ciclo8 (36 rep.)	Ciclo9	Ciclo10
94°C 5''	94°C 5''	94°C 5''		
56°C 30''	55°C 30''	54°C 30''	72°C 7'	4°C ∞
72°C 30''	72°C 30''	72°C 30''		

Tabla 10: Ciclos de PCR para la amplificación de los fragmentos de ADN nombrados como 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22 y 23. (') Minutos; (') segundos (seg).

Materiales y Métodos



La segunda PCR *touchdown* diseñada amplificó los fragmentos 6, 7, 8, 9, 11 y 21 (tabla 8) que contienen 6 de los 23 SNPs y la concentración de $MgCl_2$ fue 1 mM en el volumen final de 50 μ l por reacción (tabla 11).

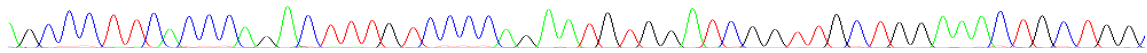
Ciclo1	Ciclo2	Ciclo3	Ciclo4
94°C 5'	94°C 5'' 58°C 30'' 72°C 30''	94°C 5'' 57°C 30'' 72°C 30''	94°C 5'' 56°C 30'' 72°C 30''
Ciclo5	Ciclo6 (36 reps.)	Ciclo7	Ciclo8
94°C 5'' 55°C 30'' 72°C 30''	94°C 5'' 54°C 30'' 72°C 30''	72°C 7'	4°C ∞

Tabla 11: Ciclos de PCR para la amplificación de los fragmentos de ADN nombrados como 6, 7, 8, 9, 11 y 21. (') Minutos; (') segundos (seg).

Después del amplificado, el producto de la reacción fue examinado en geles de agarosa (*agarose D-1 Low, CONDA Cat. 8008*) al 1.5 % de concentración en tampón de base tris, ácido bórico y EDTA (TBE, Tris-Borato-EDTA) al 1x y 5 % de Bromuro de Etidio (BrEt) y se analizaron en el transiluminador *Gel DocTM xr+ (BIO RAD)*.

Para el posterior análisis de los SNPs, se purificaron las muestras con el *kit* de de purificación *GFX PCR DNA (GE Healthcare)*.

Siguiendo el protocolo del fabricante, se introducen los 50 μ l del producto de PCR por una columna a la que se le añade a continuación 250 μ l del tampón 3 (tapa azul). Se centrifuga a 14000 rpm durante 30 segundos. Posteriormente se añaden 250 μ l del tampón 1 (tapa amarilla) y se centrifuga a 14000 rpm durante 30 segundos de nuevo. Tras centrifugar, se debe retirar la columna e introducirla en un tubo nuevo. A continuación se echan 25 μ l del tampón 6 (tapa rosa) dejándolo 1 minuto a temperatura ambiente para que el ADN se desprenda de la columna. Tras este último pase, centrifugar 1 minuto a 14000 rpm y la muestra precipitada en el tubo será el ADN purificado.



7. Análisis de SNPs

7.1. Técnica de SNaPshot

Para 7 de los 9 SNPs intragénicos del gen *COL7A1* (rs2228561, rs1264194, rs9881877, inSNP2, rs9871180, rs9814951 y rs9878950) se estandarizó la técnica de SNaPshot (*ABI PRIM SNaPshot Multiplex kit, Applied Biosystems, Ref: 4323154*).

Esta técnica consiste en la amplificación de cebadores colindantes a cada uno de los SNPs a estudiar. La última base nucleotídica de cada cebador es un didexosinucleótido trifosfato (ddNTP) marcado con fluorocromo que se acopla al polimorfismo a estudiar. El ddNTP evita la continuación de la elongación en la PCR y la diferencia de tamaño entre cebadores junto con el marcaje diferencial con fluorocromos, nos ayuda a distinguir entre los SNPs y sus diferentes alelos (Figura 17).

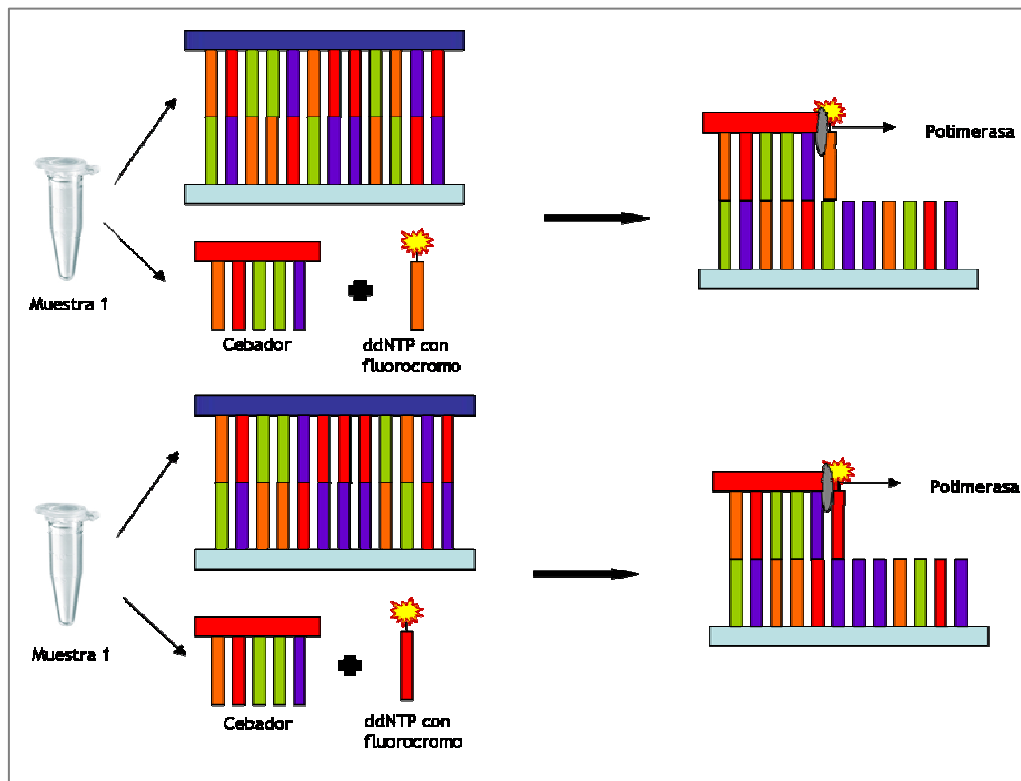
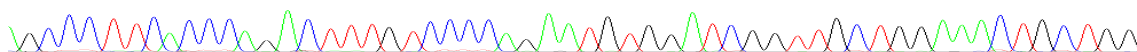


Figura 17: Esquema del método SNaPshot. El cebador se acopla a la secuencia antiparalela presente en el fragmento que contiene el SNP. Esta secuencia se sitúa a continuación del SNP. Según el nucleótido que esté presente como polimorfismo a estudiar, se colocará a continuación del cebador el ddNTP que le corresponda: ddATP (didesoxiadenosina trifosfato), ddGTP (didesoxiguanosina trifosfato), ddCTP (didesoxicitidina trifosfato) o ddTTP (didesotimidina trifosfato). Cada ddNTP está marcado con un fluorocromo diferente que permite distinguirlos.

Materiales y Métodos



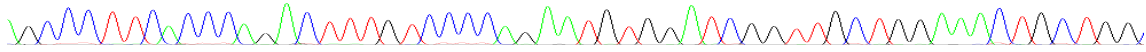
En un único tubo por muestra se mezclan los amplicones que contienen los 7 SNPs a analizar y los cebadores diseñados para cada SNP. Cada cebador hibrida con su secuencia diana y a continuación lo hace el ddNTP marcado. Estos cebadores unidos al ddNTP marcado son los que a continuación se amplifican y finalmente se corren en un secuenciador automático para su posterior análisis.

Se diseñaron los 7 cebadores teniendo en cuenta un mínimo de 6 nucleótidos de diferencia entre ellos. Para ello se añadieron colas poli T (Tabla 12).

SNP	Cebadores SNaPshot	Tamaño	Alelos del SNP
rs2228561	TCTGTCTGTAACCTCCTAGAGCC	21 pb	C/T
rs1264194	7(T)AGGCTGAGTGTCTAGGGCCA	27 pb	A/G
rs9881877	14(T)GTGCTTTCCTGAGGCCGTGC	33 pb	C/T
rs9814951	18(T)GGTGAGTCTAGGTGTGTGGATA	39 Pb	A/G
inSNP2	25(T)CACCCCATCCCTGCCTTAGTC	45 pb	C/T
rs9878950	31(T)AATGCCCATCACCAGTTGTA	51 pb	A/G
rs9871180	32(T)GGAAATTGACCCCAAGGAAAAAGCC	57 Pb	C/T

Tabla 12: Cebadores diseñados para cada SNP para la técnica de SNaPshot. Los tamaños de los cebadores deben ser diferentes para poder distinguir los resultados entre SNPs. Cada alelo probable en cada SNP va marcado con un fluorocromo diferente que en los resultados finales se diferencian por colores.

Siguiendo el protocolo del fabricante, 3 µl de la mezcla de PCR son incorporados a 5 µl de SNaPshot Multiplex Ready Reaciton mix, 1 µl de la mezcla de oligonucleotidos de SNaPshot y 1 µl de agua desionizada. La reacción de SNaPshot es incubada en un termociclador siguiendo un programa de 25 repeticiones del ciclo: 96°C 10 seg, 50°C 5 seg, 60°C 30 seg. Posteriormente, la mezcla es incubada con 1 unidad de Exo-SAP-IT, del inglés *Exonuclease I-Shrimp Alkaline Phosphatase* (Exonucleada I-Fosfatasa alcalina de camarón) de *GE Imagination at work-USB Corporation* a 37 °C durante 60 minutos, seguido de un paso de inactivación del enzima a 75 °C durante 15 minutos. Nueve µl de Hi-Di Formamida (Hi-Di del inglés *Highly Deionized* “Altamente Deionizada”) son mezclados con 0.5 µl de la reacción de SNaPshot y 0.5 µl del marcador *Orange color geneScan TM-120 LizTM size standard* y es procesado por el secuenciador automático ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Ref. 3730S). Los resultados fueron analizados usando el programa Peak Scanner™ V1.0 de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Ref. 4381867).



7.2. Secuenciación automática

Los SNPs intragénicos inSNP1 y rs2532848, y los SNPs extragénicos rs4858825, rs319685, rs124486033, rs6800730, rs6442112, rs12486944, rs4558783, rs9311428 y rs4955411, se analizaron mediante secuenciación automática.

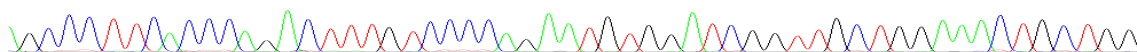
Se utilizaron placas de secuenciación de 96 pocillos (*26190 ultraampo™ Thin-Wall PCR® Strip tubes and microplates*) de *Sorenson™ BioScience*. En cada pocillo se mezclan 5 µl del producto de PCR y 1 µl del cebador F o cebador R a una concentración de 5ng/µl para la PCR de secuenciación. Las muestras fueron procesadas en el secuenciador automático *ABI PRISM 3730 DNA Analyzer* (Applied Biosystems, Ref. 3730S) y analizadas con el programa *Chromas Lite 2.01* (*Technelysium PtyLtd*(http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html)).

7.3. Digestiones enzimáticas: Análisis de RFLP

Debido a la capacidad de las enzimas de restricción para reconocer secuencias cortas del ADN bicaterario como dianas específicas (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción, RFLP, del inglés *Restriction fragment length polymorphism*), estas enzimas fueron utilizadas para analizar 14 de los 23 SNPs extragénicos (rs13059519, rs11716779, rs17786248, rs17079785, rs777016, rs319690, rs11707679, rs6787500, rs11130171, rs4858819, rs1264194, rs4858800, rs4974078 y rs6784820).

En la tabla 13 se muestra una relación de las enzimas de restricción usadas en este estudio y el correspondiente SNP estudiado. Las reacciones de digestión se hicieron siguiendo protocolos establecidos por el fabricante. El producto de la digestión fue analizado en un gel de agarosa al 1.5 % y chequeado con el transiluminador *Gel Doc™ xr+* (*BIO RAD*).

Materiales y Métodos



SNPs	rs 13059519	rs 11716779	rs 17785248	rs 17079785	rs 777016	rs 319690	rs 11707679	rs 7636461
Enzimas restricción	Hpy188III	NspI	NspI	NspI	MseI	BseYI	NlaIII	Cac8I
SNPs	rs 6787500	rs 11130171	rs 4858819	rs 1264194	rs 1264194	rs 4974078	rs 6784820	
Enzimas restricción	Acil	MspI	Acil	PvuII	BsaHI	Hpy99I	HincII	

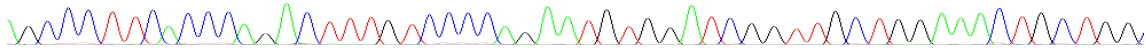
Tabla 13: Enzimas de restricción utilizadas para el análisis de 14 SNPs extragénicos.

8. Análisis estadístico de los SNPs

Se evaluó la distribución del equilibrio de HW de los SNPs no descritos con anterioridad que participan en este estudio. El análisis se realizó en la población control española. El equilibrio de HW fue analizado mediante la comparación de las frecuencias genotípicas esperadas y observadas utilizando la distribución de chi-cuadrado (χ^2) (Wigginton, Cutler and Abecasis 2005).

9. Construcción de haplotipos

La construcción de haplotipos intragénicos y extragénicos se realizó mediante separación manual de alelos. Para una correcta separación, se analizaron los tag SNPs en progenitores tanto de los pacientes como de los controles. En los casos en los que esa separación no fue posible, se seleccionaron los haplotipos más comunes como los correctos, descartando los casos ambiguos.



10. Cálculo de la edad genética

10.1. Cálculo de la tasa de crecimiento poblacional (r) y proporción muestral (f).

Tasa de crecimiento poblacional (r)

La tasa de crecimiento poblacional (r) es un dato importante para la estimación de la edad de una mutación o polimorfismo. Para obtener este dato se aplicó la siguiente ecuación:

$$N_1 = N_0 (1 + r)^t$$

Donde N_1 es el tamaño final de la población, N_0 es el tamaño inicial y t es el tiempo en años.

Los datos poblacionales fueron obtenidos del Instituto Nacional de Estadística (INE, www.ine.es) que se recogen desde 1857. Con ellos, se calculó el crecimiento poblacional en los últimos 150 años (1860-2010). Se tuvo en cuenta la r Europea (Rannala and Reeve 2003) y se calculó la r de España y de un “área determinada” de la Península Ibérica, de donde son nativos un porcentaje elevado de los pacientes portadores de la mutación c.6527insC (Córdoba, Sevilla, Málaga, Cáceres y Badajoz)

Proporción muestral (f)

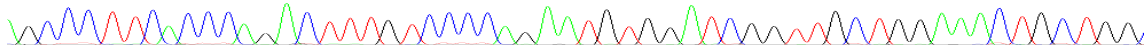
La proporción muestral se estimó con la ecuación:

$$f = \frac{n}{2N}$$

Donde n es el número de cromosomas portadores de la mutación y N es la frecuencia de portadores.

La N se calculó mediante la fórmula del equilibrio de HW.

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$



p^2 es la frecuencia de portadores del alelo sano en homocigosis, q^2 es la frecuencia de portadores del alelo afecto en homocigosis y $2pq$ es la frecuencia de portadores sanos de la mutación. Se estimó la proporción muestral teniendo en cuenta los datos españoles y los datos del área específica de Córdoba, Sevilla, Málaga, Cáceres y Badajoz.

10.2. Análisis del desequilibrio de ligamiento (LD) entre SNPs y mutación

Los tag SNPs extragénicos seleccionados para la construcción de haplotipos tienen entre ellos un alto LD. Este dato se tuvo en cuenta a la hora de seleccionarlos con el programa Haploview. Para la datación del ancestro común más reciente de los cromosomas portadores de la mutación c.6527insC también es necesario calcular el LD entre estos SNPs y la inserción. Si se obtiene un LD bajo con alguno de los SNPs extragénicos, se debe eliminar del estudio porque, al no estar altamente asociado a la mutación, el SNP no es informativo para la datación.

El cálculo del LD está basado en las diferencias de las frecuencias alélicas de los SNPs entre individuos portadores de la mutación y controles. El LD fue calculado con la siguiente ecuación:

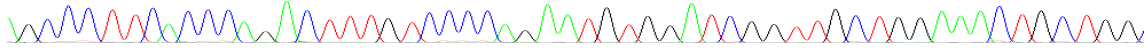
$$LD(\delta) = \frac{(Pd - Pn)}{(1 - Pn)}$$

Donde Pd es la frecuencia del alelo más frecuente de cada SNP en individuos portadores de la mutación y Pn es la frecuencia del mismo alelo en individuos controles (Bengtsson and Thomson 1981).

El intervalo de confianza (IC) para estos datos (90 %) fue calculado del siguiente modo (Diaz et al. 2000):

$$\delta \pm 1,64\sigma_{\delta} \quad \text{donde} \quad \sigma_{\delta}^2 = \text{var}(\delta)$$

$$\text{var}(\delta) = \frac{1}{(1 - Pn)^4} \sigma_{Pn}^2 [\sigma_{Pd}^2 + (1 - Pd)^2] + \frac{\sigma_{Pd}^2}{(1 - Pn)^2}$$



$$\sigma_{Pn}^2 = \frac{[Pn(1-Pn)]}{n_N} \quad \text{y} \quad \sigma_{Pd}^2 = \frac{[Pd(1-Pd)]}{n_N}$$

δ es el LD, σ es la distancia genética entre el SNP y la mutación, n_N es el número de cromosomas controles y n_D es el número de cromosomas portadores de la mutación (Durst et al. 2001).

Los datos obtenidos de las frecuencias alélicas de los SNP deben ser estadísticamente significativos. Para ello, se realizó el test de χ^2 .

10.3. Aproximaciones matemáticas para la datación

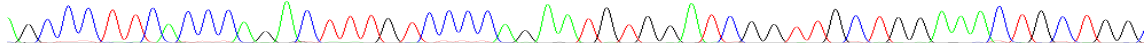
10.3.1. Algoritmo de Risch y factor de corrección de Luria y Delbrück (Método aplicado por Colombo): Estimación de la edad del ancestro común más reciente

Basándonos en el LD entre la mutación c.6527insC y los SNPs (δ) y las distancias genéticas entre ellos (θ) se estimó la edad mediante el algoritmo de Risch (Risch et al. 1995)

$$g^b = \frac{\log \delta}{\log(1-\theta)}$$

Dado que la r es un factor de variabilidad, a la edad calculada mediante el algoritmo de Risch se le aplicó el factor de corrección de Luria y Delbrück (Luria and Delbruck 1943) (Labuda et al. 1996).

$$g_0^c = \left(\frac{1}{r}\right) \ln\left(\theta \frac{1}{r}\right)$$



Finalmente, la edad de la mutación hallada con cada tag SNP se calculó como:

$$g_c^d = g^b + g_0^c$$

La edad del ancestro común más reciente de los cromosomas mutados es la media de las edades calculadas con cada SNPs que compone los haplotipos extragénicos portadores de mutación. El IC iría desde la edad más reciente hasta la más antigua de los resultados de cada SNP.

10.3.2. Programas DMLE+ y BDMC21: Estimación de la edad del primer evento mutacional

DMLE+

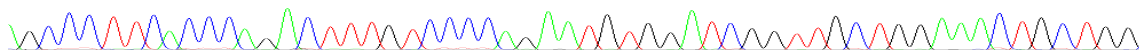
Para evaluar la edad de la mutación c.6527insC en la cohorte de pacientes españoles, los datos de los haplotipos de 50 familias españolas control y 28 familias portadores de la inserción, se analizaron en El programa DMLE+ (versión 2.2, (Rannala and Reeve 2001), (Reeve and Rannala 2002), (Dmle+) (<http://www.dmle.org>). Este programa, tuvo en cuenta los haplotipos de población control y los haplotipos de afectados, las distancias genéticas entre marcadores y la inserción (σ), el factor de crecimiento poblacional (r) y la proporción muestral (f). Incorporando estos datos al programa, te recalculó la edad más probable del primer evento mutacional. El (IC) se calculó con la edad más reciente y la más antigua dadas por el programa con probabilidades más bajas.

BDMC21

Alternativamente, también se evaluó la edad mutacional de la inserción aplicando el programa BDMC21 (Bdmc21) (<http://www.rannala>). Este software tuvo en cuenta el factor de crecimiento poblacional (r), la proporción muestral (f), el número de cromosomas portadores de la mutación (n_D), número de SNPs utilizados para el estudio y la tasa mutacional de los mismos. El IC se determinó mediante las ecuaciones: $h = g_i - g_{i-1}$ y $L_i = (L_{i-1} - 1) - 2L_i + (L_{i+1}) / h^2$. Donde g_i y L_i son datos resultantes del programa.



RESULTADOS



RESULTADOS

1. Origen geográfico de la mutación c.6527insC

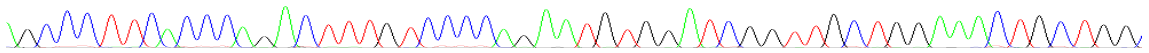
La EBD es una enfermedad rara asociada a mutaciones en el gen *COL7A1*. Se han descrito más de 520 mutaciones en este gen y la información disponible en las bases de datos www.col7.info y www.deb-central.org (Wertheim-Tysarowska et al. 2011), (van den Akker et al. 2011) indica que la mayoría de estas se encuentran en una baja frecuencia y por tanto, muchas de ellas son específicas de cada familia (intrafamiliares).

Sin embargo, en la cohorte de pacientes españoles con EBD se ha descrito una mutación altamente recurrente (c.6527insC). Esta mutación está presente en 39 de los 97 alelos mutados (40.2 %) de los 50 pacientes analizados. Este hallazgo nos lleva a plantearnos su origen y a investigar si esta alta e inusual recurrencia se debe a la existencia de un punto caliente en esa zona del gen *COL7A1*, o por el contrario, esté asociado a un efecto fundador.

Como primer paso, se ha llevado a cabo el análisis geográfico de 28 pacientes con EBD portadores de la mutación c.6527insC (11 homocigotos y 17 heterocigotos) basándose en el lugar de procedencia de dos generaciones anteriores de cada uno de estos pacientes. Se han analizado un total de 39 alelos portadores de la inserción.

Se ha observado que 25 de los 39 alelos están presentes en pacientes que provienen del suroeste de la Península Ibérica. Diecisiete de estos 25 alelos son de pacientes Andaluces (12 de Sevilla, 3 de Córdoba y 2 de Málaga), 7 alelos de pacientes originarios de Extremadura (4 de Cáceres y 3 de Badajoz) y 1 alelo procede de una familia del sur de Portugal, zona cercana geográficamente a Andalucía y Extremadura. El resto de los alelos pertenecen a pacientes que provienen de diferentes zonas de España y todos ellos están presentes en baja frecuencia frente al total (4 de Cataluña, 3 del País Vasco, 2 de la Comunidad Valenciana, 2 de Castilla León, 1 de las Islas Canarias, 1 de las islas Baleares y 1 de la Comunidad de Madrid) (figura 18).

Resultados



Más de la mitad de los 39 alelos (64.1 %) se concentran en el suroeste de la Península Ibérica (figura 18).

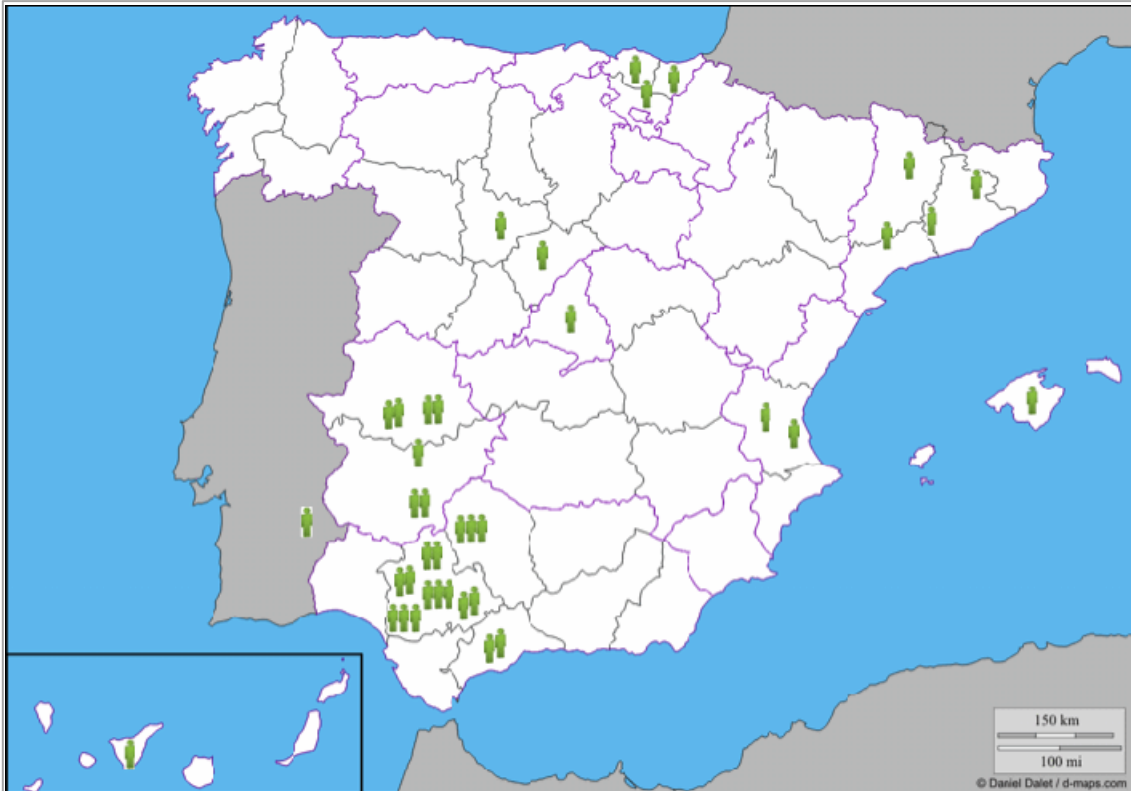
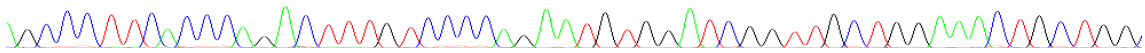


Figura 18: Distribución de la mutación c.6527insC en España y Portugal. Cada figura verde representa un alelo portador de la mutación. Se observa que 24 de los 39 alelos (64.1 %) se concentran en Caceres, Badajóz, Sevilla, Córdoba y Málaga.

2. Haplotipos intragénicos en el *COL7A1*

Para la construcción de haplotipos intragénicos en pacientes con EBD e individuos sanos se realizó, inicialmente, la identificación de polimorfismos en el gen *COL7A1*. El análisis de la distribución y frecuencia alélica de estos haplotipos frente a su segregación con las mutaciones existentes en el gen, nos lleva a conocer el comportamiento en su herencia, tanto de la mutación inusualmente recurrente, c.6527insC, como del resto de mutaciones presentes en la cohorte de pacientes españoles.



2.1. Identificación de SNPs intragénicos

Tanto en pacientes con EBD como en individuos control, se han identificado los SNPs intragénicos del gen *COL7A1* seleccionados en el apartado 5.1 de material y métodos. Los SNPs seleccionados se han considerado marcadores asociados (tag SNPs) que representan, tras la construcción de haplotipos, el 100 % de las variantes existentes en la población.

2.1.1. Nuevos SNPs en población española

Durante el análisis de los cromatogramas obtenidos tras la secuenciación automática del gen *COL7A1* para la búsqueda de mutaciones en pacientes con EBD, se han identificado 2 cambios moleculares no descritos anteriormente (figuras 19 y 20).

Estos cambios se describen como SNPs porque su frecuencia en la población control española es superior al 1 % (estudio realizado en los 93 controles españoles). Además, todos ellos se encuentran en equilibrio de HW (tabla 14).

El primer SNP descrito es un cambio de C por T en la posición 11639 de la secuencia genómica (NG_007065.1:g) (figura 19), situado en el intrón 19 del gen *COL7A1*. La frecuencia del alelo menos frecuente (T) es del 5 %. La frecuencia del genotipo CC es del 90.9 % la del genotipo CT es del 9.9 % y no se encontró ningún individuo con el genotipo TT. Este SNP se encuentra en equilibrio de HW ($\chi^2=0.65$; $p>0.05$) (tabla 14).

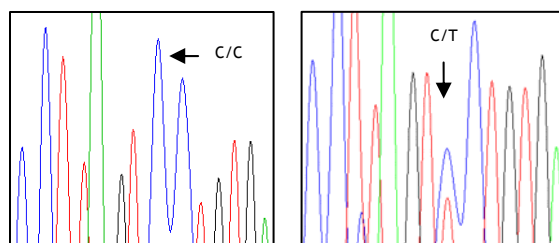


Figura 19: Cromatogramas obtenidos en controles españoles para el SNP NG_007065.1:g.11639C>T.

Resultados



El segundo SNP descrito es un cambio de C por T en la posición 25215 de la secuencia genómica (NG_007065.1:g) (figura 20), situado en el intrón 75 del gen *COL7A1*. La frecuencia alélica menos frecuente (T) es del 22 %. La frecuencia del genotipo CC es del 56.9 %, la del genotipo CT es del 41.9 % y la del genotipo TT es del 1.2 %. Este SNP se encuentra en equilibrio de HW ($\chi^2=0.045$; $p>0.05$) (tabla 14).

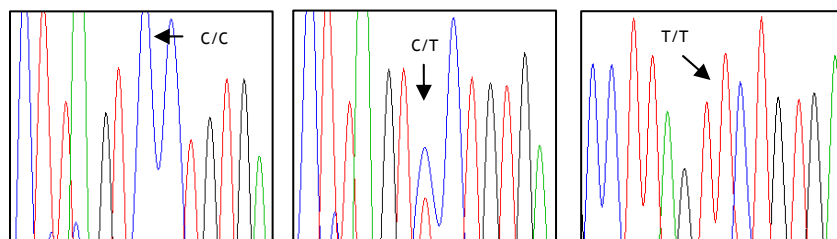


Figura 20: Cromatogramas obtenidos en controles españoles para el SNP NG_007065.1:g.25215C>T

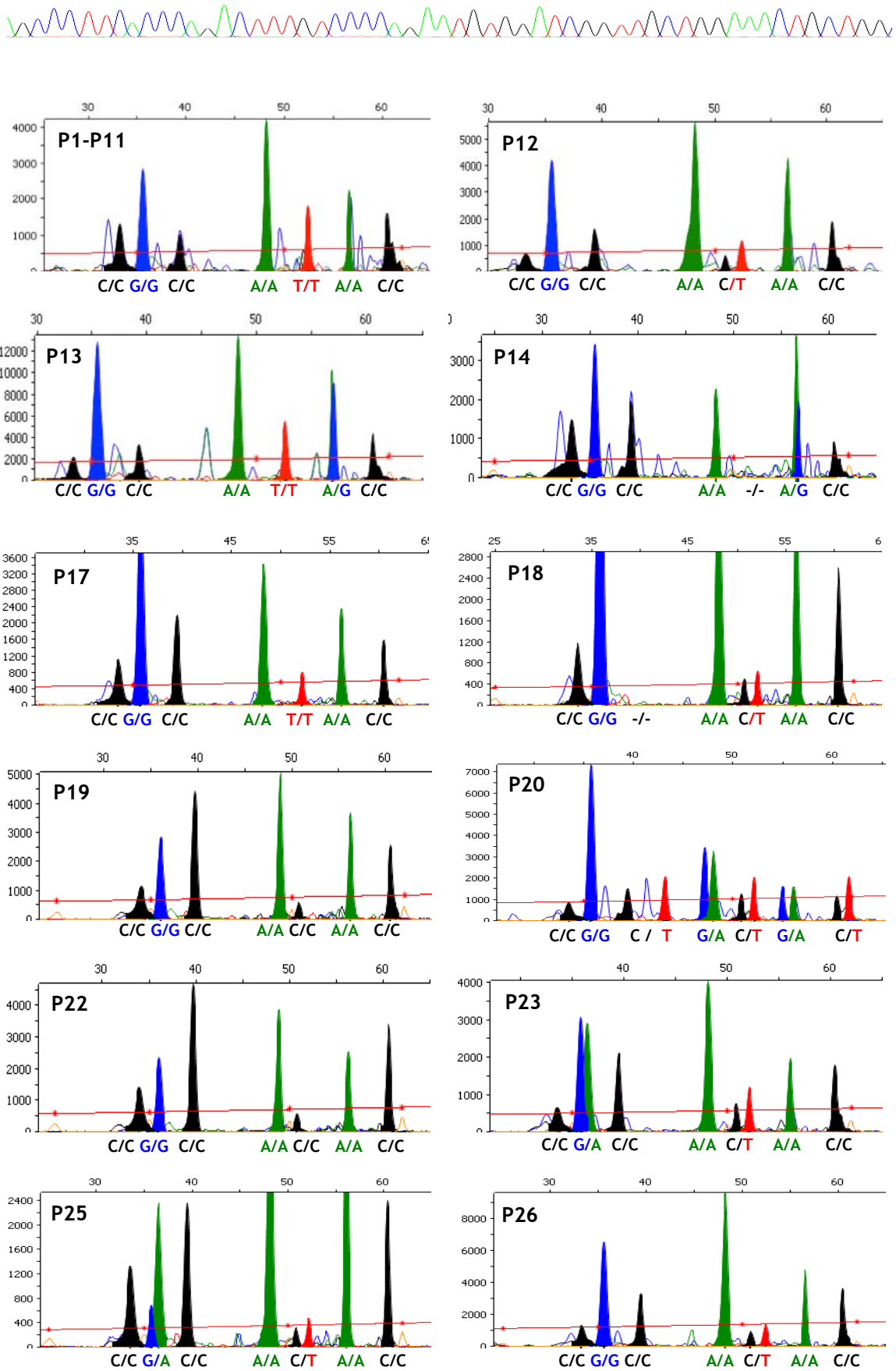
SNP NG_007065.1:g	Localización en <i>COL7A1</i>	Frecuencia alélica menor (muestra control)	Frecuencia genotípica (muestra control)	χ^2 test (p)
11639C>T	intrón 19	0.05	CC / CT / TT 0.909 / 0.099 / 0.0	0.65
25215C>T	intrón 75	0.22	CC / CT / TT 0.569 / 0.419 / 0.012	0.045

Tabla 14: SNPs, sus frecuencias alélicas y genotípicas en población control española, su localización en el gen *COL7A1* y la distribución de χ^2 para el estudio de HW. Nivel de significación ($p>0.05$). Las frecuencias están dadas en valores máximos de 1. Modificado de (Cuadrado-Corrales et al. 2010b)

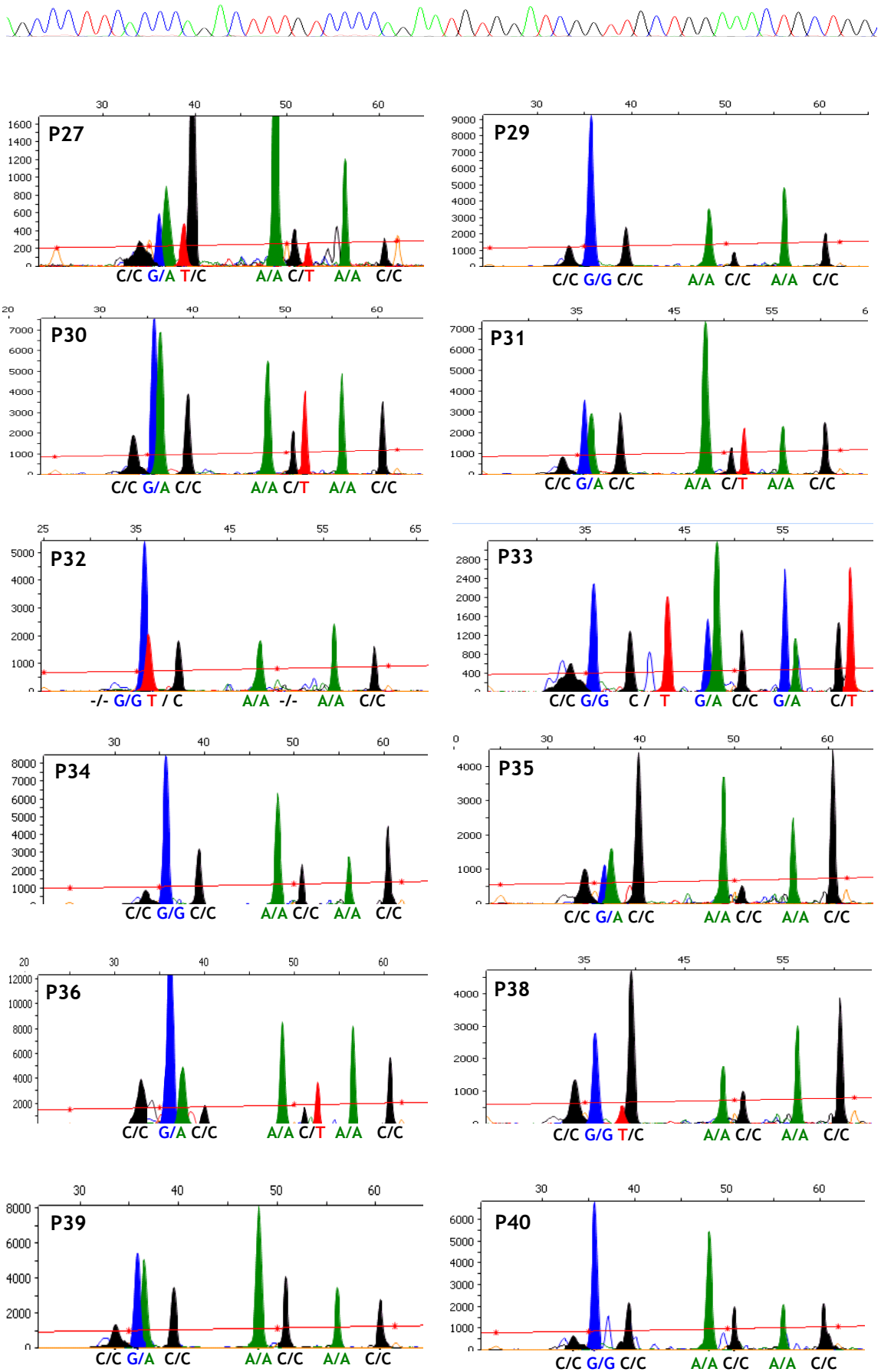
2.1.2. tag SNPs en pacientes con EBD y población española

Mediante la técnica de SNaPshot se han analizado 7 de los 9 tag SNPs intragénicos (rs2228561, rs1264194, rs9881877, inSNP2, rs9871180, rs9814951 y rs9878950) seleccionados para la construcción de haplotipos intragénicos (5.1. de Material y Métodos). Su localización en el gen y nomenclatura se refleja en la tabla 6 de material y métodos. Estos 7 SNPs intragénicos se estudiaron en 50 pacientes con EBD y sus progenitores y en 93 controles españoles. En la figura 21 se muestran los distintos genotipos obtenidos con la técnica molecular de SNaPshot.

Resultados



Resultados



Resultados

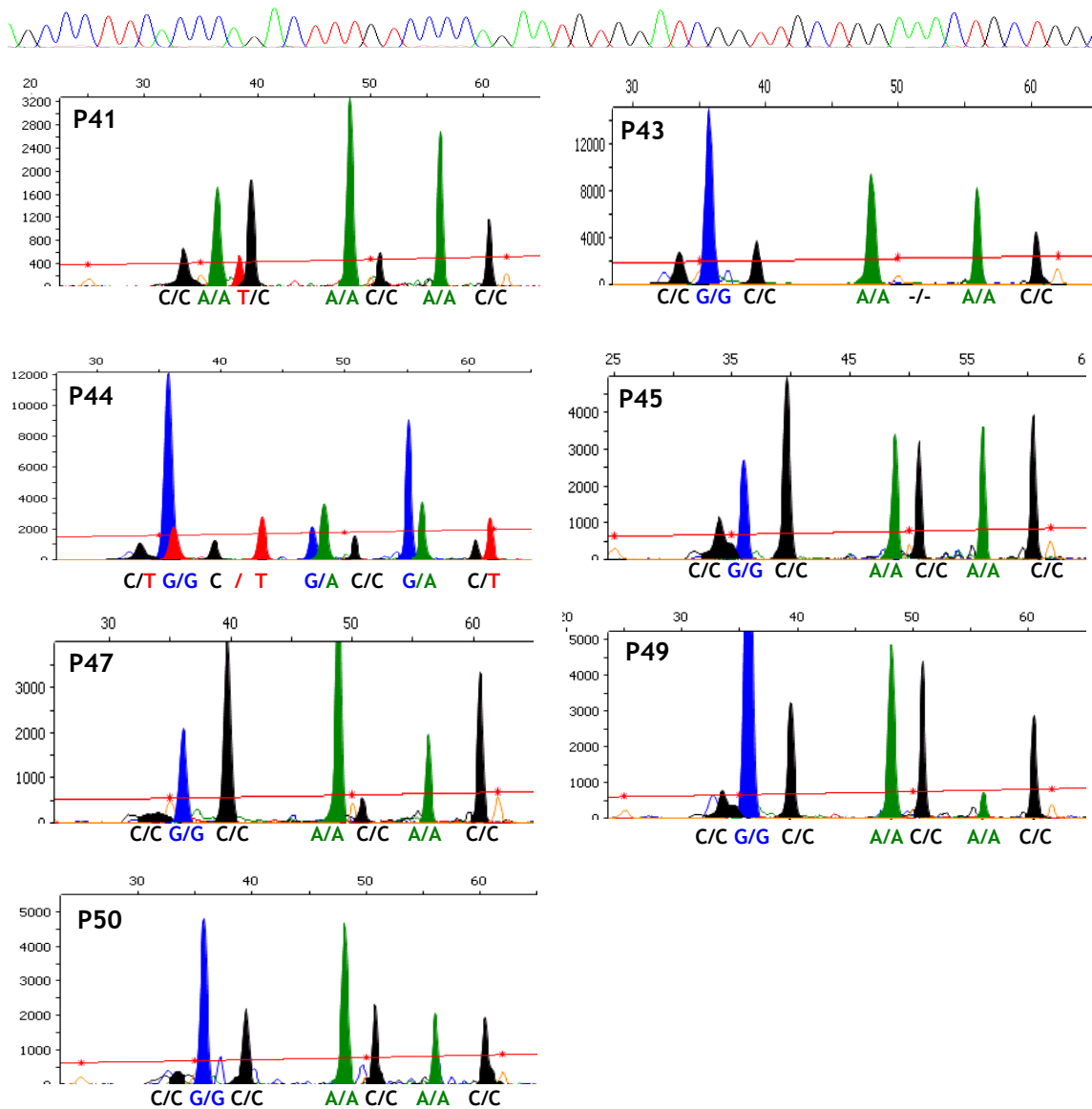


Figura 21: Genotipos analizados en pacientes con EBD mediante la técnica molecular de SNaPshot. El eje de las Y muestra la cantidad de amplificación de cada fragmento. La altura de los picos varía entre cada uno de ellos y entre gráficas en función de la amplificación que se ha llevado a cabo en cada PCR. El eje de las X muestra el tamaño de los cebadores amplificados, que difieren en función del SNP analizado (tabla 11). El color de cada pico representa el fluorocromo añadido al ddNTP que se une al SNP a analizar (tabla 12). La diferencia de fluorocromos nos indica el nucleótido que está presente en ese SNP para ese individuo. La ausencia de picos, picos inespecíficos e incongruencias se descartaron y se analizaron mediante secuenciación automática. Los pacientes que no pudieron analizarse por esta técnica fueron estudiados mediante la técnica de secuenciación automática. El orden de los SNPs y la representación de los mismos en la gráfica, viene explicado en la tabla 12.

Mediante secuenciación automática se han analizado los 2 tag SNPs restantes (inSNP1 y rs2532848) en los 50 pacientes, sus respectivos progenitores y 93 controles. En la figura 22 se muestran los cromatogramas obtenidos de los tres genotipos descritos en el polimorfismo inSNP1. La figura 23 corresponde a los tres genotipos descritos para SNP rs2532848.

Resultados

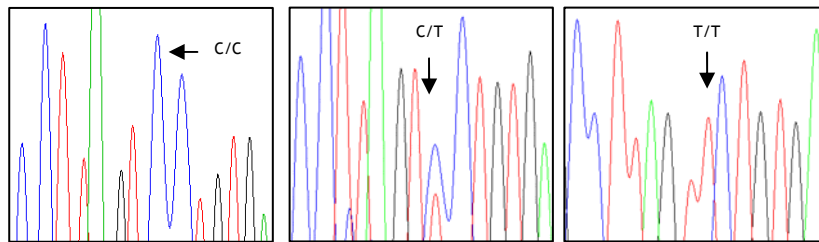
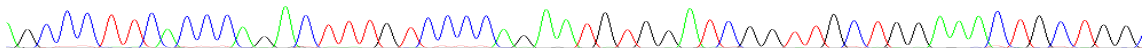


Figura 22: Cromatogramas obtenidos con los tres genotipos encontrados para el SPN inSNP1. (C/C) en homocigosis, (C/T) en heterocigosis, (T/T) en homocigosis.

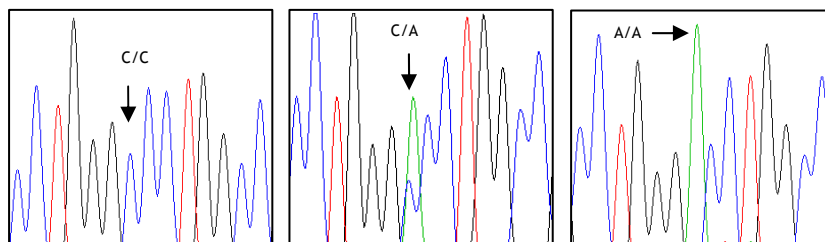


Figura 23: Cromatogramas obtenidos con los tres genotipos encontrados para el SNP rs2532848. (C/C) en homocigosis, (C/A) en heterocigosis, (A/A) en homocigosis.

2.2. Frecuencias alélicas y genotípicas de los tag SNPs intragénicos

En las tablas 15 y 16 se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas de los 9 tag SNPs intragénicos identificados en el apartado anterior. Se analizaron los 97 alelos mutados presentes en los 50 pacientes con EBD y los 128 alelos presentes en los 64 controles españoles que finalmente se pudieron utilizar para la construcción de haplotipos intragénicos.

Para los SNPs rs22285611, inSNP1, rs981877 y rs9871180, más del 90 % de los alelos presentes tanto en pacientes como controles segregan la C como alelo más frecuente y la expresión de T en las dos poblaciones es (tabla 15).

En los SNPs inSNP1 y rs9881877, la T, que es el alelo menos frecuente tanto en pacientes como en controles, es segregado en el doble de alelos mutados (pacientes) frente a alelos no mutados (controles) (tabla 15).

En los SNPs que conllevan cambios de G por A o a la inversa (rs1264194, rs9814951 y rs9878950), el alelo menos frecuente en las dos poblaciones en estudio

Resultados



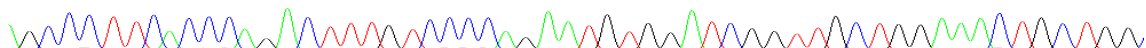
es segregado en el doble de alelos no mutados (controles) frente a alelos mutados (pacientes) tabla 15).

La expresión de los dos alelos en los SNPs inSNP2 y rs2532848 es cerca al 50 % en pacientes, mientras que en la población control predomina el alelo C.

SNP	Frecuencias Alélicas		
	Pacientes	Controles	
rs22285611	C	95.88% (93/97)	94.53% (121/128)
	T	4.12% (4/97)	5.47% (7/128)
inSNP1	C	92.78% (90/97)	96.09% (123/128)
	T	7.22% (7/97)	3.91% (5/128)
rs1264194	G	86.60% (84/97)	67.19% (88/128)
	A	13.40% (13/97)	32.81% (42/128)
rs9881877	C	93.81% (91/97)	96.86% (124/128)
	T	6.19% (6/97)	3.13% (4/128)
inSNP2	C	52.58% (51/97)	82.81% (106/128)
	T	47.42% (46/97)	17.19% (22/128)
rs9871180	C	95.88% (93/97)	99.22% (127/128)
	T	4.12% (4/97)	0.78% (1/128)
rs9814951	A	93.81% (91/97)	82.81% (106/128)
	G	6.19% (6/97)	17.19% (22/128)
rs9878950	A	90.72% (88/97)	75.78% (97/128)
	G	9.28% (9/97)	24.22% (31/128)
rs2532848	A	51.55% (50/97)	17.19% (22/128)
	C	48.45% (47/97)	82.81% (106/128)

Tabla 15: Frecuencias alélicas de los 9 tag SNPs que conforman los haplotipos intragénicos. Se muestran las frecuencias en los 97 alelos mutados presentes los 50 pacientes estudiados y en los 128 alelos presentes en los 64 controles que finalmente se utilizaron para la construcción de haplotipos.

Resultados



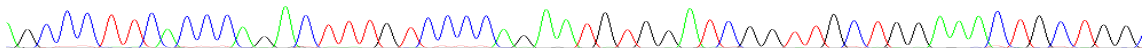
Respecto a las frecuencias genotípicas, lo más destacable es la diferencia existente en las frecuencias genotípicas de los SNPs inSNP2 y rs2532848 entre pacientes y controles, diferencias también observadas en sus frecuencias alélicas (tabla 16).

El inSNP2 se segrega en pacientes con frecuencias genotípicas similares en las tres combinaciones (CC, CT y TT), sin embargo en controles el genotipo CC es el más frecuente con un 67.19 %, a continuación el heterocigoto con una frecuencia del 31.25 % y el homocigoto TT con una frecuencia cercana al 1 % (tabla 16).

Del mismo modo, el SNP rs2532848 se expresa en pacientes con frecuencias genotípicas similares en las tres combinaciones (AA, AC y CC), sin embargo en controles, el genotipo CC es el mayoritario con un 68.74 % y el homocigoto AA es el de menor expresión con una frecuencia del 3.13 % (tabla 16).

SNP	Frecuencias Genotípicas					
	Pacientes			Controles		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT
rs22285611	93.62% (44/47)	4.26% (2/47)	2.12% (1/47)	89.06% (57/64)	10.94% (7/64)	0% (0/64)
inSNP1	CC 85.11% (40/47)	CT 14.89% (7/47)	TT 0% (0/47)	CC 93.75% (60/64)	CT 4.69% (3/64)	TT 1.56% (1/64)
rs1264194	GG 78.73% (37/47)	GA 14.89% (7/47)	AA 6.38% (3/47)	GG 39.06% (25/64)	GA 56.25% (36/64)	AA 4.69% (3/64)
rs9881877	CC 87.23% (41/47)	CT 12.77% (6/47)	TT 0% (0/47)	CC 93.75% (60/64)	CT 6.25% (4/64)	TT 0% (0/64)
inSNP2	CC 31.91% (15/47)	CT 38.30% (18/47)	TT 29.79% (14/47)	CC 67.19% (43/64)	CT 31.25% (20/64)	TT 1.56% (1/64)
rs9871180	CC 91.49% (43/47)	CT 8.51% (4/47)	TT 0% (0/47)	CC 98.44% (63/64)	CT 1.56% (1/64)	TT 0% (0/64)
rs9814951	AA 87.23% (41/47)	AG 12.77% (6/47)	GG 0% (0/47)	AA 65.63% (42/64)	AG 34.37% (22/64)	GG 0% (0/64)
rs9878950	AA 80.85% (38/47)	AG 19.15% (9/47)	GG 0% (0/47)	AA 51.56% (33/64)	AG 48.44% (31/64)	GG 0% (0/64)
rs2532848	AA 34.04% (16/47)	AC 38.30% (18/47)	CC 27.66% (13/47)	AA 3.13% (2/64)	AC 28.13% (18/64)	CC 68.74% (44/64)

Tabla 16: Frecuencias genotípicas de los 9 tag SNPs que forman los haplotipos intragénicos. Se muestran las frecuencias en los 47 pacientes con EBD heterocigotos (excluyendo los 3 pacientes homocigotos a razón de que presentan un alelo sano) y en los 64 controles.



2.3. Desequilibrio de Ligamiento (LD) entre tag SNPs intragénicos y mutaciones en *COL7A1*

Los tag SNPs intragénicos del gen *COL7A1* seleccionados por el programa Haploview, están asociados entre ellos con un alto LD (δ). Sin embargo, los SNPs inSNP1, inSNP2 y rs2532848 se añadieron posteriormente al haplotipo intragénico por su posible asociación con la enfermedad. Por tanto, se ha realizado el estudio de asociación entre estos tres SNPs y la patología, calculando el LD existente entre ellos y las mutaciones que portan los pacientes. La alta frecuencia de la mutación c.6527insC (40.2 %) en la cohorte de pacientes puede influir en los datos de asociación, por lo que también se ha calculado el LD existente entre estos SNPs y la mutación c.6527insC. (tabla 17).

Para el inSNP1,

Comparando su distribución entre alelos mutados (pacientes) y alelos no mutados (controles), no se observa una diferencia estadísticamente significativa en su segregación [$\chi^2=1.20$; ($p>0.001$)] (tabla 17).

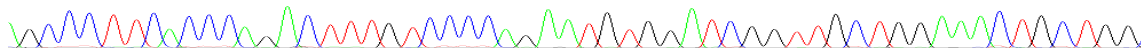
Además, comparando la distribución de este mismo SNP entre alelos portadores de la mutación c.6527insC y alelos no mutados, tampoco se observa una diferencia significativa [$\chi^2=0.51$ ($p>0.001$)]. De igual modo, comparando la distribución del SNP entre alelos portadores del resto de mutaciones y alelos no mutados, no se observan tampoco diferencias significativas [$\chi^2=3.16$ ($p>0.001$)].

En resumen, el inSNP1 no muestra asociación con ninguna de las mutaciones presentes en los alelos mutados. A pesar de ello, se decidió incorporar el inSNP1 al haplotipo intragénico por no haber sido descrito con anterioridad en otras poblaciones, y por tanto, estar posiblemente asociado a la población española, población que alberga esta cohorte de pacientes.

Para el inSNP2,

Comparando la distribución del SNP entre alelos mutados y no mutados, se observó una diferencia estadísticamente significativa en su segregación [$\chi^2=23.92$

Resultados



($p < 0.001$)]. Calculando el LD entre el SNP y las mutaciones se obtiene un LD negativo (-1.756) lo que significa que no están asociados entre ellos (tabla 17).

Comparando la distribución del SNP entre los alelos portadores de la mutación c.6527insC y los alelos no mutados, también se observó una diferencia significativa en su segregación [$\chi^2=102.88$ ($p < 0.001$)]. Además, se calculó un LD=1 entre la mutación y el SNP, lo que significa que existe una asociación máxima entre ellos (tabla 17).

Sin embargo, la distribución del SNP entre alelos no mutados y alelos portadores del resto de mutaciones, se observó que no es significativamente diferente [$\chi^2=0.79$; $p=0.3727$ ($p > 0.001$)] (tabla 17).

Tan solo existe asociación del inSNP2 con la mutación c.6527insC. Esta mutación está presente en el 40.2 % de los alelos mutados; observándose una diferencia significativa en la distribución de este SNP en alelos mutados frente a no mutados, pero una no asociación del SNP con todas las mutaciones.

La alta asociación del SNP con la inserción nos lleva a añadir este SNP al haplotipo intragénico del gen *COL7A1*.

Para el SNP rs2532848,

Comparando la distribución de este SNP entre alelos mutados y no mutados, se observó una diferencia estadísticamente significativa en su segregación [$\chi^2=29.94$ ($p < 0.001$)] pero, al igual que en el SNP anterior, se obtuvo un LD negativo (-0.846) entre el SNP y las mutaciones, lo que significa que no están asociados entre ellos (tabla 17).

La distribución del SNP entre alelos no mutados y alelos portadores de la mutación c.6527insC también se observó significativamente diferente [$\chi^2=84.88$ ($p < 0.001$)], pero se obtuvo un LD=1 entre el SNP y la mutación c.6527insC, lo que significa que están altamente asociados entre ellos (tabla 17).

Resultados



Sin embargo, la distribución del SNP entre alelos no mutados y alelos portadores del resto de mutaciones, se observó que no es significativamente diferente [$\chi^2=0.09$ ($p>0.001$)] (tabla 17).

Al igual que para el SNP anterior, tan solo existe asociación del SNP rs2532848 con la mutación c.6527insC. Como se ha dicho anteriormente, esta mutación está presente en el 40.2 % de los alelos mutados, y por ello se observa una diferencia significativa en la distribución de este SNP en alelos mutados frente a los no mutados, pero una no asociación del SNP con todas las mutaciones.

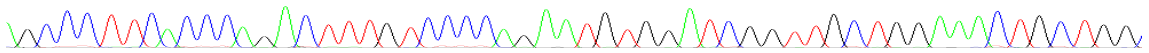
La elevada asociación de este SNP con la inserción nos lleva a añadirlo también al haplotipo intragénico del gen *COL7A1*.

SNPs	Pacientes con EBD		Portadores de c.6527insC		No portadores de c.6527insC	
	X ² (p-value)	LD (δ)	X ² (p-value)	LD (δ)	X ² (p-value)	LD (δ)
In SNP1	1.20 ($p>0.001$)	-	0.51 ($p>0.001$)	-	3.16 ($p>0.001$)	-
In SNP2	23.92 ($p<0.001$)	-1.76	102.88 ($p<0.001$)	1	0.79 ($p>0.001$)	-
rs 2532848	29.94 ($p<0.001$)	-0.85	84.88 ($p<0.001$)	1	0.09 ($p>0.001$)	-

Tabla 17: Análisis del LD entre los SNPs inSNP1, inSNP2 y rs2532848 y mutaciones presentes en nuestra cohorte de pacientes. Se muestra también el LD entre estos tres SNPs y la mutación c.6527insC.

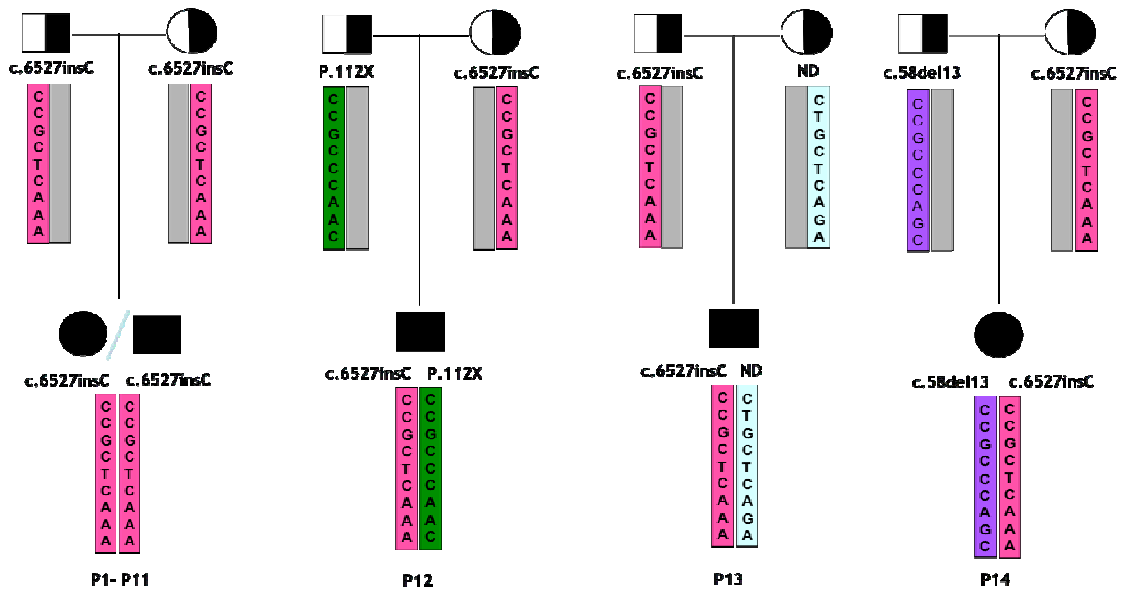
2.4. Construcción de haplotipos intragénicos

Tras el análisis de los 9 tag SNPs intragénicos en pacientes, controles y respectivas familias, se ha obtenido la colección de marcadores que porta cada individuo. Se han construido los haplotipos intragénicos realizando la separación de alelos manualmente. Es necesario tener tríos de pedigrís para la obtención de haplotipos en los casos en los que los individuos sean portadores de los SNPs de modo heterocigote.



2.4.1. Árboles genealógicos de pacientes con EBD

Para la visualización de la herencia de las mutaciones presentes en cada familia y de la cosegregación de estas con los haplotipos intragénicos, se ha realizado la construcción de árboles genealógicos en los 50 pacientes con EBD (figura 24).

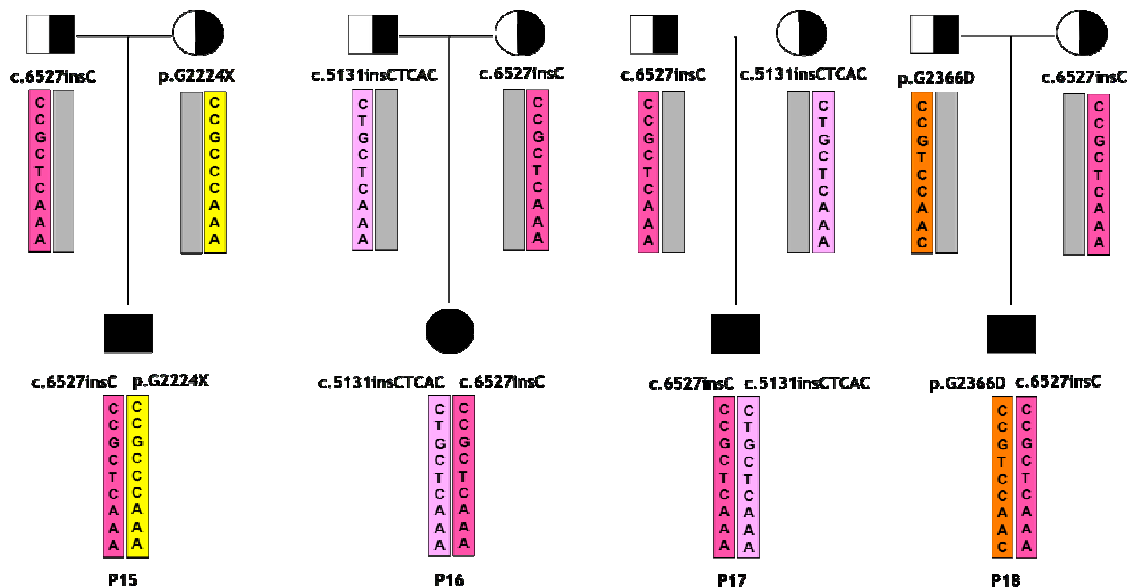


P1-P11: Pacientes portadores de la mutación c.6527insC, herencia homocigota y cosegregación con el haplotipo Hi.5 en ambos alelos.

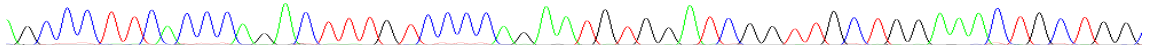
P12: Paciente masculino portador de la mutación c.6527insC en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.5 y la mutación p.Y112X en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.1.

P13: Paciente masculino portador de la mutación c.6527insC en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.5. La segunda mutación no ha sido descrita, alelo portador del haplotipo Hi.16, herencia materna.

P14: Paciente femenino portador de la mutación c.6527insC en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.5 y la mutación c.58del13 en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.10.



Resultados

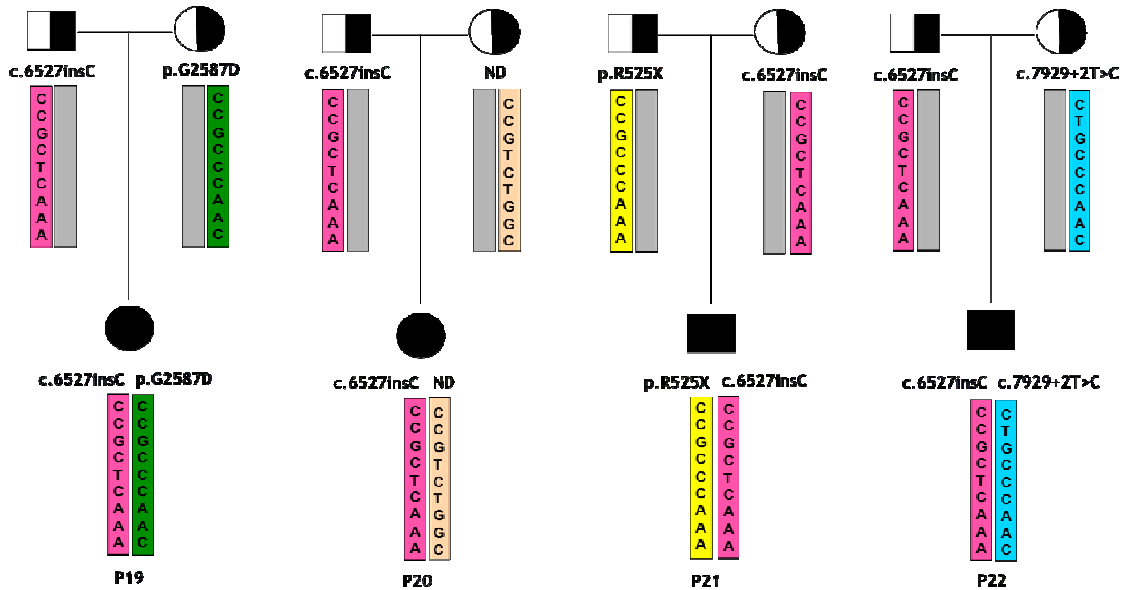


P15: Paciente masculino portador de la mutación c.6527insC en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.5 y la mutación p.G2224X en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.4.

P16: Paciente femenino portador de la mutación c.6527insC en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.5 y la mutación c.5131insCTCAC en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.15.

P17: Paciente masculino portador de la mutación c.6527insC en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.5 y la mutación c.5131insCTCAC en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.15.

P18: Paciente masculino portador de la mutación c.6527insC en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.5 y la mutación p.G2366D en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.11.

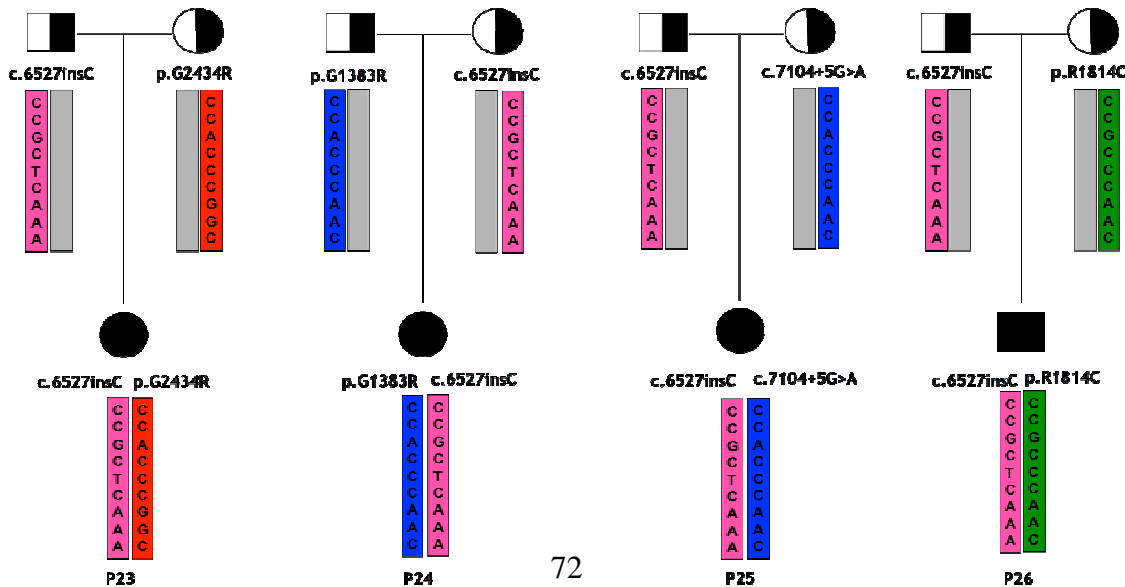


P19: Paciente femenino portador de la mutación c.6527insC en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.5 y la mutación p.G2587D en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.1.

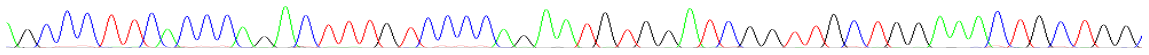
P20: Paciente femenino portador de la mutación c.6527insC en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.5. La segunda mutación no ha sido descrita, alelo portador del haplotipo Hi.14, herencia materna.

P21: Paciente masculino portador de la mutación c.6527insC en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.5 y la mutación p.R525X en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.4.

P22: Paciente masculino portador de la mutación c.6527insC en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.5 y la mutación c.7929+2T>C en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.13.



Resultados

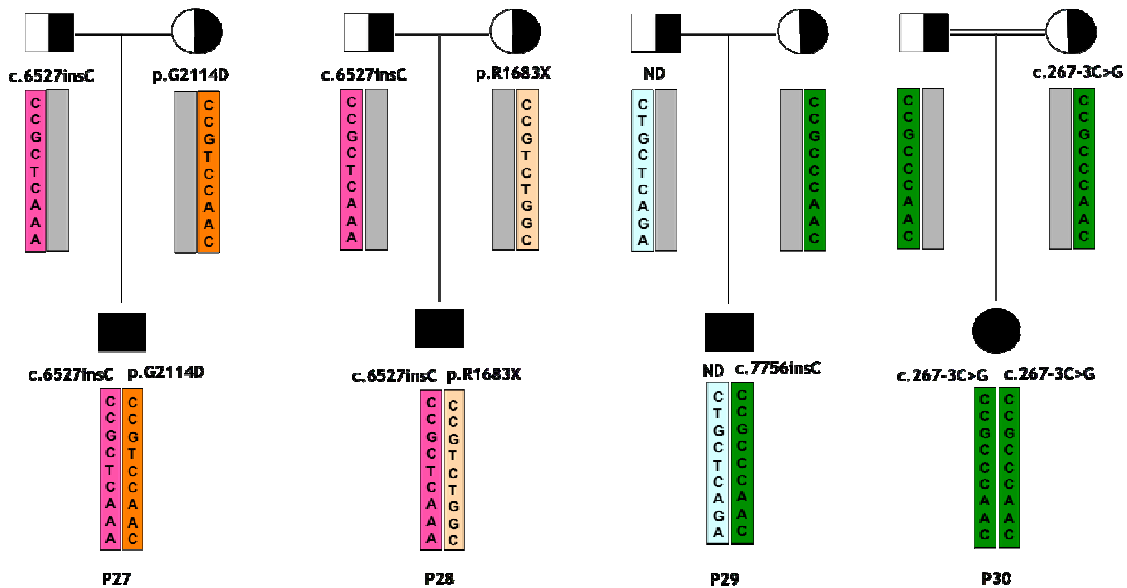


P23: Paciente femenino portador de la mutación c.6527insC en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.5 y la mutación p.G2434R en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.3.

P24: Paciente femenino portador de la mutación c.6527insC en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.5 y la mutación p.G1383R en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.2.

P25: Paciente femenino portador de la mutación c.6527insC en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.5 y la mutación c.7104+5G>A en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.2.

P26: Paciente masculino portador de la mutación c.6527insC en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.5 y la mutación p.R1814C en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.1.

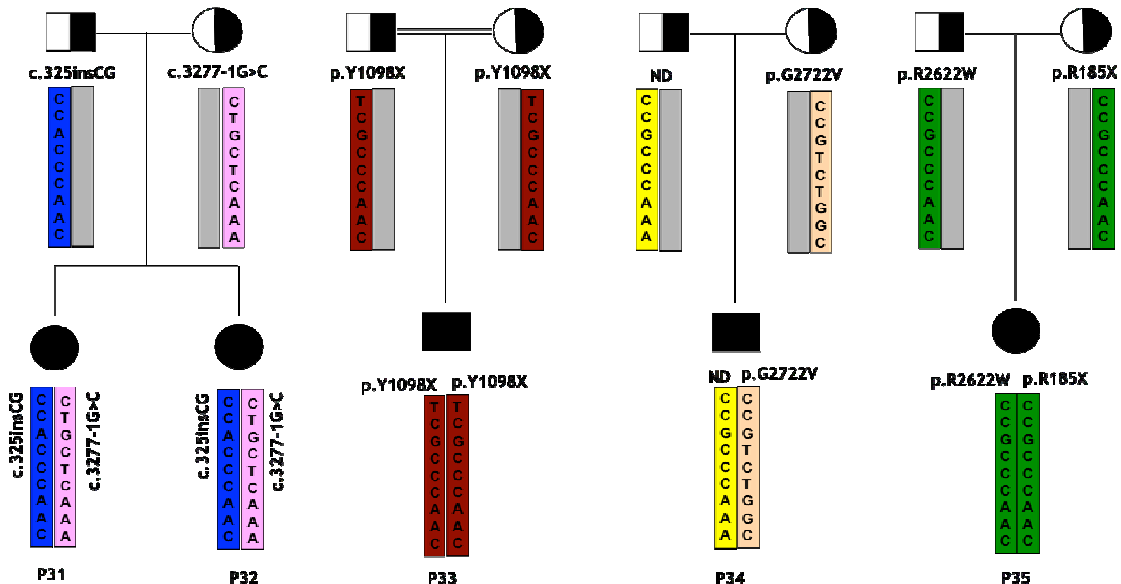


P27: Paciente masculino portador de la mutación c.6527insC en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.5 y la mutación p.G2114D en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.11.

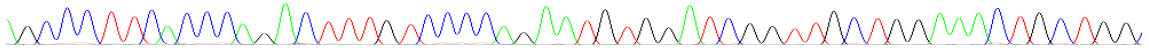
P28: Paciente masculino portador de la mutación c.6527insC en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.5 y la mutación p.R1683X en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.14.

P29: Paciente masculino portador de la mutación c.7756insC en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.1. La segunda mutación no ha sido descrita, alelo portador del haplotipo Hi.16, herencia paterna.

P30: Paciente femenino portador de la mutación c.267-3C>G en homocigosis y cosegregación con el haplotipo Hi.1 ambos alelos. Progenitores consanguíneos.



Resultados

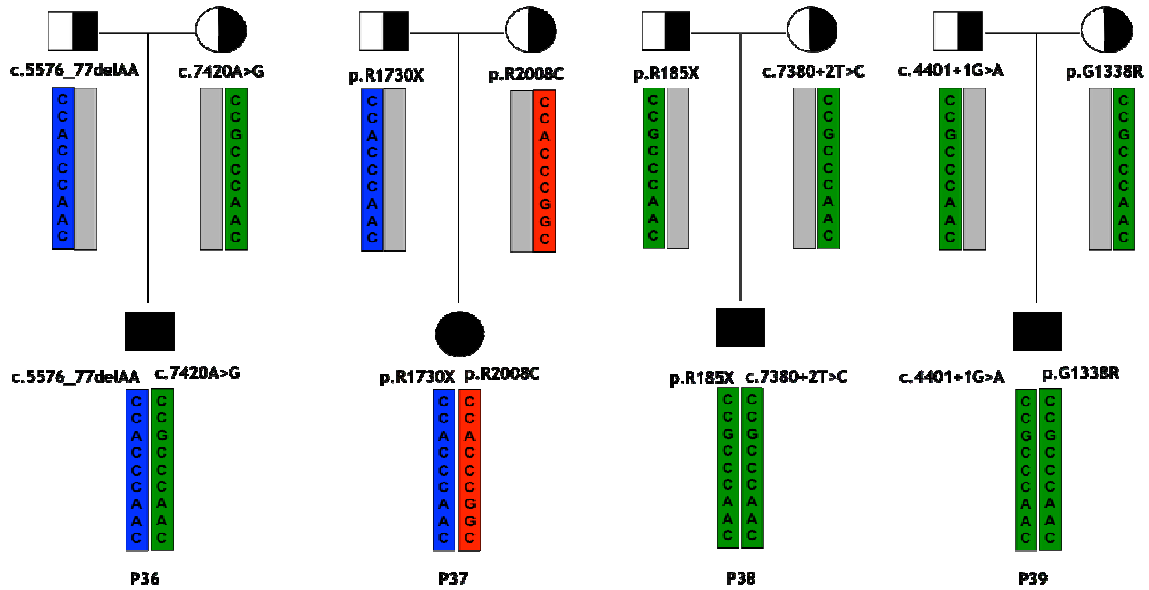


P31-32: Pacientes femeninas, hermanas portadoras de la mutación c.325insGC en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.2 y de la mutación c.3277-1G>C en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.15.

P33: Paciente masculino portador de la mutación p.Y1098X en homocigosis y cosegregación con el haplotipo Hi.7 en ambos alelos. Progenitores consanguíneos.

P34: Paciente masculino portador de la mutación p.G2722V en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.14. La segunda mutación no ha sido descrita, alelo portador del haplotipo Hi.4, herencia paterna.

P35: Paciente femenino portador de la mutación p.R2622W en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.1 y de la mutación p.R185X en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.1.

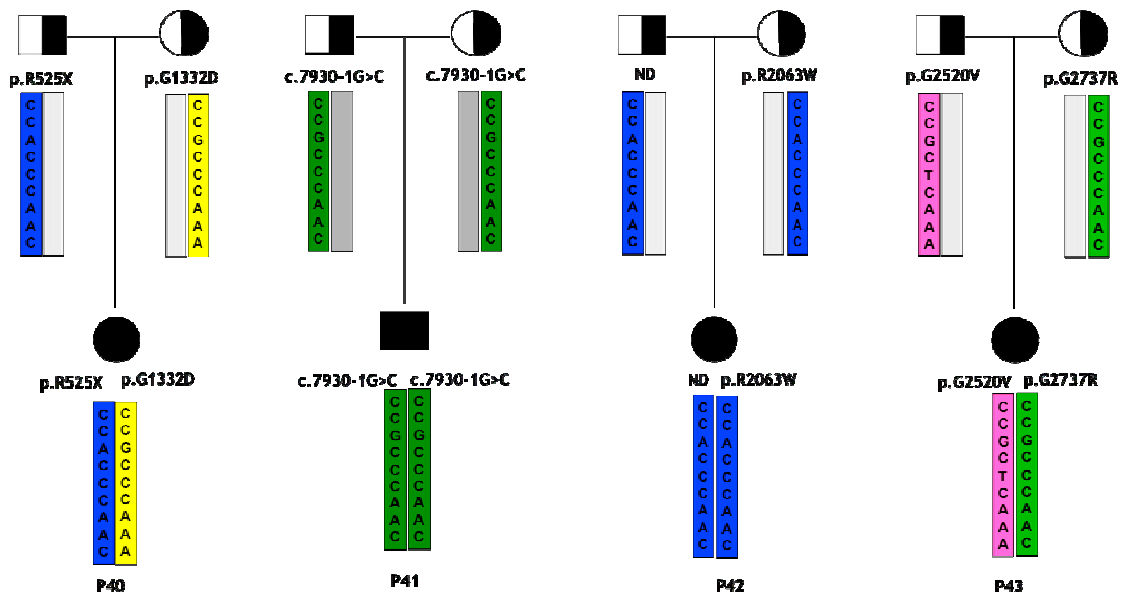


P36: Paciente masculino portador de la mutación c.5576delAA en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.2 y de la mutación c.7420A>G en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.1.

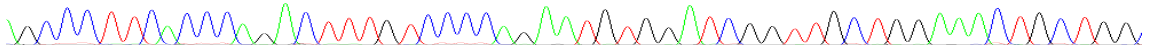
P37: Paciente femenino portador de la mutación p.R2808C en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.3 y de la mutación p.R1730X en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.2.

P38: Paciente masculino portador de la mutación p.R185X en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.1 y de la mutación c.7380+2T>C en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.1.

P39: Paciente masculino portador de la mutación c.4401+1G>A en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.1 y de la mutación p.G1338R en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.1.



Resultados

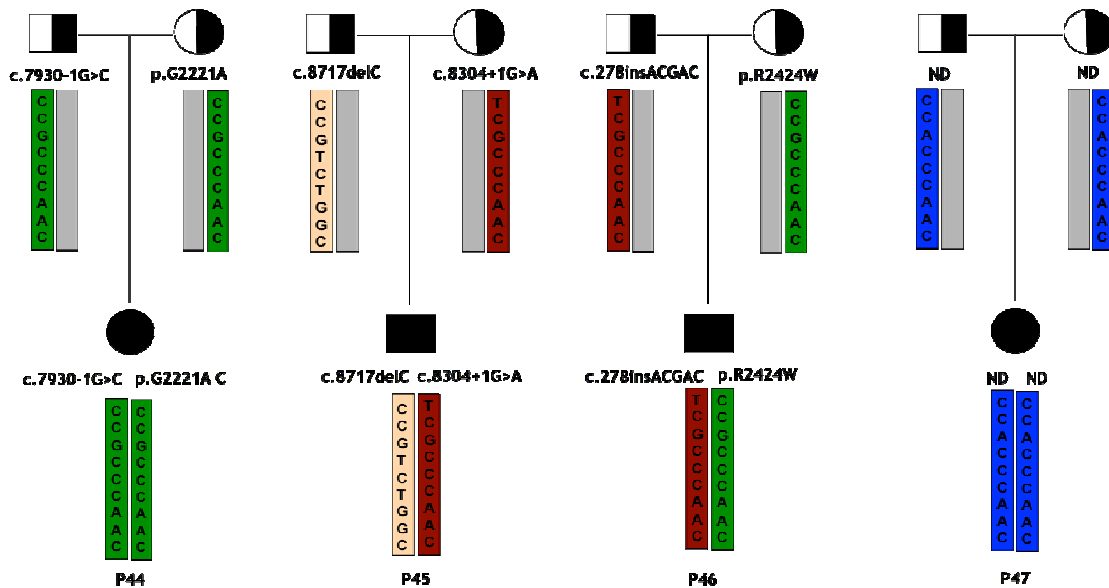


P40: Paciente femenino portador de la mutación p.525X en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.2 y de la mutación p.G1332D en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.4.

P41: Paciente masculino portador de la mutación c.7930-1G>C en homocigosis y cosegregación con el haplotipo Hi.1 en ambos alelos.

P42: Paciente femenino portador de la mutación p.R2063W en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.2. La segunda mutación no ha sido descrita, alelo portador del haplotipo Hi.2, herencia paterna.

P43: Paciente femenino portador de la mutación p.G2520V en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.5 y de la mutación p.G2737X en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.1.



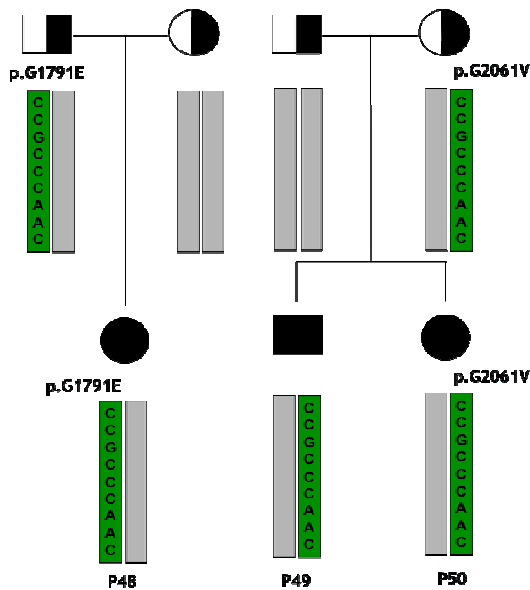
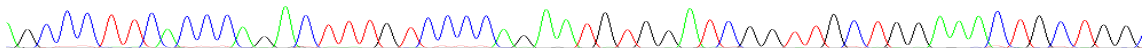
P44: Paciente femenino portador de la mutación c.7930-1G>C en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.1 y de la mutación c.G2221A en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.1.

P45: Paciente masculino portador de la mutación c.8717delC en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.14 y de la mutación c.8304+1G>A en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.7.

P46: Paciente masculino portador de la mutación c.2781insACGAC en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.7 y de la mutación p.R2424W en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.1.

P47: Paciente femenino portador del haplotipo Hi.2 en homocigosis. No se ha podido describir mutación en ninguno de los alelos.

Resultados



P48: Paciente masculino portador de la mutación p.G1791E en heterocigosis, herencia paterna y cosegregación con el haplotipo Hi.1. Mutación dominante, segundo alelo sano.

P49-p50: Pacientes masculino y femenino hermanos portadores de la mutación p.G2061V en heterocigosis, herencia materna y cosegregación con el haplotipo Hi.1. Mutación dominante, segundo alelo sano.

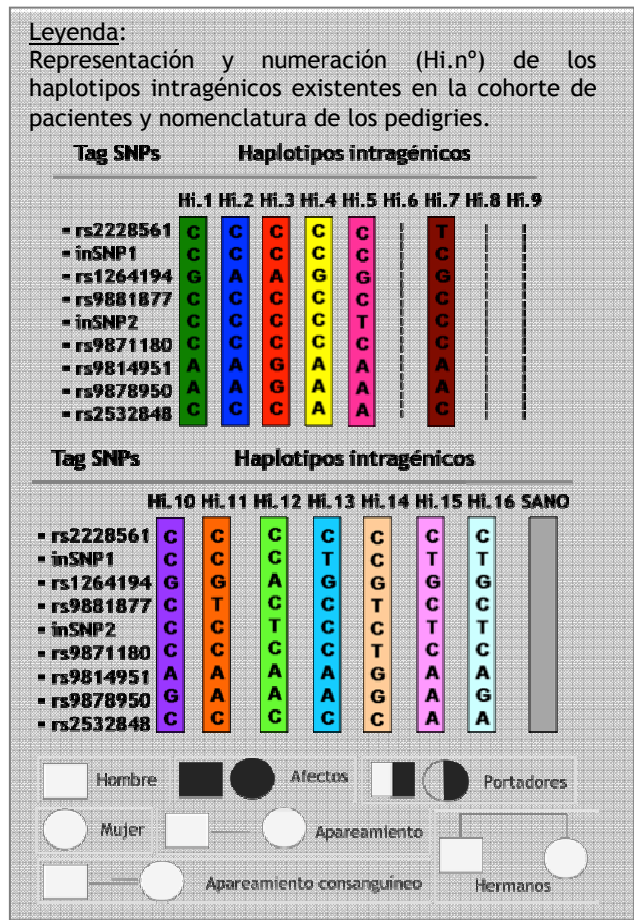
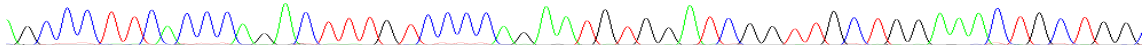


Figura 24: Árboles genealógicos de los 50 pacientes con EBD. Representación de la cosegregación de las mutaciones y de los haplotipos intragénicos presente en el gen COL7A1 para cada familia. En cada pedigrí puede observarse la herencia que recibe el paciente de sus progenitores. "ND" mutación No descrita.



2.1.1. Identificación de haplotipos intragénicos y cosegregación con mutaciones en *COL7A1*

Teniendo en cuenta los dos bloques de LD localizados en el gen *COL7A1* (figuras 12 y 13), se determinaron 12 haplotipos diferentes en los pacientes con EBD (tabla 18) y 13 haplotipos en la población española (tabla 19).

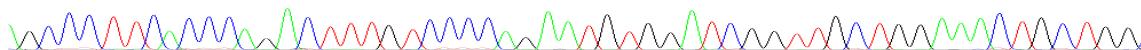
La distribución de los haplotipos es significativamente diferente entre pacientes y población control. Los haplotipos Hi.6, Hi.8, Hi.9 y Hi.12 están presentes en la población control pero no en los pacientes. Los haplotipos Hi.15 y Hi.16 están presentes en los pacientes y no en la población control (tabla 18 y 19).

Un total de 39 alelos que expresan la mutación c.6527insC cosegregan exclusivamente con el haplotipo Hi.5 (CCGCTCAAA) (tabla 18). La frecuencia de este haplotipo en la población control es de 7.81 % (tabla 19). Esta frecuencia es mucho más baja que en los pacientes con EBD españoles ya que este haplotipo Hi.5 cosegrega con la mutación más recurrente encontrada en nuestra cohorte y sin embargo no es el haplotipo más frecuente en la población española. La mutación c.6527insC y el haplotipo Hi.5 se heredan en bloque (CCGCTCAAA_c.6527insC) de generación en generación ya que no se ha encontrado esta mutación asociada a ningún otro haplotipo. Sin embargo, si se ha encontrado en el paciente p43 este haplotipo cosegregando con la mutación p.G2520V (tabla 18).

El haplotipo Hi.1 (CCGCCAAC) es el considerado WT en la población española (tabla 18) y está presente en un 25 % (tabla 19). Este haplotipo en nuestra cohorte de pacientes cosegrega de modo independiente con 3 mutaciones sin sentido, 9 cambios de aminoácido, 4 intrónicas y 1 inserción (tabla 18).

El haplotipo Hi.2 (CCACCCAAC) solo difiere del haplotipo H1 en el SNP rs1264194 (exón 21 del gen *COL7A1*). Su frecuencia alélica es del 14.85 %, la segunda más alta en la población española (tabla 19). Este haplotipo tampoco está asociado a ninguna mutación en particular, ya que cosegrega independientemente con 2 mutaciones sin sentido, 2 cambios de aminoácido, 1 intrónica, 1 delección y 1 inserción (tabla 18).

Resultados



El haplotipo Hi.3 (CCACCCGGC) con una frecuencia del 10.94 % en la población española, cosegrega tan solo con 2 mutaciones de cambio de aminoácido en nuestra cohorte de pacientes, p.G2434R y p.R2808C (tablas 18 y 19).

El haplotipo Hi.4 (CCGCCAAA), con una frecuencia del 9.38 % en la población control, cosegrega con mutaciones de sustituciones de glicina, las más comunes en esta enfermedad, y 1 mutación sin sentido, p.R525X (tablas 18 y 19) Esta última mutación es la única mutación presente en nuestra cohorte de pacientes que cosegrega con dos haplotipos diferentes (Hi.2 y Hi.4) (tablas 18 y 19).

El haplotipo Hi.7 (TCGCCAAC) aparece asociado a tres mutaciones diferentes, 1 sin sentido, 1 inserción y 1 intrónica y en la población española aparece en un 5.47 % de frecuencia (tablas 18 y 19).

El haplotipo Hi.10 (CCGCCAGC) cosegrega exclusivamente con una única mutación c.58del13 y se encuentra en baja frecuencia en la población control (2.34 %) (tablas 18 y 19). Esta delección ha sido encontrada solo en nuestra cohorte de pacientes españoles y en una única familia por lo que es imposible conocer si la mutación es exclusiva de este haplotipo (tablas 18 y 19).

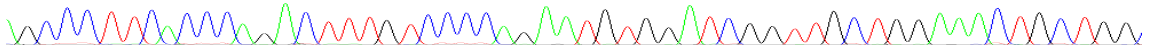
El haplotipo Hi.11 (CCGTCCAAC) con una frecuencia inferior al 3 % en la población control, cosegregan con sustituciones de glicina, las más comunes en esta enfermedad (tablas 18 y 19).

El haplotipo Hi.13 (CTGCCAAC) con una frecuencia del 1.56 % en la población control, cosegrega con una única mutación intrónica en pacientes (tablas 18 y 19).

El haplotipo Hi.14 (CCGTCTGGC) cosegrega con tres mutaciones diferentes, 1 cambio de aminoácido, 1 sin sentido y 1 delección, sin embargo se encuentra en muy baja frecuencia en la población control (0.78 %) (tablas 18 y 19).

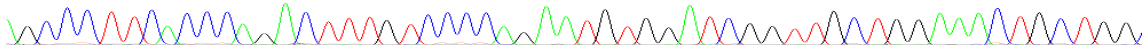
Los haplotipos Hi.15 (CTGCTCAA) no está presente en la población control española, sin embargo cosegrega en la cohorte en estudio con 1 inserción y 1 mutación intrónica (tablas 18 y 19).

Resultados



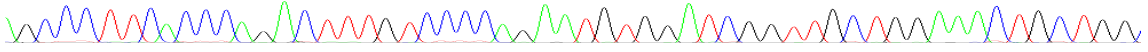
El haplotipo Hi.16 (CTGCTCAGA), en el cual no se han identificado ninguna mutación, aparece solo en un paciente p29 y no está presente en la población control (tablas 18 y 19).

En resumen, se ha realizado el estudio de cosegregación y análisis de haplotipos a un total de 42 mutaciones, de las cuales, 17 son nuevas (16.67 %). En 7 alelos no se han podido identificar ninguna mutación. Las mutaciones encontradas en nuestra cohorte de pacientes son 5 inserciones, 3 deleciones, 8 mutaciones sin sentido, 18 cambios de aminoácido y 8 intrónicas (tabla 18).



Haplotipos	Mutaciones en gen COL7A1	Bloque 2					Bloque 1										
		rs	In	In	rs	In	rs	In	In	rs	rs						
HI.1	p.Y112X (1), p.R185X (2), p.G1338R (1), p.G1791E (1), p.R1814C (1), p.G2061Y (2), p.R2424W (1), p.G2587D (1), p.R2622W (1), p.G2737X (1), c.267-3C>G (2), c.4401+1G>A (1), p.G2221A (1), c.7420A>G (1), c.7930-1G>C (3), c.7380+2T>C (1), c.7756insC (1)	2228561	SNP1	1264194	rs	1264194	rs	9881877	rs	SNP2	9871180	rs	9814951	rs	9878950	rs	2532848
HI.2	p.R525X (1), p.R1730X (1), p.R2063W (1), c.7104+5G>A (1), p.G1383R (1) c.5576delAA (1), c.325insGC (2), ND(3)	C	C	A	A	C	C	C	C	C	C	A	A	A	A	C	
HI.3	p.G2434R (1), p.R2808C (1)	C	C	A	A	C	C	C	C	C	C	G	G	G	G	C	
HI.4	p.G1332D (1), c.R525X (1), p.G2224X (1), ND(1)	C	C	G	G	C	C	C	C	C	C	A	A	A	A	A	
HI.5	c.6527insC (39), p.G2520V (1)	C	C	G	G	C	T	C	C	T	C	A	A	A	A	A	
HI.6	-	C	C	G	G	C	T	C	C	T	C	A	A	A	A	C	
HI.7	p.Y1098X (2), c.2781insACGAC (1), c.8304+1G>A (1)	T	C	G	G	C	C	C	C	C	C	A	A	A	A	C	
HI.8	-	C	C	G	G	C	C	C	C	C	C	G	G	G	G	C	
HI.9	-	C	-	A	A	C	C	C	C	C	C	A	A	G	G	C	
HI.10	c.58del13 (1)	C	C	G	G	C	C	C	C	C	C	A	A	G	G	C	
HI.11	p.G2366D (1), p.G2114D (1)	C	C	G	G	T	C	C	C	C	C	A	A	A	A	C	

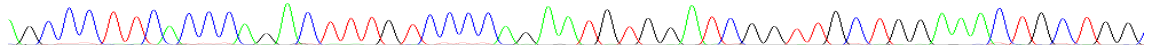
Resultados



Hi.12	-	C	T	A	C	T	C	A	A	C
Hi.13	c.7929+2T>C (1)	C	T	G	C	C	C	A	A	C
Hi.14	p.G2722V (1), c.8717delC (1), p.R1683X (1), ND (1).	C	C	G	T	C	T	G	G	C
Hi.15	c.5131insCTCAC (2), c.3277-1G>C (2)	C	T	G	C	T	C	A	A	A
Hi.16	ND (2)	C	T	G	C	T	C	A	G	A

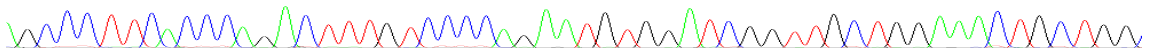
Tabla 18: Haplotipos intragénicos descritos en pacientes con EBD españoles y las mutaciones asociadas a ellos. El número que está entre paréntesis refleja el número de alelos portadores de esa mutación. Modificado de (Cuadrado-Corrales et al.)

Resultados



Haplotipos	Bloque 2										Bloque 1				Frecuencia Haplotipos (%)
	rs 2228561	ln SNP1	rs 1264194	rs 9881877	ln SNP2	rs 9871180	rs 9814951	rs 9878950	rs 2532848	rs					
Hi.1	C	C	G	C	C	C	A	A	C	C	A	A	C	25.00	
Hi.2	C	C	A	C	C	C	A	A	C	C	A	A	C	14.85	
Hi.3	C	C	A	C	C	C	G	G	C	C	G	G	C	10.94	
Hi.4	C	C	G	C	C	C	A	A	C	C	A	A	A	9.38	
Hi.5	C	C	G	C	T	C	A	A	C	C	A	A	A	7.81	
Hi.6	C	C	G	C	T	C	A	A	C	C	A	A	C	7.03	
Hi.7	T	C	G	C	C	C	A	A	C	C	A	A	C	5.47	
Hi.8	C	C	G	C	C	C	G	G	C	C	G	G	C	5.47	
Hi.9	C	-	A	C	C	C	A	A	C	C	G	G	C	4.69	
Hi.10	C	C	G	C	C	C	A	A	C	C	G	G	C	2.34	
Hi.11	C	C	G	T	C	C	A	A	C	C	A	A	C	2.34	
Hi.12	C	T	A	C	T	C	A	A	C	C	A	A	C	2.34	
Hi.13	C	T	G	C	C	C	A	A	C	C	A	A	C	1.56	
Hi.14	C	C	G	T	C	T	G	G	C	C	G	G	C	0.78	
Hi.15	C	T	G	C	T	C	A	A	C	C	A	A	A	0	
Hi.16	C	T	G	C	T	C	A	A	C	C	G	G	A	0	

Tabla 19: Haplotipos intragénicos descritos en controles españoles y sus frecuencias alélicas. Modificado de (Cuadrado-Corrales et al.)



2.1.1.1. Análisis de cosegregación haplotípica en un caso clínico de mutación *de novo*.

Paciente español afectado con una EBDR sev gen presenta una delección de varias Citosinas (c.6266CCCC) en heterocigosis combinada con una mutación sin sentido recurrente (p.R1763X) (Kern et al. 2009).

Mujer de 38 años de edad cuando se le realizó el estudio (2011), nacida de padres no consanguíneos y sin una historia familiar de desórdenes de piel. Presentaba ampollas cutáneas generalizadas desde el nacimiento y la presencia de pseudosindactilia en manos y pies desde la temprana infancia consistente con diagnóstico de EBDR sev gen (figura 25a-d). El análisis oral reveló ulceraciones, anquiloglosia, excesivas caries, pérdida prematura de los dientes y microstomía (figura 25e). El examen oftálmico mostró ampollas, erosiones y cicatrices de la córnea (figura 25f). La paciente exhibía estenosis exofágica y anemia crónica.

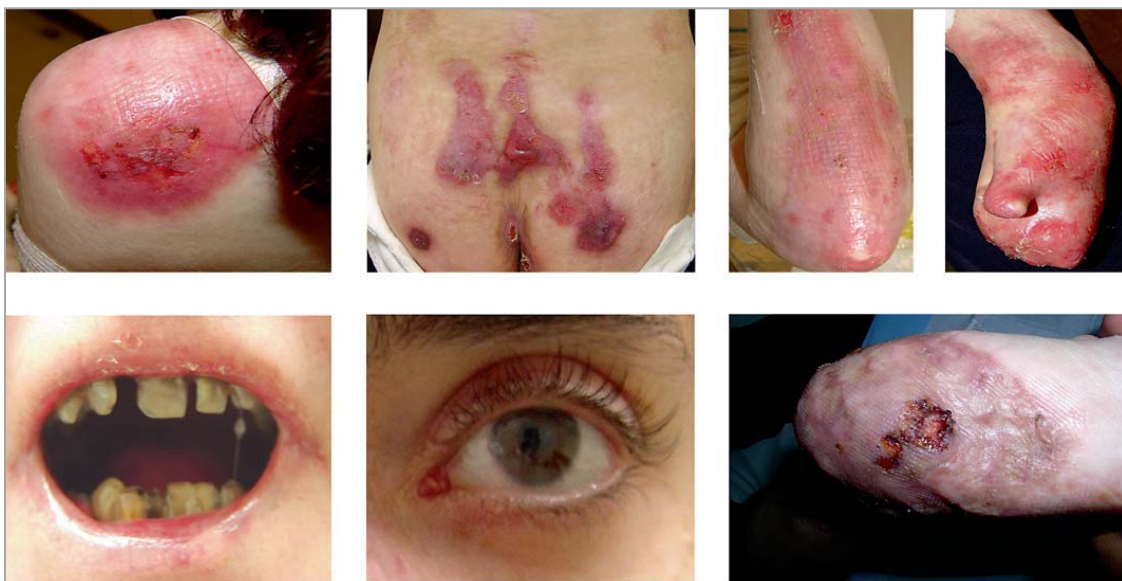
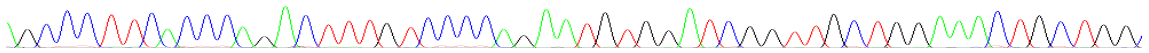


Figura 25: Características clínicas e histopatológicas del paciente. (a) Ampollas cutáneas características con cicatrización atrófica en el hombro izquierdo. (b) Zona sacra. (c) Antebrazo. (d) Pseudosindactilia y malformación de la mano izquierda. (e) microstomía grave con malformaciones dentales y caries. (f) Hallazgos oculares: cicatrización corneal y formación de ampollas en el párpado inferior (g) Carcinoma en el muñon derecho (Cuadrado-Corrales et al. 2010a).

Resultados



El examen histológico rutinario de una biopsia de piel mostró ampollas subcutáneas y la inmunofluorescencia ausencia total de proteín Col VII de acuerdo con la presentación clínica (Cuadrado-Corrales et al. 2010a). Desde los 33 años de edad, la paciente fue objeto de repetidas intervenciones quirúrgicas de carcinomas primarios recurrentes de células escamosas, en ambas manos y brazos (figura 25g) así como de la pierna y pie izquierdos como usualmente se describe en pacientes con EBDR.

La paciente es portadora heterocigota de la mutación R1763X localizada en el exón 60 y de la mutación c.6266delCCCC localizada en el exón 75 (figura 26.a). Ambas mutaciones dan lugar a un PTC en el gen *COL7A1*.

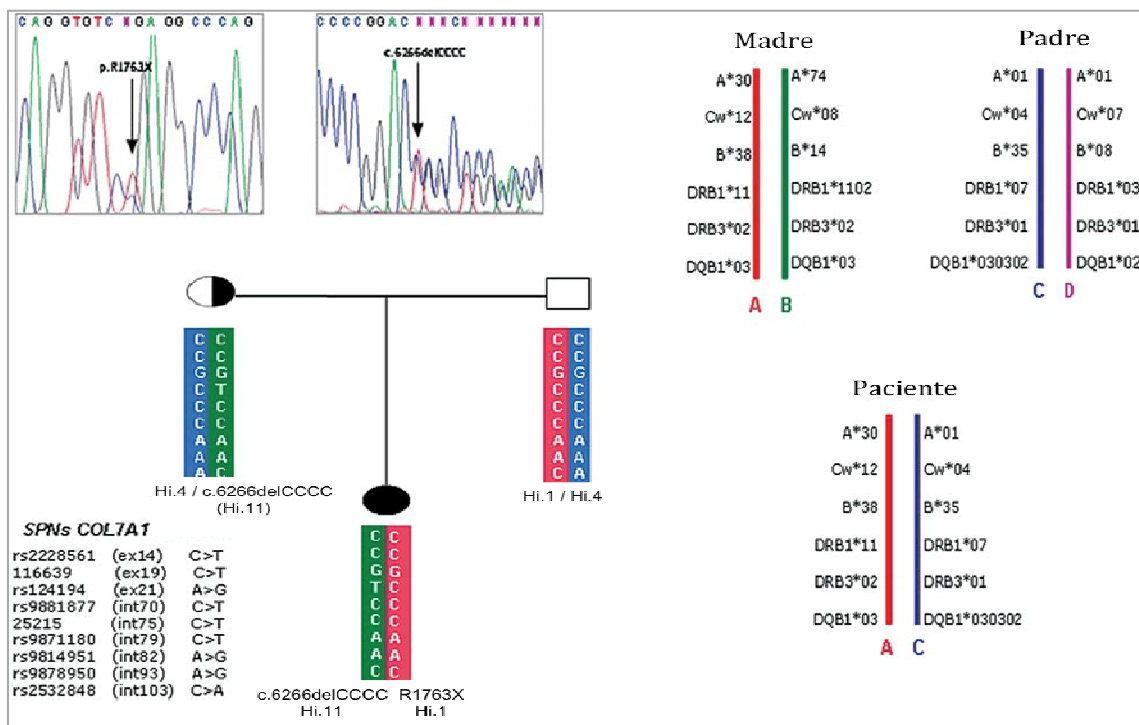
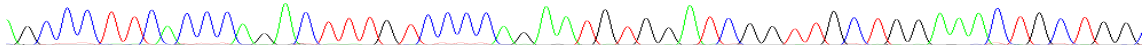


Figura 26: Cromatogramas de las secuencias portadoras de las mutaciones c.6266delCCCC y R1763X, haplotipos para el HLA y haplotipo de SNPs intragénicos del gen *COL7A1*.

Adicionalmente, el análisis de mutaciones en los progenitores de la paciente, reveló que la madre era portadora de la mutación c.6266delCCCC. Esta delección ha sido reportada con anterioridad en la cohorte de pacientes españoles (Escamez et al. 2010). Sin embargo, la segunda mutación causante de la enfermedad no se ha dado a conocer en pacientes españoles hasta este momento. Esta segunda mutación,

Resultados



R1763X, no está presente en el padre por lo que sugiere que se trata de una mutación *de novo* presente en el alelo paterno de la paciente.

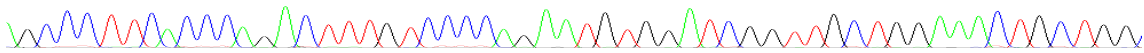
Se confirmó la paternidad tanto por el análisis de haplotipos para el Antígenos de Leucocitos Humanos (HLA del inglés, *Human leukocyte antigen*) (figura 26b) como por el de haplotipos de los tag SNPs intragénicos del gen COL7A1. (figura 26c)

En los haplotipos de SNPs intragénicos del gen COL7A1 (figura 26c) se observa una cosegregación de la mutación c.6266delCCCC con el haplotipo Hi.11 y de la mutación R1763X con el haplotipo Hi.1. El haplotipo Hi.1 presente en el padre no cosegrega con la mutación R1763X por no ser portador de dicha mutación. Confirmada la paternidad, mediante este análisis se demuestra la presencia de la mutación R1763X en el paciente como evento *de novo*.

3. Haplotipos extragénicos a COL7A1

Tras observar la cosegregación única de la mutación c.6527insC con el haplotipo intragénico Hi.5 (c.6527insC_CCGCTCAA) (tabla 18), se incrementó el segmento de estudio a 2 centimorgans (cM) mediante la construcción de haplotipos extragénicos al gen COL7A1, seleccionando tag SNPs flanqueantes al gen. Es posible estimar la edad de una mutación mediante la asociación no aleatoria de ésta con una colección de marcadores (tag SNPs) también asociados entre sí. En el momento en que aparece la mutación, se parte de un haplotipo ancestral único que con el tiempo puede ser modificado dado por las recombinaciones que se van acumulando a lo largo del tiempo entre los individuos portadores (Reich and Goldstein). De ese modo, el conocimiento tanto del tamaño del fragmento de ADN compartido por todos los portadores actuales de la mutación c.6527insC, como de las frecuencias alélicas de los diferentes haplotipos que cosegregan con dicha mutación, son un punto clave para datar tanto la antigüedad del primer evento mutacional, como la del ancestro común más reciente de los portadores de c.6527insC.

Se realizó la búsqueda de tag SNPs extragénicos al gen COL7A1 alejándonos 1 Mb hacia el extremo 5' y 1 Mb hacia el extremo 3'. (5.2 de Material y métodos, figura 15) obteniendo un total de 23 tag SNPs a analizar en alelos portadores de la inserción.

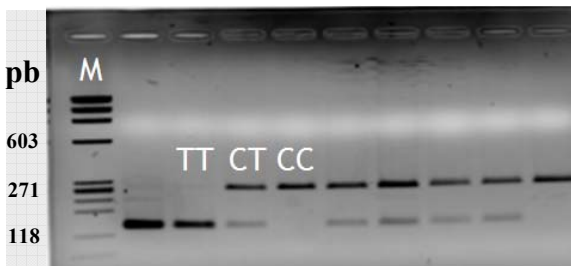


3.1. Identificación de tag SNPs extragénicos al gen *COL7A1*

3.1.1. Tag SNPs extragénicos en alelos portadores de c.6527insC

Este estudio se ha llevado a cabo en los pacientes portadores de c.6527insC_CCGCTCAA para la posterior selección de los tag SNPs que muestran un patrón de segregación diferente entre los alelos portadores de la inserción. Los SNPs en los que los portadores no presentaron diferencias, han sido descartados por no aportar información al estudio.

Mediante digestiones enzimáticas (tabla 13) se han analizado 14 de los 23 tag SNPs extragénicos (rs13059519, rs11716779, rs17785248, rs17079785, rs777016, rs319690, rs11707679, rs6787500, rs11130171, rs4858819, rs1264194, rs4858800, rs4974078 y rs6784820) en 28 pacientes portadores del haplotipo c.6527insC_CCGCTCAA. En la figura 27 se muestran las electroforesis de los fragmentos de restricción obtenidos para los 14 SNPs digeridos con las diferentes enzimas.



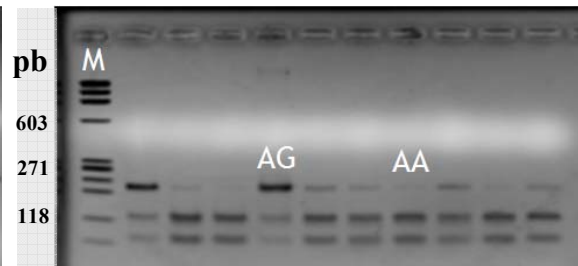
GEL 1: SNP: rs13059519; ENZIMA: Hpy188III

Tamaño de bandas resultantes:

T/T HM: 142 y 136 pb

C/C HM: 279 pb

T/C HT: 279, 142 y 136 pb



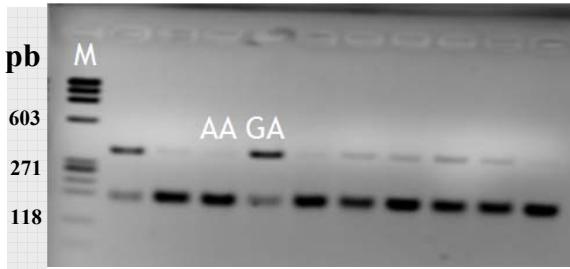
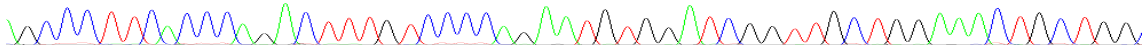
GEL 2: SNP: rs11716779; ENZIMA: NspI

Tamaño de bandas resultantes:

A/A HM: 125 y 81 pb

G/A HT: 206, 125 y 81 pb

Resultados

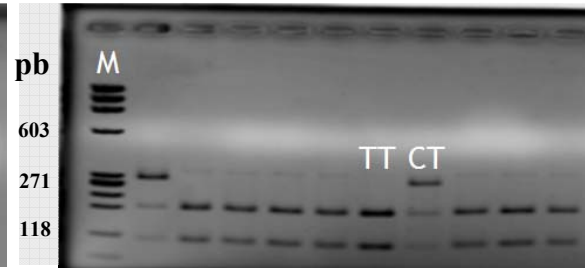


GEL 3: SNP: rs17785248; ENZIMA: NspI

Tamaño de bandas resultantes:

A/A HM: 190 y 177 pb

G/A HT: 367, 190 y 177 pb



GEL 4: SNP: rs17079785; ENZIMA: NspI

Tamaño de bandas resultantes:

T/T HM: 192 y 106 pb

T/C HT: 298, 192 y 106 pb

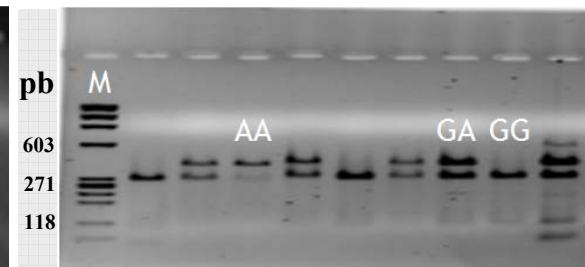


GEL 5: SNP: rs777016; ENZIMA: MseI

Tamaño de bandas resultantes:

G/G HM: 80 y 31 pb

G/A HT: 80, 52 y 31 pb



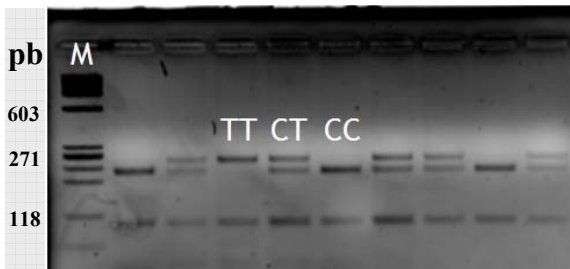
GEL 6: SNP: rs319690; ENZIMA: BseYI

Tamaño de bandas resultantes:

A/A HM: 396 pb

G/G HM: 305 y 101 pb

G/A HT: 396, 101 y 305 pb



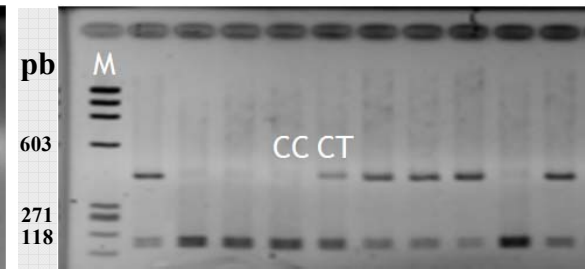
GEL 7: SNP: rs11707679; ENZIMA: NlaIII

Tamaño de bandas resultantes:

T/T HM: y 102 pb

C/C HM: 215 y 101 pb

T/C HT: 252, 215, 102 y 101 pb



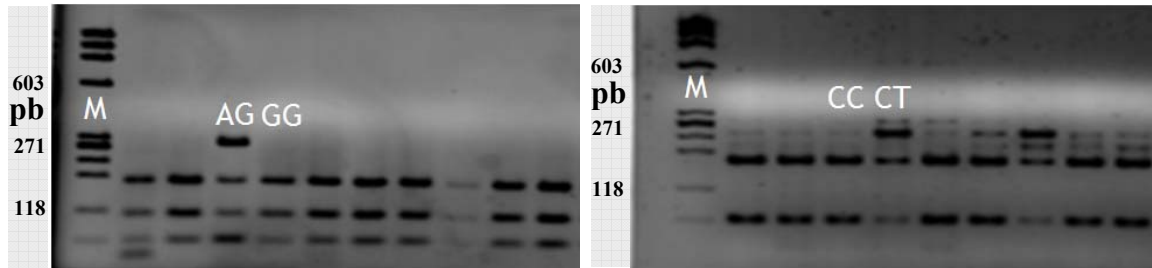
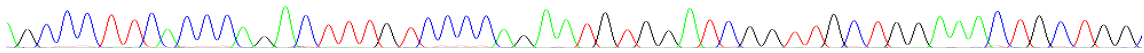
GEL 8: SNP: rs6787500; ENZIMA: AclI

Tamaño de bandas resultantes:

C/C HM: 214 y 207 pb

T/C HT: 421, 214 y 207 pb

Resultados



GEL 9: SNP: rs11130171; ENZIMA: MSPI

Tamaño de bandas resultantes:
A/A HM: 286 y 69 pb
G/G HM: 177, 109 y 69 pb
G/A HT: 286, 177, 109 y 69 pb

GEL 10: SNP: rs4858819; ENZIMA: Acil

Tamaño de bandas resultantes:
C/C HM: 169 y 73 pb
T/C HT: 242, 169 y 73 pb

Figura 27: Imágenes de geles de agarosa obtenidos tras el análisis de RFLP para los 14 SNPs analizados mediante digestiones enzimáticas en portadores de la mutación c.6527insC. En el apartado 7.3 de material y métodos se muestra la zona de restricción de cada enzima. (M) Marcador: marcador de peso molecular IX (72-1353 pb) de Roche. (pb) Tamaño, en pares de bases, de las bandas obtenidas con el marcador de peso molecular. (A) Adenina, (T) Timina, (C) Citosina, (G) Guanina. HM y HT: patrón homocigoto o heterocigoto de cada alelo analizado.

En 5 de los 14 SNPs analizados mediante digestiones enzimáticas (rs13059519, rs319690, rs6787500, rs6784820 y rs11707679), se han observado patrones de segregación diferentes entre los alelos portadores de la mutación c.6527insC.

En los 9 SNPs restantes se ha observado el mismo patrón de segregación entre los alelos portadores de la inserción c.6527insC. En la figura 27, en los geles que muestran los cortes enzimáticos para estos 9 SNPS, cuando se observa un genotipo heterocigoto, el alelo no presente en el genotipo homocigoto es segregado por el alelo no portador de la mutación c.6527insC en los pacientes heterocigotos.

Mediante secuenciación automática se han analizado 9 de los 23 tag SNPs extragénicos (rs4858825, rs319685, rs124486033, rs6800730, rs6442112, rs12486944, rs4558783, rs9311428 y rs4955411) en los 28 pacientes portadores de c.6527insC_CCGCTCAA (figura 28).

Resultados

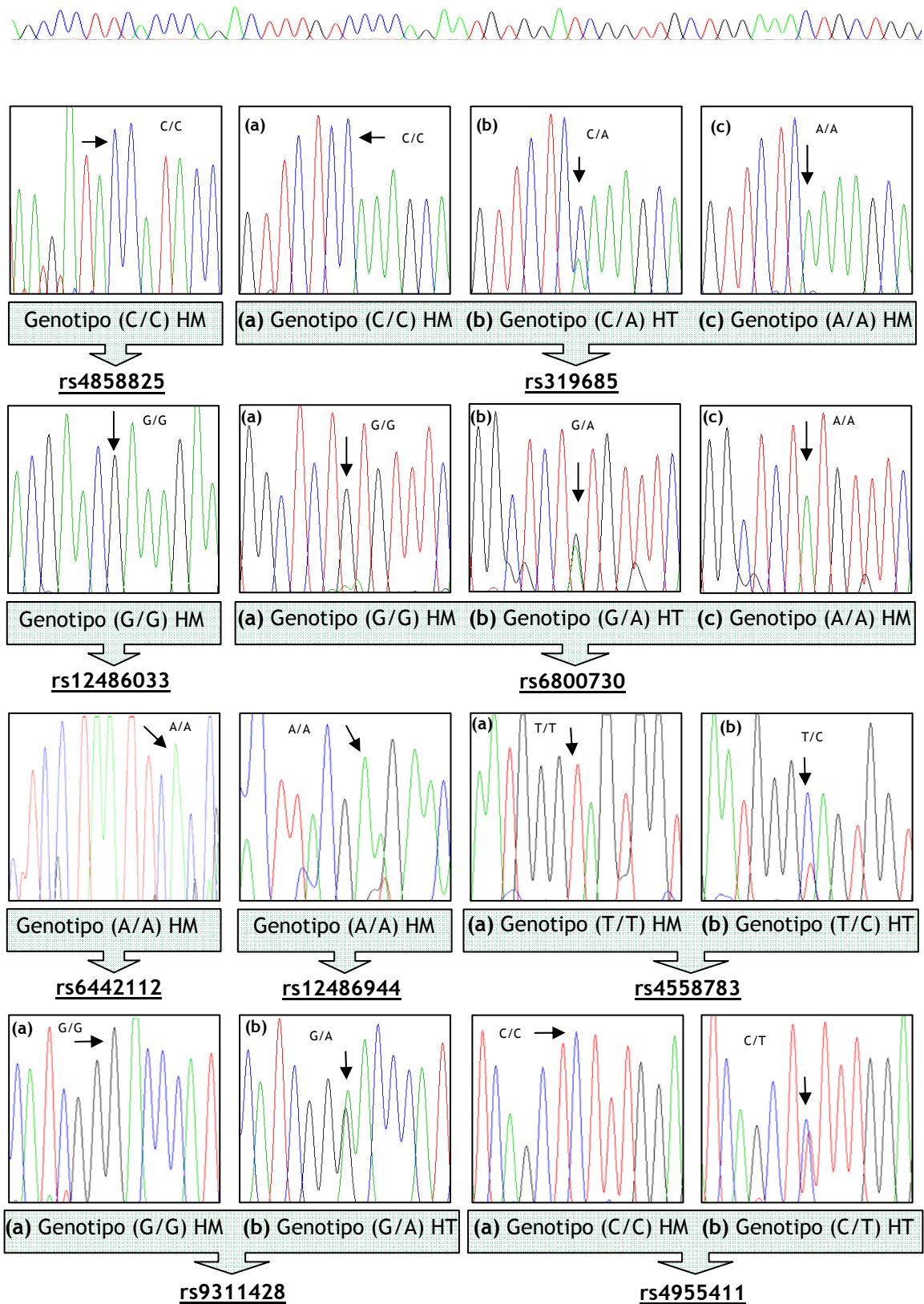
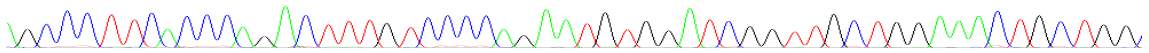


Figura 28: Cromatogramas obtenidos en el análisis de 9 de los 14 tag SNPs extragénicos. (C) Citosina. (A) Adenina. (T) Timina. (G) Guanina. HT y HM: patrón homocigoto o heterocigoto que casa alelo analizado.

En 2 de los 9 SNPs analizados por secuenciación automática (rs319685, rs6800730) se han observado patrones de segregación diferentes entre los alelos portadores de la mutación c.6527insC.

Resultados



En los 7 SNPs restantes se ha observado el mismo patrón de segregación entre los alelos portadores de la inserción c.6527insC. En la figura 28, en los cromatogramas de estos 7 SNPs, cuando se observa un patrón de segregación heterocigoto se debe a que el alelo no presente en el genotipo homocigoto es segregado por el alelo no portador de la mutación c.6527insC en pacientes heterocigotos (figura 28).

Un total de 7 tag SNPs analizados por digestiones y secuenciación (rs13059519, rs319690, rs319685, rs11707679, rs6800730, rs6787500, rs6784820) mostraban patrones de segregación diferentes entre los portadores de la mutación c.6527insC.

3.1.2. Selección de Tag SNPs extragénicos para construcción de haplotipos

Para la construcción de haplotipos extragénicos al gen *COL7A1*, se han seleccionado los 7 tag SNPs (rs13059519, rs319690, rs319685, rs11707679, rs6800730, rs6787500, rs6784820) que mostraban un patrón de segregación diferente entre los alelos portadores de la inserción c.6527insC (figura 29).

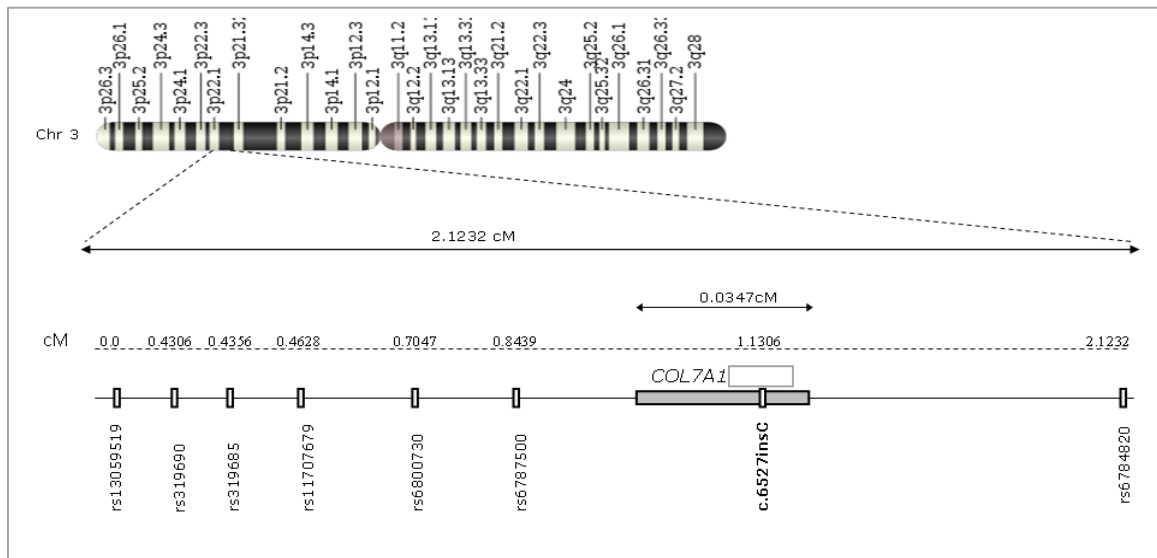
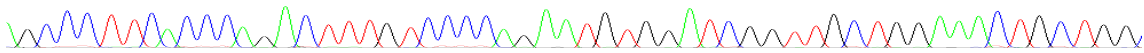


Figura 29: Distribución y localización en torno al gen *COL7A1* de los 7 tag SNPs seleccionados para la construcción de haplotipos extragénicos. En la figura se observa el tamaño del fragmento a analizar (2.1232 cM) y el tamaño del gen *COL7A1* (0.034cM). También se observa la posición en el cromosoma 3 del fragmento analizado (3p21) (Sanchez-Jimeno et al. 2012).

Esta diferencia en la segregación marca los puntos de recombinación existentes entre alelos portadores de c.6527insC_CCGCTCAA. El resto de SNPs fueron descartados porque no aportaban información al estudio.



3.1.3. Separación de alelos en portadores de c.6527insC

La correcta separación de alelos para la posterior construcción de haplotipos extragénicos necesita del análisis de los 7 tag SNPs extragénicos en los progenitores de los portadores de la inserción c.6527insC. Mediante RFLPs y secuenciación automática, se han analizado estos 7 tag SNPs seleccionados, obteniendo imágenes como las de las figuras 27 y 28.

Tras el análisis de los 7 tag SNPs en los progenitores, ha sido posible la separación de alelos en 25 de los 28 pacientes portadores de la inserción c.6527insC, de los cuales 11 son homocigotos (22 alelos) y 14 son heterocigotos (14 alelos), un total de 36 alelos o cromosomas.

3.1.4. Tag SNPs extragénicos en población control española

Cinco de los 7 tag SNPs extragénicos seleccionados finalmente (rs13059519, rs319690, rs11707679, rs6787500, rs6784820), se han analizado mediante digestiones enzimáticas en 50 tríos de padre-madre-hijo de la población control española (Figura 27: Gel 1: rs13059519; Gel 6: rs319690; Gel 7: rs11707679; Gel 8: rs6787500; Gel 14: rs6784820). Los otros 2 tag SNPs restantes (rs6800730, rs319685) se han analizado mediante secuenciación automática en los 50 tríos padre-madre-hijo de la población control española (Figura 28).

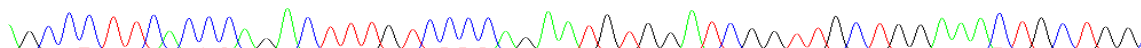
Tras el análisis de estos 7 tag SNPs en la población control, se pudo realizar la correcta separación de alelos en 48 de los 50 tríos control.

3.2. Frecuencias alélicas y genotípicas de los 7 tag SNPs extragénicos

En las tablas 20 y 21 se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas de los 7 tag SNPs extragénicos para los pacientes portadores de la mutación c.6527insC y población control.

Se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas en los 25 pacientes teniendo sólo en cuenta los alelos portadores de la mutación c.6527insC (grupo 1) y por otro lado, teniendo en cuenta todos los alelos (portadores y no portadores de c.6527insC) de los 25 pacientes (grupo 2)

Resultados



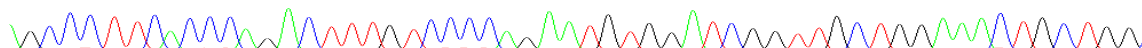
Se observa una distribución de las frecuencias alélicas diferente entre los controles y los pacientes. En 6 de los 7 tag SNPs (rs13059519, rs319690, rs319685, rs1170767, rs6800730, rs6784820) el alelo más frecuente en pacientes (74-97 %) es el menos frecuente en controles (31-37 %) (tabla 20). Sin embargo, para el SNP rs6787500, la distribución de las frecuencias alélicas en pacientes y controles, es similar.

SNP	Frecuencias Alélicas			
		Pacientes		Controles
		Grupo 1	Grupo 2	
rs13059519	C	91.67% (33/36)	74% (37/50)	34.78% (33/96)
	T	8.33% (3/36)	26% (13/50)	65.22% (63/96)
rs319690	G	94.44% (34/36)	76% (38/50)	32.29% (31/96)
	A	5.56% (2/36)	24% (12/50)	67.71% (65/96)
rs319685	A	94.44% (34/36)	76% (38/50)	31.25% (30/96)
	C	5.56% (2/36)	24% (12/50)	68.75% (66/96)
rs1170767	C	94.44% (34/36)	76% (38/50)	33.33% (32/96)
	T	5.56% (2/36)	24% (12/50)	66.67% (64/96)
rs6800730	A	97.22% (35/36)	78% (39/50)	36.46% (35/96)
	G	2.78% (1/36)	22% (11/50)	63.54% (61/96)
rs6787500	C	96.67% (33/36)	74% (37/50)	62.50% (60/96)
	T	8.33% (3/36)	26% (13/50)	37.5% (36/96)
rs6784820	G	94.44% (34/36)	76% (38/50)	41.67% (40/96)
	A	5.56% (2/36)	24% (12/50)	58.33% (56/96)

Tabla 20: Frecuencias alélicas de los 7 tag SNPs extragénicos seleccionados para la construcción de haplotipos. Grupo 1: alelos portadores exclusivamente de la mutación c.6527insC de los 25 pacientes analizados. Grupo 2: alelos portadores de la mutación c.6527insC y de otras mutaciones de los 25 pacientes analizados.

Las frecuencias genotípicas en pacientes portadores de la mutación c.6527insC también fueron comparadas con el grupo control. Para 6 de los 7 tag SNPs rs13059519, rs319690, rs319685, rs1170767, rs6800730, rs6784820 las frecuencias genotípicas entre pacientes y controles son diferentes (tabla 21), sin embargo para el

Resultados

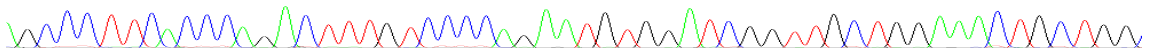


tag SNP rs6787500 las frecuencias genotípicas de los pacientes y controles son similares.

SNP	Frecuencias Genotípicas								
	Pacientes						Controles		
	Portadores HM de c.6527insC			Portadores HM y HT de c.6527insC					
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
rs13059519	81.82% (9/11)	18.18% (2/11)	0% (0/11)	48% (12/25)	52% (13/25)	0% (0/25)	16.66% (8/48)	35.42% (17/48)	47.92% (23/48)
rs319690	GG 81.82% (9/11)	GA 18.18% (2/11)	AA 0% (0/11)	GG 52% (13/25)	GA 48% (12/25)	AA 0% (0/25)	GG 8.33% (4/48)	GA 47.92% (23/48)	AA 43.75% (21/48)
rs319685	AA 81.82% (9/11)	AC 18.18% (2/11)	CC 0% (0/11)	AA 52% (13/25)	AC 48% (12/25)	CC 0% (0/25)	AA % (3/48)	AC % (24/48)	CC % (21/48)
rs1170767	CC 81.82% (9/11)	CT 18.18% (2/11)	TT 0% (0/11)	CC 52% (13/25)	CT 48% (12/25)	TT 0% (0/25)	CC 4.16% (2/48)	CT 60.42% (29/48)	TT 35.42% (17/48)
rs6800730	AA 90.91% (10/11)	AG 9.09% (1/11)	GG 0% (0/11)	AA 56% (14/25)	AG 44% (11/25)	GG 0% (0/25)	AA 10.42% (5/48)	AG 52.08% (25/48)	GG 37.50% (18/48)
rs6787500	CC 81.82% (9/11)	CT 18.18% (2/11)	TT 0% (0/11)	CC 48% (12/25)	CT 52% (13/25)	TT 0% (0/25)	CC 35.42% (17/48)	CT 54.16% (26/48)	TT 10.42% (5/48)
rs6784820	GG 90.91% (10/11)	GA 9.09% (1/11)	AA 0% (0/11)	GG 52% (13/25)	GA 48% (12/25)	AA 0% (0/25)	GG 16.67% (8/48)	GA 50% (24/48)	AA 33.33% (16/48)

Tabla 21: Frecuencias genotípicas para los 7 tag SNPs extragénicos en los 11 pacientes homocigotos (HM) para c.6527insC, en los 25 pacientes homocigotos y heterocigotos (HM y HT) para c.6527insC y en los 48 controles españoles.

Como cabe esperar, las frecuencias genotípicas y alélicas de cada SNP se comportan de forma similar dentro de un mismo grupo en estudio. Tanto frecuencias alélicas como genotípicas de los SNPs rs13059519, rs319690, rs319685, rs1170767, rs6800730, rs6784820 difieren entre pacientes y controles mostrando porcentajes a la inversa entre los dos grupos en estudio.



3.3. Haplotipos extragénicos y análisis de cosegregación

Se han obtenido 5 haplotipos extragénicos diferentes en los portadores del haplotipo intragénico c.6527insC_CCGCTCAA (tabla 22) y 37 haplotipos en la población control española (tabla 23).

El análisis de los cromosomas portadores de la inserción c.6527insC (un total de 36) revela un haplotipo extragénico conservado, el E08 (CGACAC_Hi.5_G). Este haplotipo es el más frecuente en la cohorte de pacientes en estudio, con un 86.11 % (31/36). El haplotipo E18 (CGACAT_Hi.5_G) presente en el 6.56 % (2/36) de los pacientes, es el segundo haplotipo más frecuente. Tras él se encuentra el resto de los haplotipos extragénicos (E06, E03 y E14) con una frecuencia del 2.8 % cada uno (tabla 22).

Analizando la situación geográfica de cada alelo portador de estos haplotipos extragénicos, se observó que, excepto dos alelos, todos los demás alelos expresados por pacientes que provienen de Andalucía y Extremadura (núcleo principal) comparten el haplotipo extragénico E8 (figura 30), haplotipo más común entre los portadores de la mutación c.6527insC.

El alelo presente en un paciente que proviene de Las Islas Canarias, es portador único del haplotipo E3, no encontrado en ningún otro alelo

El haplotipo que expresa el paciente originario de Las Islas Baleares es el E18. Este mismo haplotipo también está presente en un paciente porcedente de Sevilla.

El haplotipo E14 se ha encontrado exclusivamente en un paciente oriundo de Madrid y el E6 en un paciente de Córdoba.

El haplotipo E8, por ser el más común, también está presente en alelos expresados por pacientes que provienen de otras Comunidades Autónomas como Cataluña, Castilla León y País Vasco (figura 30).

Resultados

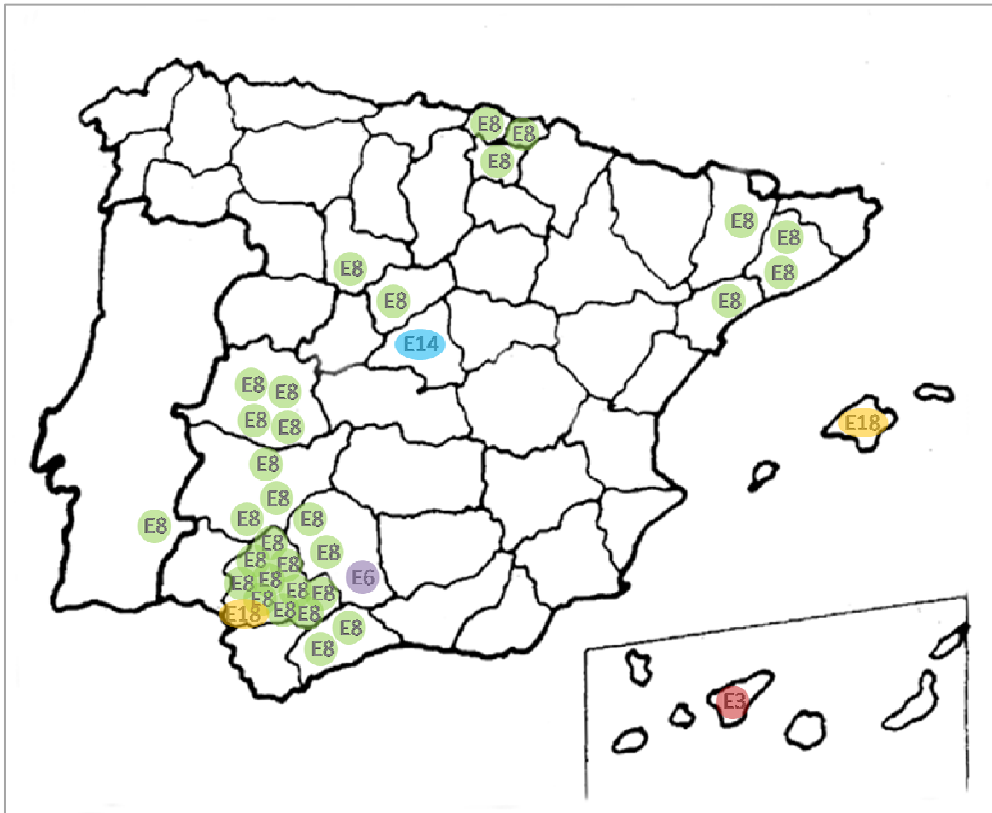
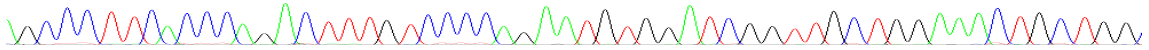
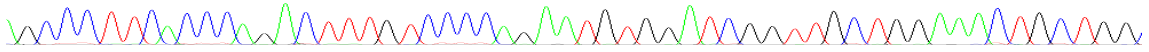


Figura 30: Representación gráfica de la distribución geográfica de los haplotipos extragénicos presentes en los portadores de la mutación c.6527insC.

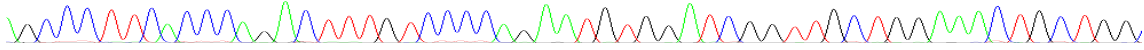
En la tabla 23 se muestran los haplotipos extragénicos presentes en la población control española. Se observa un total de 37 haplotipos extragénicos diferentes. El haplotipo E01 es el más frecuente con un 12.5 % de frecuencia junto con el haplotipo E02 que se presenta en un 10.42 %. Los haplotipos E03, E04 y E05 tienen una frecuencia alrededor del 7 y 8 %, observando el resto de haplotipos en una frecuencia baja.

Se observa una distribución de los haplotipos diferente entre pacientes y controles. Los haplotipos E1 (TACTGCG) y E2 (TACTGCA) son los más frecuentes en la población española con un 12.50 % (12/96) y 10.42 % (10/96) respectivamente y no aparecen en los alelos portadores de la inserción. El haplotipo E08 es el más frecuente en portadores de la inserción, sin embargo muestra una baja frecuencia del 3.13 % (3/98) en controles (tabla 22 y 23).

Resultados



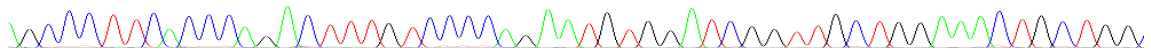
El conocimiento de los puntos de recombinación existentes entre los cromosomas portadores de la mutación c.6527insC mediante la construcción de estos haplotipos extragénicos al gen *COL7A1*, es información imprescindible para la estimación del primer evento mutacional. Las distancias y la asociación existente entre estos marcadores servirán a su vez para estimar la parición del primer ancestro común.



Distancia (cM)	5' SNPs					COL7A1		3' SNPs
	rs13059519	rs319690	rs319685	rs11707679	rs6800730	rs6787500	rs6784820	Frecuencia Haplotipos %
SNPs	C/T	G/A	A/C	C/T	A/G	C/T	H5	A/G
0.0	0.4306	0.4356	0.4628	0.7047	0.8439	1.1800-1.2147	2.1232	
	C	G	A	C	A	C	CCGCTCAA	G
	C	G	A	C	A	T	CCGCTCAA	G
	T	A	C	T	G	T	CCGCTCAA	G
	T	G	A	C	A	C	CCGCTCAA	A
	T	A	C	T	A	C	CCGCTCAA	A

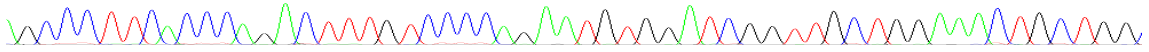
Tabla 22: Haplotipos extragénicos presentes en pacientes portadores del haplotipo intragénico c.6527insC_CCGCTCAA y sus frecuencias. Se muestran las distancias genéticas en cM presentes entre marcadores y el gen COL7A1. (Sanchez-Jimeno et al.)

Resultados



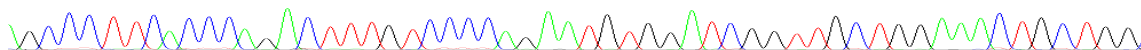
5'		SNP extragénicos						3'	
Haplotipos	rs13059519	rs319690	rs319685	rs11707679	rs6800730	rs6787500	A/G	A/G	Frecuencia Haplotipos %
	C/T	G/A	A/C	C/T	A/G	C/T			
E01	T	A	C	T	G	C	G	G	12,50
E02	T	A	C	T	G	C	A	A	10,42
E03	T	G	A	C	A	C	A	A	8,33
E04	C	A	C	T	G	C	A	A	7,29
E05	T	A	C	T	G	T	A	A	7,29
E06	T	A	C	T	G	T	G	G	5,21
E07	C	G	A	C	A	C	A	A	4,17
E08	C	G	A	C	A	C	G	G	3,13
E09	C	A	C	T	G	C	G	G	3,13
E10	C	G	A	C	A	T	A	A	3,13
E11	C	A	C	T	G	T	G	G	2,08
E12	C	A	C	T	G	T	A	A	2,08
E13	T	A	C	C	G	T	A	A	2,08
E14	T	A	C	T	A	C	A	A	2,08
E15	T	G	A	.	.	C	G	G	2,08
E16	T	A	C	.	.	T	G	G	2,08
E17	.	A	C	.	G	C	A	A	2,08

Resultados



E18	C	G	A	C	A	T	G	1,04
E19	T	G	A	C	A	T	G	1,04
E20	T	G	A	C	A	T	A	1,04
E21	C	A	C	T	A	T	A	1,04
E22	T	A	C	.	.	T	A	1,04
E23	C	G	A	.	.	C	G	1,04
E24	C	A	C	C	G	T	.	1,04
E25	T	A	C	T	G	C	.	1,04
E26	C	G	A	C	A	C	.	1,04
E27	T	A	C	T	G	T	.	1,04
E28	T	.	.	C	A	T	G	1,04
E29	T	.	.	T	A	T	A	1,04
E30	T	G	A	.	A	C	G	1,04
E31	T	G	C	.	G	T	G	1,04
E32	C	A	C	.	A	C	G	1,04
E33	T	A	C	.	G	T	A	1,04
E34	T	G	A	T	A	.	G	1,04
E35	T	G	A	T	A	.	G	1,04
E36	C	G	A	C	A	.	.	1,04
E37	C	A	C	T	G	.	.	1,04

Tabla 23: Haplotipos extragénicos presentes en la población española y sus frecuencias. (Sanchez-Jimeno et al.)



4. Estimación de la edad de la mutación c.6527insC

La estimación de la edad de una mutación es útil para el rastreo del origen de los alelos mutantes y su propagación en el espacio y tiempo. Su contribución en la epidemiología genética es fundamental para esclarecer los procesos demográficos y reconstruir la historia de la población. (Colombo 2007)

La historia genética de la mutación c.6527insC se investigó mediante tres enfoques matemáticos. Para datar el primer evento mutacional se utilizaron los programas informáticos DMLE+ y el BDMC21. Para estimar la aparición del primer ancestro común de los portadores actuales, fue utilizado el método aplicado por Colombo.

Para remontarnos al origen de la mutación es necesario el conocimiento de la tasa de crecimiento de la población portadora y su tasa de portadores, f (proporción muestral). Los haplotipos extragénicos presentes tanto en la población control como en los individuos portadores de la inserción c.6527insC, son fundamentales para el cálculo de la edad mutacional mediante el DMLE+. El método utilizado por Colombo tiene en cuenta la asociación (LD) existente entre los SNPs que forman parte de los haplotipos y la mutación c.6527insC, que cosegrega junto a ellos.

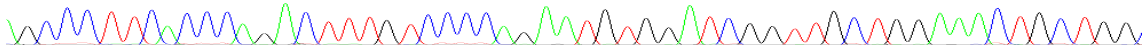
4.1. Tasas de crecimiento poblacional y proporción muestral

Tasas de crecimiento poblacional (r)

Para el cálculo de la r , se ha aplicado la fórmula descrita en el apartado 10.2 de Material y Métodos. Los datos poblacionales se obtuvieron del INE (Instituto Nacional de Estadística), que se recogen desde 1857 (www.ine.es). Por ese motivo solo se ha podido calcular la tasa en los últimos 150 años (1860 a 2010).

Sabiendo que la población española en 2010 era de 48.351.532 habitantes y en 1860 era de 15.658.586 habitantes, en el periodo de 1860 a 2010 (150 años) la r obtenida fue de 0.076.

Resultados



Como 24 de los 39 alelos en los que se ha analizado el origen geográfico provienen de Córdoba, Sevilla, Málaga, Cáceres y Badajoz, se calculó también la r de este “área determinada”. Sabiendo que su población en 2010 era de 5.346.018 habitantes y en 1860 era de 1.946.643 habitantes, en el periodo de 1860 a 2010 (150 años) la r obtenida fue de 0.0676.

También se tuvo en cuenta la r de Europa ($r = 0.05$) (Rannala and Reeve 2003). De este modo, pueden compararse resultados con diferentes tasas de crecimiento.

Proporción muestral (f)

La f se estima conociendo la frecuencia de portadores de la mutación a estudiar en la población analizada. Se obtiene un dato numérico de la proporción de portadores que hay en una población determinada. La f se ha calculado según lo descrito en el punto 10.1 de Material y métodos.

Teniendo en cuenta la frecuencia de portadores de la mutación c.6527insC en España y en el “área determinada”, obtenemos $f = 0.000412$ para España y $f = 0.000847$ para el “área determinada”.

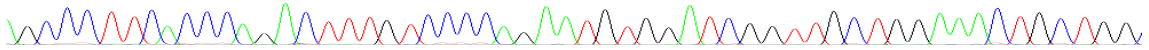
Debido a la alta recurrencia de la mutación en el “área determinada” el valor de f es el doble frente al dato obtenido para España.

4.2. Desequilibrio de ligamiento (LD) entre c.6527insC y los tag SNPs extragénicos al gen *COL7A1*

Es importante que los 7 tagSNPs utilizados para la construcción de haplotipos extragénicos estén asociados a la mutación con un alto LD. Este análisis se realiza mediante el método aplicado por Colombo.

Los tag SNPs seleccionados por el programa Haploview (5.2 de Material y Métodos, figura 14) tienen un alto LD entre ellos, pero se debe calcular el LD que tienen con la mutación. El modo de calcularlo se describe en el apartado de 10.2 de Material y Métodos.

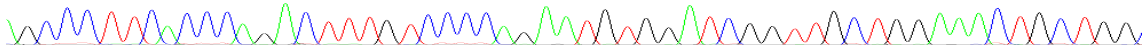
Resultados



Se ha calculado el LD de cada tag SNPs con la mutación, teniendo en cuenta los datos de España (LD2) y del “área determinada” (LD1) (tabla 24). Para el LD2 de cada SNP, se calculó la frecuencia del alelo más frecuente en los pacientes portadores de la mutación c.6527insC en toda España (Pd_2) y la frecuencia del mismo alelo en los controles (Pn). Para el LD1 de cada SNP, se calculó la frecuencia del alelo más frecuente en los pacientes portadores de la inserción c.6527insC tan solo con procedencia del “área determinada” (Pd_1) y del mismo alelo en controles (Pn) (tabla 24).

En 6 de los 7 tag SNPs extragénicos (rs13059519, rs319690, rs319685, rs1170767, rs6800730, rs6784820) se obtuvieron datos de Pd_2 entre 0.917 y 0.944 (valores sobre 1) y de Pd_1 de 0.954 para cada SNP. En ambos casos y para cada SNP se obtuvo un Pn entre 0.312 y 0.364 (valores sobre 1) (tabla 24). En los 6 SNP nombrados el Pd es mayor que el Pn y se observa una distribución de los 6 SNPs, estadísticamente diferente entre pacientes y controles, lo que significa que existe un factor externo (la mutación) que está influyendo en la distribución de dichos SNPs en los pacientes. Por ello, a continuación se calculó el LD entre mutación y los 6 SNPs para comprobar su asociación. Se obtuvieron datos de LD1 entre 0.922 y 0.934 y de LD2 entre 0.873 y 0.956, siendo máxima asociación el valor de 1 (tabla 24). Por tanto, estos 6 tag SNPs se consideran asociados a la inserción c.6527insC por su alto LD.

Es diferente el caso del SNP rs6787500, el cuál no muestra una diferencia significativa en su distribución entre las dos poblaciones, teniendo en cuenta a todos los portadores de la inserción c.6527insC en España ($\chi^2=10.7$; $p>0.001$) o tan solo a los portadores de la mutación del “área determinada” ($\chi^2=6.62$; $p>0.001$). Este SNP no está asociado con la mutación. Así, en los cálculos para datar el primer ancestro común de los portadores españoles de la mutación (método aplicado por Colombo), se descarta este SNP (rs6787500), utilizando los otros 6 tag SNPs por si estar asociados a la inserción c.6527insC



Análisis de LD										
Area específica					España					
SNPs	Alelos	Pn	LD ₁			LD ₂				
			Pd ₁	x ² ₁ (p-value)	δ ₁ (var ^a)	90% CI ^b	Pd ₂	x ² ₂ (p-value)	δ ₂ (var ^a)	90% CI ^b
rs13059519	C	0.344 (33/96)	0.954 (21/22)	26.90 (<0.001)	0.931 (0.0028)	0.84-1.02	0.917 (33/36)	34.38 (<0.001)	0.873 (0.0050)	0.76-0.99
rs319690	G	0.323 (31/96)	0.954 (21/22)	28.97 (<0.001)	0.933 (0.0027)	0.85-1.02	0.944 (34/36)	40.47 (<0.001)	0.918 (0.0033)	0.82-1.01
rs319685	A	0.312 (30/96)	0.954 (21/22)	30.07 (<0.001)	0.934 (0.0026)	0.85-1.02	0.944 (34/36)	41.86 (<0.001)	0.919 (0.0035)	0.82-1.02
rs11707679	C	0.333 (32/96)	0.954 (21/22)	27.92 (<0.001)	0.932 (0.0028)	0.84-1.02	0.944 (34/36)	39.11 (<0.001)	0.917 (0.0034)	0.82-1.01
rs6800730	A	0.364 (35/96)	0.954 (21/22)	24.98 (<0.001)	0.928 (0.0030)	0.84-1.01	0.972 (35/36)	38.01 (<0.001)	0.956 (0.0019)	0.88-1.03
rs6784820	G	0.417 (40/96)	0.954 (21/22)	60.74 (<0.001)	0.922 (0.0036)	0.82-1.02	0.944 (34/36)	29.61 (<0.001)	0.905 (0.0044)	0.79-1.01

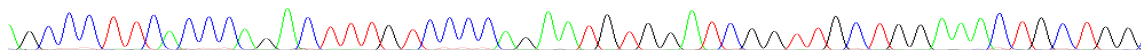
Tabla 24: Análisis del LD de la mutación c.6527insC y los 6 tag SNPs extragénicos. (Sanchez-Jimeno et al.)

LD₁: Desequilibrio de ligamiento calculado en el “área determinada” de Badajoz, Cáceres, Córdoba, Málaga y Sevilla.

LD₂: Desequilibrio de ligamiento calculado para España.

^a Obtenido por la ecuación $\text{var}(\delta) = 1/(1-Pn)^4 \sigma_{Pn}^2 [\sigma_{Pd}^2 + (1-Pd)^2 + \sigma_{Pn}^2 / (1-Pn)^2]$, donde, $\sigma_{Pn}^2 = [Pn(1-Pn)]^{(n)}$ y $\sigma_{Pd}^2 = [Pd(1-Pd)]^{(n)}$

^b 90% CI es calculado por $\delta \pm 1,64\sigma_\delta$, donde $\sigma_\delta^2 = \text{var}(\delta)$



4.3. Origen del ancestro común más reciente de los cromosomas portadores de c.6527insC

Mediante la aplicación del algoritmo de Risch (Risch et al. 1995) que tiene en cuenta el LD entre la mutación c.6527insC y los SNPs (δ) (tabla 24) y las distancias genéticas entre ellos (θ) (figura 29), se calculó la edad del ancestro común más reciente de los cromosomas c.6527insC de nuestra cohorte de pacientes.

Como la r es un dato que puede hacer variar esta edad, a los cálculos se le aplicó la corrección de Luria y Delbrück (Luria and Delbruck 1943) (Labuda et al. 1996). Los resultados obtenidos se miden en generaciones (g).

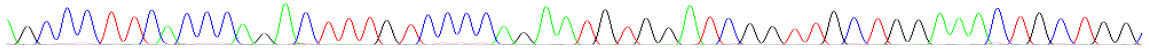
Para cada tag SNP, se obtuvo una edad inicial g^b calculada con el algoritmo de Risch. Teniendo en cuenta a todos los pacientes portadores de la inserción c.6527insC de España, los datos de g^b_2 están comprendidos entre 5.99 y 15.23 g y teniendo en cuenta tan solo a los pacientes del “área determinada” los datos de g^b_1 están comprendidos entre 9.23 y 12.01 g (tabla 25).

A esta edad inicial se le sumó la edad calculada con el factor de corrección de Luria y Delbrück (g_0^c). Teniendo en cuenta la r del “área determinada” (0.0676) la g_0^c está entre 24.63 y 38.94 g , con la r calculada para España (0.076), los datos de g_0^c están entre 23.45 y 36.18 g y con la r Europea (0.05) la g_0^c está entre 27.27 y 46.62 g (tabla 25).

Sumando la g^b y la g_0^c , para cada SNP, se obtiene la edad final de cada SNP (g_c^d). Con datos del “área determinada” se obtuvieron entre 30.94 y 54.17 g , para datos de España la g_c^d está entre 35.29 y 45.42 g y teniendo en cuenta la g_0^c para Europa, la g_c^d está entre 39.11 y 55.86 g (tabla 25).

La media de la edad de cada uno de los SNPs, da como resultado la edad del primer ancestro común de los portadores de la mutación c.6527insC. Por lo que, teniendo en cuenta la r de España (0.076), la edad del primer ancestro común se estima en 40.40 ± 4.07 g [IC del 95 %, 36.12-44.67 g] (tabla 25). Para observar si el valor de r es un punto crítico, se calculó la edad con la r europea (0.05) y con la del “área determinada” ($r=0.0676$) obteniendo 47.24 ± 6.70 g (IC del 95 %, 40.42-54.05 g)

Resultados



y 40.38 ± 8.51 g (IC del 95 %, 31.45-49.32 g) respectivamente. Se puede observar que los resultados son similares con los diferentes valores de r (figura 29).

En resumen, la edad del ancestro común más reciente de los cromosomas potadores de la mutación c.6527insC en España se estimó en 40 generaciones. Calculando que una generación son 28 años (Fenner 2005) (Tremblay and Vezina 2000) se estima que la edad del primer ancestro es de 1131 años aproximadamente.

Estimación de la edad												
Área determinada												
España												
SNPs	Distancia		δ_1	g^{b_1}	$r = 0.0676$		δ_2	g^{b_2}	$r = 0.05$		$r = 0.076$	
	cM	θ			g_0^c	g_c^d			g_0^c	g_c^d		g_0^c
rs13059519	1.1906	0.0119	0.931	11.24	25.68	31.68	0.873	5.99	28.69	39.93	24.39	35.63
rs319690	0.7600	0.0076	0.933	11.36	32.33	41.45	0.918	9.12	37.68	49.03	30.30	41.65
rs319685	0.7550	0.0075	0.934	11.14	32.43	41.45	0.919	9.02	37.81	48.95	30.38	41.523
rs11707679	0.7276	0.0073	0.932	12.01	32.97	42.63	0.917	9.67	38.54	50.55	30.86	42.87
rs6800730	0.4856	0.0049	0.928	9.23	38.94	54.17	0.956	15.23	46.62	55.86	36.18	45.42
rs6784820	1.2793	0.0128	0.922	11.84	24.63	30.94	0.905	6.31	27.27	39.11	23.45	35.29
Medias de g_c (edad del ancestro)					40.38				40.40		47.24	

Tabla 25: Estimación de la edad del ancestro común más reciente de los cromosomas portadores de c.6527insC en dos áreas diferentes (el “área determinada” y España). (Sanchez-Jimeno et al.)

^b estimación de la edad calculada por la ecuación $g = \log \delta / \log (1 - \theta)$

^c aplicando el factor de corrección de Luria y Delbrück (Luria and Delbrück, 1943), $g_0^c = (1/r) \ln (\theta / fd)$, se tiene en cuenta la r .

^d es determinada por $g_c = g + g_0$



4.4. Origen del primer evento mutacional de c.6527insC

Asumiendo que la proporción muestral es de $f=0.000412$ y la tasa de crecimiento poblacional en España es de $r=0.076$, la estimación de la edad alélica dada con el programa DMLE+ fue de 122.65 g (IC del 95 %, 99.83-159.56 g) (tabla 26).

Teniendo en cuenta la misma f y r , utilizando el programa BDMC21 se estimó la edad del primer evento mutacional en 124 g (IC del 95 %, 123.96-124.04 g) (tabla 26).

Para evaluar el efecto de la r sobre la edad estimada por el DMLE+ y el BDMC21, se realizó el cálculo con valores diferentes de r y f . Para $r=0.0676$ y $f=0.000847$, datos calculados para el “área determinada”, se obtuvieron 114.4390 g (IC del 95 %, 92.64-157.19 g) con el DMLE+ y 122 g (121.96-122.04) con el BDMC21 (tabla 26).

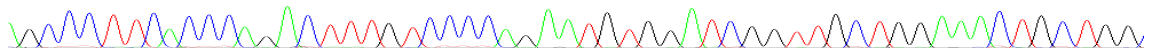
Para $r=0.05$, tasa de crecimiento europeo y $f=0.000412$, se obtuvieron 169.22 g (IC del 95 %, 141.87-230.41 g) con el DMLE+ y 184 g (183.97-184.03) con el BDMC21.

Se observa que, al variar los valores de la tasa de crecimiento poblacional, los resultados de la datación con estos métodos, varían notoriamente (figura 29, tabla 26).

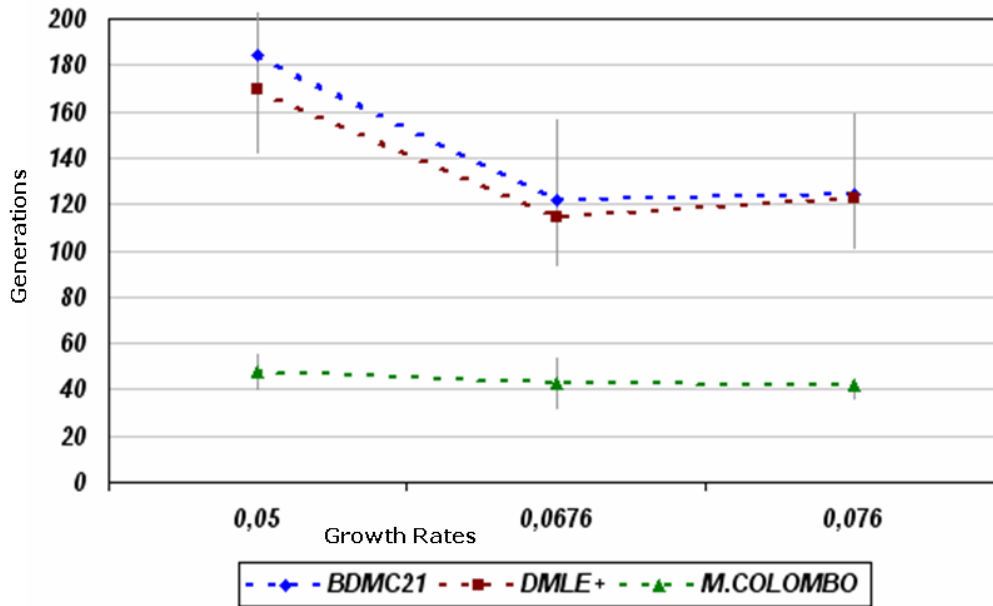
	Tasa de crecimiento poblacional	Proporción muestral	BDMC21	DMLE+
España	$r = 0.076$	$f = 0.000412$	124 (123.96-124.04)	122.65 (99.83-159.56)
Área determinada	$r = 0.0676$	$f = 0.000847$	122 (121.96-122.04)	114.44 (92.64-157.19)
Europa	$r = 0.05$	$f = 0.000412$	184 (183.97-184.03)	169.22 (141.88-230.41)

Tabla 26: Estimación de la edad del primer evento mutacional de c.6527insC calculado con diferentes valor de r y f , teniendo en cuenta diferentes zonas geográficas, España, área determinada y europa (Sanchez-Jimeno et al. 2012)

Resultados



Los resultados del DMLE+ y el BDMC21 que estiman el primer evento mutacional, en igualdad de condiciones, son similares (figura 31). Cuando comparamos los datos obtenidos para la estimación del primer evento mutacional y para el primer ancestro común, se obtiene una diferencia de 80 generaciones. Eso podría significar que el primer evento mutacional surgió 80 generaciones antes que el ancestro común más reciente de los cromosomas portadores de c.6527insC presentes en nuestra cohorte. (figura 29).



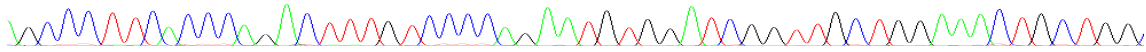
	Tasa de Crecimiento Poblacional	Proporción muestral	BDMC21	DMLE+	M. COLOMBO
Europa	r = 0.05	f = 0.000412	184 g (183.97-184.03)	169.22 g (141.88-230.41)	47.23 g (39.11-55.86)
España	r = 0.076	f = 0.000412	124 g (123.96-124.04)	122.65 g (99.83-159.56)	40.40 g (35.29-45.42)
Área determinada	r = 0.0676	f = 0.000847	122 g (121.96-122.04)	114.44 g (92.64-157.19)	40.39 g (30.94-54.17)

Figura 31: Datos de la estimación de la edad usando el BDMC21, DMLE+ y el método descrito por Colombo (Colombo 2007). Los dos primeros métodos determinan el momento en que la mutación ocurrió por primera vez, mientras que el tercer método calcula la edad del primer ancestro común. La tasa de crecimiento poblacional es un punto crítico en el DMLE+ y BDMC21, pero tiene poco efecto en el método de Colombo. (Sanchez-Jimeno et al. 2012).

Según la estimación del presente estudio; teniendo en cuenta que una generación es 28 años (Fenner 2005) (Tremblay and Vezina 2000), el primer evento mutacional de la mutación c.6527insC apareció hace unos aproximadamente 3450 años y el ancestro común más reciente surgió aproximadamente hace 1131 años. Es decir, el primer ancestro común debió de surgir 2320 años después de la aparición de la mutación *per sé*.



DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

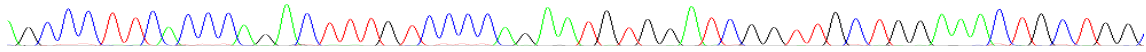
1. Efecto fundador de c.6527insC y cosegregación haplotípica y mutacional en el gen *COL7A1*

La EBD es una enfermedad rara asociada a más de 520 mutaciones presentes en el gen *COL7A1* (Wertheim-Tysarowska et al. 2011), (van den Akker et al. 2011). Este elevado número de mutaciones se debe al carácter intrafamiliar de las mismas (Mellerio et al. 1997), (Tamai et al. 1999), (Salas-Alanis, Amaya-Guerra and McGrath 2000), (Gardella et al. 2002), (Csikos et al. 2005). La mayoría de mutaciones descritas en este gen presentan una baja frecuencia o incluso, en muchos de los casos, tan solo han sido diagnosticadas en una única familia. Por ello, a día de hoy, se siguen publicando nuevas mutaciones en el gen *COL7A1* (Lee et al. 2013), (Makino et al. 2012), (Lin et al. 2012), (Yang et al. 2012), (Ritelli et al. 2012).

Así es el caso de los pacientes con EBD diagnosticados en la cohorte en estudio, en los cuales se han descrito más de 20 mutaciones nuevas hasta la actualidad (Escamez et al. 2010). En esta cohorte de pacientes se ha observado una elevada recurrencia de la mutación c.6527insC (40.2 %), inusual en esta patología (figura 18). Esta mutación es la inserción de una Citosina en el exón 80 del gen *COL7A1*, en la posición 6527 de su secuencia codificante. Esta inserción provoca un cambio del marco de lectura que 337 pb más adelante da lugar a un PTC (figura 9). Posiblemente, debido al sistema NMD intrínseco de las células, el ARNm con un PTC es degradado y los pacientes sufren de ausencia de proteína (Hauschild, Wollina and Bruckner-Tuderman 2001). El gen *COL7A1* codifica para la proteína Col VII, situada en la membrana basal en la unión dermo-epidérmica de la piel. Este PTC en el gen *COL7A1* conlleva la ausencia de dicha proteína en la membrana basal. Cuando en el paciente esta mutación se encuentra en homocigosis, da lugar a las formas clínicas más severas de la patología (EBDR sev gen) (figuras 8 y 10).

La elevada prevalencia de una mutación en una población determinada, puede ser resultado de la alta tasa mutacional en un punto caliente o del efecto fundador de una mutación con origen común (Schneider-Yin et al. 2002).

Discusión



Regiones hipermutables como los dinucleótidos CpG y regiones del ADN con una elevada tasa de recombinación son consideradas puntos calientes del genoma humano (Strachan and Read 2004), los cuales se presentan con elevada frecuencia en la población.

Tras el análisis de haplotipos intragénicos realizado en los alelos portadores de la mutación c.6527insC, se observó que todos estos alelos segregan el mismo haplotipo, el Hi.5, lo que apoya la presencia de un origen común para todos los cromosomas portadores. Este resultado descarta que la elevada frecuencia de dicha mutación derive de su localización en un punto caliente con alta tasa de recombinación, ya que posiciona a la mutación en una región muy conservada del ADN (haplotipo Hi5). También se descarta la presencia de un dinucleótido CpG como punto caliente, ya que se trata de una inserción.

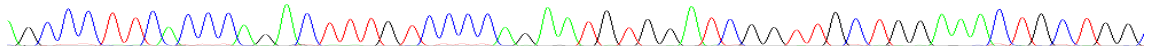
La elevada tasa de expresión de la mutación c.6527insC en pacientes españoles con EBD y el probable origen común de todos los portadores de la misma, apoyan la idea de la presencia de un efecto fundador de la mutación en la población española. Además, en Europa tan sólo ha sido descrita en dos pacientes aislados, uno en Francia (Hovnanian et al. 1997) y el otro en Alemania (Kern et al. 2006). Recientemente, también ha sido descrita con una elevada recurrencia en población chilena (Rodríguez et al. 2012) (figura 32).

Figura 32: Distribución de la mutación c.6527insC en Chile. La inserción c.6527insC se focaliza en el sur de Chile (zona aproximada, marcada en verde), con una elevada recurrencia (42 %) en la cohorte de pacientes chilenos. El análisis de haplotipos apoya un probable efecto fundador {Rodríguez, #251.



Si bien, no se ha podido confirmar el origen español de la mutación c.6527insC en población chilena, se baraja esta hipótesis, apoyándose dicho estudio en la histórica colonización española entre los años 1600 y 1800, conocida como Chile

Discusión



colonial. La emigración de la clase media española, principalmente de origen andaluz y extremeño (Carballo Goveneche 1875) pudo trasportar la mutación c.6527insC.

Tras el análisis geográfico de los pacientes españoles portadores de los alelos que expresan la mutación c.6527insC, se observó que más del 50 % de los alelos provienen de pacientes del suroeste de la Península Ibérica, concretamente de Andalucía y Extremadura (64.1 % de los alelos portadores) (figuras 18 y 33). Este dato, similar al del estudio chileno, podría apoyar la hipótesis del posible origen español de la mutación descrita en Chile.



Figura 33: Distribución de la mutación c. 6527insC en Europa. Modificado de (Cuadrado-Corrales et al. 2010b). El grosor de los círculos es proporcional al número de alelos portadores de la inserción. A excepción de los pacientes descritos en la península ibérica e islas españolas, se han publicado 2 pacientes portadores de la inserción en Europa (Francia y Alemania). En verde se observan las provincias Españolas con mayor incidencia de la mutación.

Las altas tasas de portadores se suelen atribuir a un efecto fundador en una población y generalmente se evidencian por la conservación de haplotipos con marcadores asociados directamente (Morell et al. 1998). Para analizar si esto mismo ocurre en nuestro estudio, hemos descrito y construido un total de 16 haplotipos

Discusión



intragénicos diferentes a lo largo del gen *COL7A1* (tablas 18 y 19). De esta manera exploramos el origen de los alelos que expresan la mutación c.6527insC y el resto de mutaciones descritas en nuestra cohorte de pacientes.

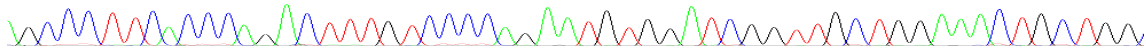
Como se ha mencionado anteriormente, la cosegregación de la mutación c.6527insC con un mismo haplotipo, el Hi.5 (CCGCTCAA_6527insC) (tabla 18), apoya la hipótesis de un origen común de los alelos portadores de esta inserción. Este dato es ratificado con la existencia de una amplia diversidad de haplotipos intragénicos descritos en este estudio en el gen *COL7A1* (16 haplotipos diferentes), junto con la baja frecuencia del haplotipo Hi.5 en la población control española (7.81 %) (tabla 19) y la focalización de esta inserción en un área geográfica determinada de España (figura 18).

El haplotipo Hi.5, además de cosegregar con la mutación c.6527insC en todos los alelos portadores de esta inserción (39 alelos), cosegrega con otra mutación, p.G2520V, en un alelo. La presencia del haplotipo Hi.5 en 10 de 128 alelos no mutados (7.81 %) y en un alelo mutado no portador de la mutación c.6527insC (tabla 18 y 19), indica que, en el tiempo, el haplotipo Hi.5 es anterior a la mutación c.6527insC, apareciendo ésta posteriormente en el haplotipo ya existente. La baja frecuencia del haplotipo Hi.5 en la población control, nos plantea la posibilidad de que la mutación c.6527insC surgiera en una población cerrada portadora de un haplotipo poco extendido actualmente en población sana.

Respecto al resto de mutaciones encontradas en los pacientes con EBD, observamos que la mayoría están asociadas a los haplotipos intragénicos Hi.1 y Hi.2 (33/97) (tabla 18). Estos haplotipos son los más frecuentes en la población control española (tabla 19) por lo que es de esperar que también lo sean en los pacientes. En términos de probabilidad elemental, es más frecuente la aparición de una mutación patogénica en un cromosoma que alberga un haplotipo relativamente común en la población.

A pesar de este hecho, observamos que la distribución general de los haplotipos intragénicos es diferente entre pacientes y controles sanos. Obviando los haplotipos Hi.1 y Hi.2, los demás haplotipos intragénicos se muestran en distintas frecuencias entre los dos grupos de análisis y además, existen haplotipos intragénicos

Discusión



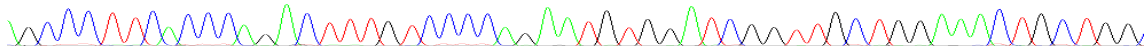
presentes en la población control que no lo están en los pacientes y viceversa (tabla 18 y 19). Esto indica la existencia de una distancia genética entre pacientes y controles. Al tratarse de una enfermedad rara con una frecuencia muy baja en la población general, cabe la posibilidad de que los pacientes estén genéticamente alejados de la población control.

La mayoría de las mutaciones encontradas en nuestra cohorte de pacientes tan solo aparecen en una familia (mutaciones intrafamiliares), en un único paciente o en algunos casos en dos hermanos, ambos afectados, como en el caso de los pacientes P49-p50 (p.G2061V) y P31-P32 (c.325insGC y c.3277-1G>C) (figura 24). La ausencia de recurrencia en estas mutaciones no nos permite distinguir si un único haplotipo se asocia con una mutación, o por el contrario, si una mutación está asociada con haplotipos generales, sugiriendo múltiples orígenes. Este comportamiento es el habitual en la EBD por el carácter intrafamiliar de sus mutaciones.

Hasta ahora, en la EBD Recesiva no se había descrito una recurrencia tan elevada como la de la mutación c.6527insC, ni analizado un efecto fundador tan evidente en una mutación tan recurrente (Cuadrado-Corrales et al. 2010a) (Sanchez-Jimeno et al. 2012).

Los pacientes P30, P33 y P41 expresan las mutaciones c.267-3C>G, p.Y1098X y c7930-1G>C, respectivamente, en homocigosis (figura 24). La presencia de estas mutaciones en los dos alelos de cada paciente, nos lleva a plantearnos la posible consanguinidad en los progenitores. Construyendo y analizando el árbol genealógico de las familias, afirmamos la consanguinidad en los portadores de las mutaciones c.267-3C>G y p.Y1098X (P30 y P33). La familia portadora de la mutación c7930-1G>C, *a priori*, no presenta consanguinidad conocida, pero ambos progenitores y sus antecesores proceden de un mismo pueblo de la provincia de Valencia. En ambos progenitos la mutación cosegrega con el haplotipo Hi.1, el más común en la población española. Tampoco podría afirmarse un origen común en este caso, ya que, como se ha dicho anteriormente, la probabilidad de que una mutación recaiga en los haplotipos más comunes, es elevada y por ello, otras muchas mutaciones descritas en nuestra cohorte de pacientes recaen también en este haplotipo (tabla 18).

Discusión



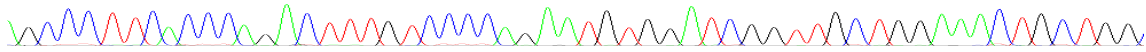
Del mismo modo, esta última mutación, c7930-1G>C, está presente en otra familia (P44), en principio no emparentadas con la familia P41. En ambas familias, la mutación cosegrega con el haplotipo más común de la población control, el Hi.1. Tampoco se puede hablar en este caso de origen común ya que, como se mencionó anteriormente, la mutación recae en el haplotipo más frecuente en población control.

Diferente es el caso, *a priori*, de la mutación c.5131insCTCAC, no descrita en otras poblaciones y presente, en la cohorte en estudio, en dos familias no emparentadas (P16 Y P17), cosegregando en ambas con el mismo haplotipo Hi.15 (figura 24). Estas familias provienen de provincias distantes, Valencia y Badajoz, lo que apoya en principio, su no consanguinidad aparente. Ambas familias expresan la misma mutación y además el haplotipo asociado (Hi.15) no está representado en la población control española. Esto las aleja genéticamente de la población control, y posiblemente, a pesar de su supuesta no consanguinidad, tengan un origen común que podría ser objetivo de futuros estudios.

La mutación p.R185X está presente en dos familias *a priori* no emparentadas, P35 y P38. Esta mutación cosegrega en ambas familias con el haplotipo más común en la población española, el Hi.1. Tampoco en este caso podemos hablar de la existencia de un ancestro común, además parece tratarse de un punto caliente reportado en otras poblaciones (Danescu et al.).

Tan sólo se encontró una mutación, p.R525X, que cosegrega con dos haplotipos diferentes, Hi.2 y Hi.4 (tabla R18). Esta mutación sin sentido ha sido descrita anteriormente en otras cohortes con EBD (Whitlock et al. 1999). Se ha observado un dinucleótido CpG en el codón 525 del gen *COL7A1*, lo que podría indicar la presencia de un punto caliente y explicaría la aparición de esta mutación en haplotipos diferentes y distintas poblaciones.

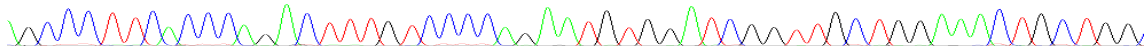
También es el caso de la mutación *de novo* que presenta el paciente reportado en el apartado 4.2.2.1 de resultados. La mutación p.R1763X (figura 26), al tratarse de un punto caliente, la expresa el paciente sin haber sido heredada de sus progenitores. Además, esta mutación ya ha sido descrita anteriormente en otras poblaciones (Kern et al. 2009).



1.1. Asociación entre SNPs intragénicos y la mutación c.6527insC

Para la construcción de los haplotipos intragénicos, utilizamos el programa Haploview, que selecciona marcadores asociados entre ellos con un alto LD. Adicionalmente, se incorporó al haplotipo intragénico tres SNPs no incluidos en el programa (inSNP1, nSNP2 y rs2532848, tabla 6, figura 13). Dos de ellos (inSNP1: NM000094:c.11639C>T e inSNP2: NG007065.1:g.25215C>T), no habían sido descritos anteriormente, pero se observó su presencia en pacientes durante la secuenciación del gen *COL7A1*. Estos polimorfismos se confirmaron como SNPs tras observar su frecuencia superior al 1 % en la población general (tabla 14).

De los 3 SNPs no incluidos por el programa Haploview, los SNPs inSNP2 (c.20215C>T) y rs2532848 (26621C>A) muestran un máximo de LD (1) con la mutación c.6527insC (tabla 17), lo que significa que su segregación está totalmente asociada, y por consiguiente, se heredan en bloque. La distribución de estos 2 SNPs es significativamente diferente entre pacientes y controles. Esta diferencia se debe a que más del 40 % de los alelos presentes en estos pacientes expresan la mutación c.6527insC, asociada a estos SNPs. Estos dos SNPs fueron incluidos en el haplotipo intragénico por su asociación con la inserción. Sin embargo, el inSNP1 (6639C>T) no presenta asociación ni con la patología, ni con la mutación c.6527insC en concreto, pero en principio, no se ha descrito en otras poblaciones. Por ello, también decidimos incorporarlo al haplotipo intragénico por su posible asociación con la población española.



2. Origen de la mutación c.6527insC y del ancestro común más reciente de los cromosomas portadores

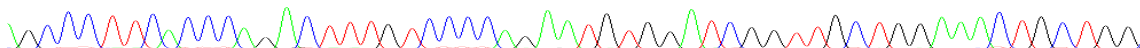
Tras identificar en pacientes portadores de la mutación c.6527insC un único haplotipo intragénico de aproximadamente 30 Kb en el gen *COL7A1* (Hi.5) que sugiere un efecto fundador (Cuadrado-Corrales et al. 2010b), nos planteamos calcular su edad alélica.

La estimación de la edad alélica no es una cuestión sólo de curiosidad. Rastrear el origen de los alelos mutantes y su propagación en el espacio y tiempo es una profunda contribución para la epidemiología genética. El cálculo de la edad alélica también es importante para conocer el papel de la selección natural y de otros procesos evolutivos por los cuales se han establecido las frecuencias alélicas actuales, así como para la recogida de pruebas, útil para esclarecer los procesos demográficos y reconstruir la historia de la población (Colombo 2007).

2.1. Segregación de los haplotipos extragénicos en portadores del alelo Hi.5_c.6527insC

Para poder calcular la edad de la inserción c.6527insC, primero ampliamos el fragmento de ADN a analizar, abarcando aproximadamente 2 cM alrededor del gen *COL7A1*. Dentro de ese fragmento de ADN, se seleccionó una colección de marcadores extragénicos asociados entre ellos (tag SNPs), para la búsqueda de puntos de recombinación entre los portadores del alelo c.6527insC_Hi.5 (figura 14). Los puntos de recombinación encontrados delimitan el tamaño del fragmento de ADN que comparten los portadores de dicho alelo. Al tratarse de un probable efecto fundador, todos los portadores de la mutación c.6527insC parten de un alelo ancestral único que a lo largo del tiempo podría variar a causa de dichas recombinaciones, ocurridas entre individuos tras varias generaciones (Colombo 2007). Estos puntos de recombinación se van acumulando a lo largo del tiempo dando lugar a la diversidad haplotípica existente en la actualidad.

De ese modo, conociendo el tamaño del fragmento de ADN compartido y los puntos de recombinación que dan lugar a diferentes haplotipos extragénicos al gen *COL7A1*, puede calcularse la edad aproximada en la que la mutación c.6527insC

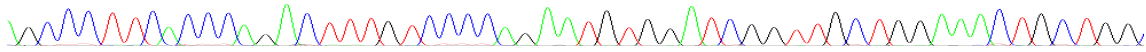


surgió (Greenwood et al. 2010). Además, conociendo las frecuencias alélicas de los tag SNPs que forman los haplotipos extragénicos y su asociación entre ellos, su LD, lo que puede calcularse es el momento en el que surgió el ancestro común más reciente de todos los portadores actuales (Colombo 2007). Una gran diversidad haplotípica marca una mayor distancia genética entre individuos y su procedencia de una población grande, mientras que una elevada frecuencia de un único haplotipo, marca la pérdida de variabilidad genética dada en poblaciones cerradas y por tanto una distancia genética pequeña entre individuos portadores de ese haplotipo (Fontdevila and Moya 1999).

Cabe esperar si la mutación es más antigua, que los portadores presenten más variedad haplotípica que si la mutación es más reciente y por tanto, la región del genoma que comparten será menor. También se debe tener en cuenta la población que ha albergado la mutación a lo largo de los años: poblaciones cerradas y endogámicas dan lugar a una pérdida de variabilidad y por tanto menor variedad haplotípica (Fontdevila and Moya 1999).

Este estudio se ubica en un fondo genético muy variable según lo revelado por la identificación de 37 haplotipos extragénicos al gen *COL7A1* en la población general española (tabla 22). La dimensión del fragmento de ADN analizado es grande, por lo que cabe esperar grandes diferencias entre individuos de la población general. La variedad haplotípica existente en la población española analizada, posiblemente se debe a la mezcla de poblaciones que han estado presentes en la Península Ibérica, desde los Íberos como primeros pobladores, pasando por los celtas, celtíberos, cartagineses y posteriores invasores como los romanos en el año 206 aC o musulmanes alrededor del 700 dC, entre otros (Bahamonde Magro and Otero Carbajal 2004).

Tan sólo se observaron 5 haplotipos extragénicos distintos en los portadores de la mutación c.6527insC (tabla 22), por lo que, comparándolos con los 37 haplotipos presentes en la población general, puede decirse que existe una distribución haplotípica muy diferente entre los dos grupos, marcando una gran distancia genética entre ellos. Tanto el hecho de que los haplotipos más frecuentes en la población española (E1: 12.5 % y E2: 10.42 %) no estén presentes en los portadores de la inserción, como el hecho de que el haplotipo más frecuente en estos



portadores (E8: 86.11 %) esté representado en tan solo un 3 % de la población española, no sólo indica esta gran distancia genética entre los dos grupos, sino que sitúa a los portadores de la inserción c.6527insC en una población cerrada por estar alejada de la población general, hecho sugerido anteriormente por la baja frecuencia en población control del haplotipo intragénico Hi.5, haplotipo común para todos los portadores de la mutación c.6527insC.

Alrededor del 86 % de los alelos portadores de la mutación c.6527insC segregan el haplotipo extragénico E8 (tabla 22), revelando que la mayoría de los portadores de esta inserción derivan de un cromosoma ancestral único, lo que apoya con mayor seguridad el efecto fundador. El hecho de que los cromosomas portadores de la mutación c.6527insC segregen, en una baja frecuencia, otros haplotipos extragénicos (E18, E06, E03 y E14), podría deberse a que en realidad, derivan del haplotipo ancestral E8, haplotipo en el que surgió inicialmente la mutación c.6527insC.

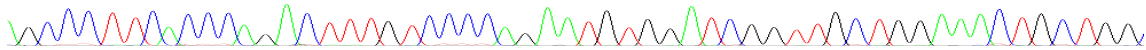
Estos haplotipos extragénicos son una herramienta fundamental para la datación de la mutación c.6527insC, ya que, al ampliar el fragmento de ADN analizado, se pueden observar diferencias genéticas entre los portadores de esta inserción. La datación de la mutación es primordial para seguir su historia, conociendo la población que la albergaba y el comportamiento que ha seguido a lo largo de los años (Genin et al. 2004).

2.2. Análisis geográfico de los haplotipos extragénicos de los portadores del alelo Hi.5_c.6527insC.

Tras describir diferentes haplotipos extragénicos entre los alelos portadores del haplotipo intragénico Hi.5_c.6527insC, pudimos observar que, en pacientes que proceden de Andalucía y Extremadura (núcleo principal), excepto dos alelos, todos los alelos portadores de la inserción comparten el haplotipo extragénico más común, E8 (figura 30).

Sin embargo, hemos observado que de Las Islas Canarias procede un paciente portador de un alelo que segrega otro haplotipo extragénico, E3, no encontrado en ningún otro alelo portador de la inserción. Las distancias físicas y aislamiento que

Discusión

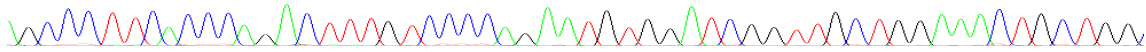


presentan estas islas, podrían explicar la distancia genética existente entre el alelo portador del haplotipo E3 y el resto de los alelos portadores del haplotipo E8. El alelo portador del haplotipo E3 pudo evolucionar de diferente modo a los alelos portadores del haplotipo E8. A pesar de ello, estos dos haplotipos tan solo difieren en dos SNPs, ambos presentes en los extremos 5' y 3' del haplotipo, lo que significa que comparten el resto de los SNPs y por tanto, gran parte del haplotipo extragénico.

Del otro núcleo español de islas, Las Islas Baleares, procede un paciente portador de un alelo que segrega el haplotipo E18. Este haplotipo también es segregado por un alelo portado por un paciente de Sevilla. Estos dos pacientes comparten un ancestro común más cercano en el tiempo que el que comparten con los pacientes portadores del haplotipo E8. No existen grandes diferencias genéticas entre los alelos portadores de los haplotipos E18 y E8, ya que estos dos haplotipos tan sólo difieren entre ellos en un único SNP. Además, este marcador diferente, se trata del SNP rs6787500, que a pesar de estar altamente asociado con los demás tag SNPs extragénicos (figuras 14 y 15) no está asociado a la mutación c.6527insC ($LD = 0.0473$; $\chi^2=10.7$; $p>0.001$). Este último dato, apoya la idea de que no existe una distancia genética muy grande entre estos dos haplotipos, es decir, entre los dos pacientes de Baleares y Sevilla y el resto de pacientes portadores del haplotipo común E8.

Otros alelos presentes en pacientes que proceden de Córdoba y Madrid, presentan haplotipos extragénicos diferentes al E8, el E14 y el E6, no segregados por ningún otro alelo portador de la mutación. Estos haplotipos (E14 y E6) difieren en 5 y 6 SNPs respectivamente, respecto al haplotipo E8, lo que explica que, a pesar de tener un ancestro común inicial, posiblemente estén más alejados genéticamente del núcleo principal portador de este último haplotipo (E8).

El E8, por ser el haplotipo extragénico más frecuente entre alelos portadores de la inserción, también está presente en pacientes que provienen de otras Comunidades Autónomas como Cataluña, Castilla León y País Vasco (figura 30), lo que apoya que se trate del haplotipo más ancestral y el original del que partió la mutación.

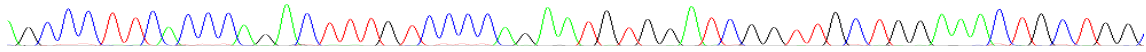


2.3. Asociación de tag SNPs extragénicos a la mutación c.6527insC

Para la construcción de los haplotipos extragénicos se seleccionaron los tag SNPs con el programa Haploview (figura 14), del mismo modo que se realizó para la construcción de los intragénicos. Los marcadores finalmente seleccionados, fueron 7 tag SNPs que, además de estar asociados entre ellos con un alto LD, se segregaban entre los portadores de la mutación c.65127insC con diferencias en sus alelos (figura 29). Estas diferencias, marcan los puntos de recombinación existentes en un grupo de pacientes con el mismo ancestro, información útil para el seguimiento en el tiempo del origen de la mutación.

Seis de los 7 tag SNPs que forman el haplotipo extragénico están asociados a la mutación c.6527insC con un elevado LD (0.8). Se observa que sus frecuencias alélicas en portadores de esta inserción (P_d) son significativamente diferentes a las frecuencias alélicas que presentan en los controles (P_n) (tabla 20). De nuevo, este dato también marca una gran distancia entre población general española y portadores de la mutación c.6527insC, lo que apoya la hipótesis de que los portadores de la inserción c.6527insC provienen de una antigua población cerrada. Las frecuencias genotípicas muestran diferencias similares a las frecuencias alélicas, confirmando la distancia genética entre los dos grupos (tabla 21).

Conociendo la elevada asociación entre la inserción y estos 6 tag SNPs y las distancias genéticas que existen entre los marcadores (figura 29 (cM) y tabla 25 (δ), se calculó la edad del cromosoma portador de la mutación c.6527insC más reciente mediante el algoritmo de Risch (Risch et al. 1995). Este dato se obtiene calculando la edad de cada uno de los 6 tag SNPs ya que, por su elevada asociación con la mutación, viajan generación tras generación en bloque junto a ella. Para el cálculo de la edad alélica, se descartó el SNP rs6787500 (1 de los 7 tag SNPs extragénicos seleccionados inicialmente) que como se ha dicho anteriormente, mostraba un LD no significativo ($LD = 0.0473$, $p > 0.001$) con la mutación c.6527insC y por tanto, una baja asociación con ella.



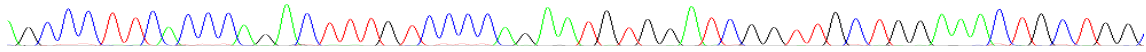
2.4. Estimación de la edad de la mutación c.6527insC

Según el análisis del presente estudio, la edad de los 6 tag SNPs extragénicos en portadores de la inserción c.6527insC, está comprendida entre 5 y 15 generaciones (tabla 25). Como muchos de los portadores de la mutación provienen de Extremadura, Córdoba, Sevilla y Málaga, se calculó también la edad de los 6 tag SNPs en los portadores de esa zona determinada, obteniendo edades comprendidas entre 9 y 12 generaciones. A estos datos es importante añadir la corrección de Luria y Delbrück (Luria and Delbruck 1943) que tiene en cuenta la tasa de crecimiento de la población que alberga a la mutación (r). Los procesos demográficos son para la obtención de edades alélicas, ya que si la población crece muy despacio, necesitará más tiempo para llegar al mismo punto genético que si la población crece con celeridad (Slatkin and Rannala 2000).

Teniendo en cuenta esta corrección, la edad del ancestro común más reciente de los cromosomas portadores de la mutación c.6527insC en nuestra cohorte de pacientes española, se estimó en 40 generaciones aproximadamente. Se tuvieron en cuenta diferentes tasas de crecimiento poblacional, aparte de la española ($r = 0.076$), también la europea ($r = 0.05$) y la de la “zona determinada” ($r = 0.0676$). Por lo que, teniendo en cuenta estas diferencias, la edad alélica se estimó en unas 47 generaciones con datos europeos y en unas 40 generaciones con datos de la “zona determinada”. Como la tasa de crecimiento europea, española y de “zona determinada”) no difieren notoriamente, da una idea de la consistencia de nuestros análisis. Además, puede observarse que en este cálculo las tasas de crecimiento de las diferentes poblaciones no son determinantes ni dan lugar a grandes diferencias.

Colombo y colaboradores describieron esta aproximación matemática para el cálculo de la edad alélica (Colombo 2007), pero existen otras dos aproximaciones para el cálculo de mutaciones recurrentes llevadas a cabo por los programas DMLE+ y BDMC21. Se encontró una diferencia sustancial entre el método desarrollado por Colombo y los otros dos métodos (DMLE+ y BMCD21). Mientras que el primero estima el tiempo del ancestro común más reciente de los cromosomas portadores de una mutación en una población determinada (Colombo 2007), el DMLE+ y BMCD21

Discusión



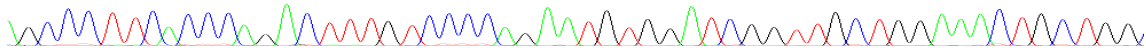
estiman el momento en el que se originó la mutación por primera vez (Greenwood et al. 2010).

Tanto el DMLE+ como el BDMC21 determinan el tiempo transcurrido desde que apareció la mutación hasta la actualidad según la tasa mutacional de los SNPs (10^{-8} , números de divisiones celulares que necesita un SNP para mutar) y la tasa de crecimiento poblacional (r , tiempo que tardan en darse esas divisiones celulares). Estos programas también tienen en cuenta la proporción muestral (f), que mide la frecuencia de portadores de la mutación c.6527insC. Es un dato importante para conocer la expansión de la mutación a lo largo del tiempo. Además, el DMLE+ tiene en cuenta los haplotipos presentes en los portadores de la mutación frente a los haplotipos de la población étnicamente emparentada. Sin embargo, el BDMC21 sólo calcula la edad alélica conociendo el número de SNPs utilizados para la construcción de esos haplotipos.

Mediante el DMLE+ y el BDMC21 se estimó el tiempo en el que la mutación c.6527insC surgió por primera vez, siendo este resultado 122 y 124 generaciones, respectivamente. La edad alélica estimada fluctúa con la variación de la tasa de crecimiento demográfico (calculada también para Europa y la zona determinada), haciendo que las diferencias entre los resultados oscilen entre 47 y 62 generaciones, como se muestra en la Figura 31. Estos resultados muestran que la tasa de crecimiento de la población es un parámetro crítico para estos programas a diferencia del efecto menor de esta tasa en los cálculos hallados y descritos por Colombo.

En la figura 31 se observa claramente la diferencia de edad que existe entre el ancestro común más reciente de los cromosomas portadores de la mutación c.6527insC estimado con el método aplicado por Colombo (línea verde) y el primer evento mutacional, calculado por el DMLE+ y el BDMC21 (líneas roja y azul). Sin embargo, se observa que los resultados obtenidos por el DMLE+ y el BDMC21 son paralelos a pesar de ser calculados con diferentes tasas de crecimiento poblacional. Estos cambios en la tasa de crecimiento poblacional no afectan a la recta obtenida por el método aplicado Colombo, pero sí afectan notoriamente en las rectas obtenidas con los otros dos métodos. En estos dos métodos (DMLE+ y BDMC21) también se observa que las variaciones en el eje de las X, varían notoriamente el

Discusión



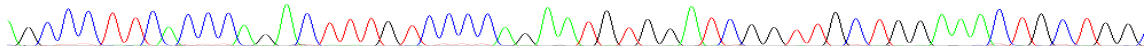
número de generaciones resultantes en el eje de las Y. Una tasa de crecimiento más pequeña (0.05) como es la europea, da lugar a una mutación más antigua que la calculada con tasas de crecimiento más elevadas, como son la de España y la zona determinada, que rondan el 0.06. Si una población crece más despacio, es lógico pensar que tarda más tiempo en llegar al mismo punto genético que si la población crece más rápido. Estos datos apoyan que la tasa de crecimiento poblacional es un punto crítico en el cálculo del momento en el que surgió la mutación por primera vez, dato descrito con anterioridad en otras patologías (Aller et al. 2010). Esta influencia es esperable, ya que es difícil obtener datos exactos sin saber con certeza el crecimiento que se ha dado en la población portadora de la mutación desde que surgió. Sólo tenemos resultados de crecimiento poblacional en España desde 1857, es decir de los últimos 150 años aproximadamente (INE, www.ine.es).

En resumen, la edad del ancestro común más reciente del cromosoma c.6527insC se estimó en aproximadamente 40 generaciones, y la primera mutación surgió en torno a 120 generaciones. Hay una diferencia sustancial entre la edad de aparición de la mutación por primera vez y la edad del primer ancestro común de los portadores actuales de la mutación c.6527insC. El tiempo existente entre estas edades es lo conocido como tiempo de coalescencia o tiempo de fusión entre los cromosomas “muestrales” (Colombo 2007). Podrían existir otros alelos portadores de esta mutación pero tan sólo este linaje es el que ha dado lugar a un efecto fundador.

Como resultado, estimamos que el primer evento mutacional ocurrió 80 generaciones antes de que surgiera el primer ancestro común de los portadores de la mutación c.6527insC en la cohorte española en estudio. Suponiendo un tiempo de 28 años por generación (Fenner 2005) (Tremblay and Vezina 2000), el momento en el que la mutación c.6527insC surgió por primera vez fue entre 3204 y 3416 años (entre el siglo XIII y XV aC). En este período, comunidades pre-romanas estaban asentadas en la mitad sur de la Península Ibérica, área geográfica española mencionada anteriormente por la elevada recurrencia de la mutación c.6527insC.

La edad estimada del ancestro común más reciente es de hace 1100 años aproximadamente, lo que sugiere que el efecto fundador se produjo entre finales del primero y principios de segundo milenio dC, entono al siglo IX dC. Esta estimación de la edad es sensible a una mutación relativamente rara, presente en un área social y

Discusión

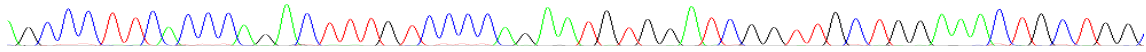


geográficamente restringida. Este último método calcula la edad de cuando los ancestros de la población específica de la mitad sur de la Península Ibérica pasaron por un “cuello de botella”.

Por otra parte, la estimación de la edad es consistente con un escenario históricamente plausible que coincide con un período de esplendor de los Judíos Sefardíes en Al-Andalus, una comunidad endogámica cerrada (Adams et al. 2008). Que la mutación provenga de una población cerrada, es claro a partir de los resultados obtenidos por la construcción de haplotipos intra y extragénicos al gen *COL7A1* discutidos anteriormente. Por ello estos datos afianzan el hecho de que la mutación provenga de una población cerrada como es la judía, la cuál por cultura, no tiende al mestizaje con otras poblaciones, sino más bien a la endogamia. Debido al hecho de que la inserción c.6527insC es una mutación que no ha sido identificada entre las poblaciones judías sefardíes, en este trabajo se postula que las familias portadoras de la mutación c.6527insC podían pertenecer al grupo de los Judíos convertidos al catolicismo que se quedaron en Andalucía después de haber sido expulsados de España en el siglo XV. Posiblemente, tras convertirse al catolicismo y con el paso del tiempo, se produjo un mestizaje que llevó a la población portadora de la mutación a salir del cuello de botella, produciéndose una expansión de la misma, que explicaría su elevada recurrencia actual en España.

Aunque no podemos asegurar su origen español, como se ha mencionado anteriormente, esta mutación tan sólo se ha encontrada dentro de Europa, en un paciente aislado en Francia (Hovnanian et al. 1997) y otro en Alemania (Kern et al. 2006) dos países con una larga historia de inmigración española a mediados del siglo XX. La elevada recurrencia de c.6527insC en Chile también puede ser explicada por la colonización española iniciada alrededor del 1600, época en la que se produjo la expulsión de los judíos sefardíes no convertidos al catolicismo y 500 años después de la aparición del primer ancestro común de los portadores españoles de c.6527insC.

Discusión



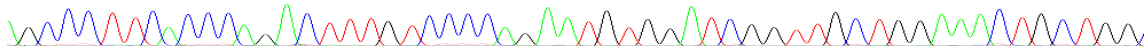
El carácter intrafamiliar de las mutaciones encontradas en el gen *COL7A1* y el gran tamaño del propio gen, dificultan el diagnóstico genético de la EBD. Por tanto, la elevada recurrencia de la mutación c.6527insC en nuestra población, nos permite realizar un cribado rápido que acelera el diagnóstico molecular. Además, en nuestro estudio, el elevado número de pacientes con EBD portadores de la mutación c.6527insC en homocigosis nos permite ofrecer un pronóstico más certero en su evolución patológica.

En nuestra opinión, la detección de portadores de la mutación c.6527insC debe ofrecerse a todas las parejas con ascendencia de la Península Ibérica en analogía con las recomendaciones del Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos de Tay-Sachs en personas de ascendencia judía europea (<http://www.acog.org>).

El hecho de que todos los pacientes españoles de EBD portadores de la mutación c.6527insC presenten un mismo fondo genético dentro del gen *COL7A1*, permite diseñar estrategias de terapia génica personalizada para la reparación de la mutación a través de la recombinación homóloga y otros abordajes tanto moleculares como farmacológicos.



CONCLUSIONES

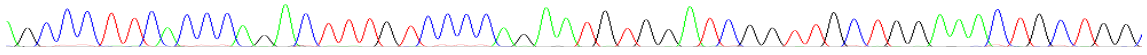


CONCLUSIONES

1. La elevada e inusual frecuencia de la mutación c.6527insC en pacientes con EBD en España, se debe a un efecto fundador localizado en el suroeste de la Península Ibérica. Este hecho está apoyado por: i) la segregación del haplotipo intragénico Hi.5 en todos los alelos portadores de esta inserción, ii) la baja frecuencia en la población control de este mismo haplotipo y, iii) la segregación de un haplotipo extragénico al gen *COL7A1* (E8) en más del 80% de los alelos portadores de esta inserción.
2. El carácter intrafamiliar de las mutaciones del gen *COL7A1* y el gran tamaño del propio gen, dificultan el diagnóstico genético de la EBD. La elevada recurrencia de la mutación c.6527insC en la cohorte de pacientes españoles, permite realizar un cribado rápido que acelera el diagnóstico molecular. Además, optimiza un pronóstico más certero de la patología, ya que todos los cromosomas que expresan la inserción comparten el mismo fondo genético.
3. Se estima que el primer evento mutacional de c.6527insC ocurrió hace aproximadamente 3400 años.
4. Se considera que el ancestro común más reciente de los cromosomas portadores de la inserción c.6527insC surgió en España en torno a los 1100 años. Este periodo coincide con el esplendor de la población judía en el suroeste de la Península Ibérica, zona geográfica de la que proviene la mutación.
5. Como la inserción c.6527insC no ha sido identificada en las poblaciones judías sefardíes actuales, se postula que las familias portadoras provienen de Judíos convertidos al catolicismo, hecho que dió lugar a una focalización y expansión posterior de la mutación, explicando su elevada frecuencia alélica en la actualidad.



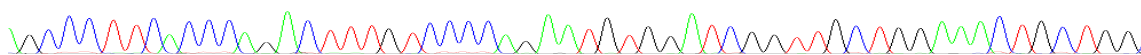
BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

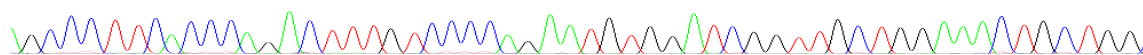
- Adams, S. M., E. Bosch, P. L. Balaesque, S. J. Ballereau, A. C. Lee, E. Arroyo, A. M. Lopez-Parra, M. Aler, M. S. Grifo, M. Brion, A. Carracedo, J. Lavinha, B. Martinez-Jarreta, L. Quintana-Murci, A. Picornell, M. Ramon, K. Skorecki, D. M. Behar, F. Calafell & M. A. Jobling (2008) The genetic legacy of religious diversity and intolerance: paternal lineages of Christians, Jews, and Muslims in the Iberian Peninsula. *Am J Hum Genet*, 83, 725-36.
- Aller, E., L. Larrieu, T. Jaijo, D. Baux, C. Espinos, F. Gonzalez-Candelas, C. Najera, F. Palau, M. Claustres, A. F. Roux & J. M. Millan (2010) The USH2A c.2299delG mutation: dating its common origin in a Southern European population. *Eur J Hum Genet*, 18, 788-93.
- Bahamonde Magro, A. & L. E. Otero Carbajar. 2004. Historia de España. In *Enciclopedia temática Oxford.*, ed. D. editorial, 155-226. Barcelona.
- Barrett, J. C., B. Fry, J. Maller & M. J. Daly (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21, 263-5.
- Bdmc21 (<http://www.rannala>)
- Bengtsson, B. O. & G. Thomson (1981) Measuring the strength of associations between HLA antigens and diseases. *Tissue Antigens*, 18, 356-63.
- Bermejo, E. (2005) Epidermolysis Bullosa (EB): Patogenesis, clinical, diagnostic and genetic aspects, molecular basis, epidemiological aspects, management of patients with EB translational implications of mutation analysis. *Boletín del ECEMC: Revista de Dismorfología y Epidemiología*, V.
- Bodemer, C., S. I. Tchen, S. Ghomrasseni, S. Segquier, F. Gaultier, S. Fraitag, Y. de Prost & G. Godeau (2003) Skin expression of metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in sibling patients with recessive dystrophic epidermolysis and intrafamilial phenotypic variation. *J Invest Dermatol*, 121, 273-9.
- Brittingham, R., M. Colombo, H. Ito, A. Steplewski, D. E. Birk, J. Uitto & A. Fertala (2005) Single amino acid substitutions in procollagen VII affect early stages of assembly of anchoring fibrils. *J Biol Chem*, 280, 191-8.
- Bruckner-Tuderman, L. & C. Has (2012) Molecular heterogeneity of blistering disorders: the paradigm of epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*, 132, E2-5.

Bibliografía



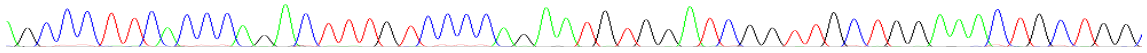
- Bruckner-Tuderman, L., S. Ruegger, B. Odermatt, Y. Mitsuhashi & U. W. Schnyder (1988) Lack of type VII collagen in unaffected skin of patients with severe recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Dermatologica*, 176, 57-64.
- Burgeson, R. E. (1993) Type VII collagen, anchoring fibrils, and epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*, 101, 252-5.
- Burgeson, R. E., N. P. Morris, L. W. Murray, K. G. Duncan, D. R. Keene & L. Y. Sakai (1985) The structure of type VII collagen. *Ann N Y Acad Sci*, 460, 47-57.
- Carballo Govenecche, V. 1875. Colección de historiadores de Chile y documentos relativos a la historia nacional.
- Cepeda-Valdes, R., G. Pohla-Gubo, J. R. Borbolla-Escoboza, O. Barboza-Quintana, J. Ancer-Rodriguez, H. Hintner & J. C. Salas-Alanis (2010) [Immunofluorescence mapping for diagnosis of congenital epidermolysis bullosa]. *Actas Dermosifiliogr*, 101, 673-82.
- Christiano, A. M., S. Amano, L. F. Eichenfield, R. E. Burgeson & J. Uitto (1997) Premature termination codon mutations in the type VII collagen gene in recessive dystrophic epidermolysis bullosa result in nonsense-mediated mRNA decay and absence of functional protein. *J Invest Dermatol*, 109, 390-4.
- Christiano, A. M., G. Anhalt, S. Gibbons, E. A. Bauer & J. Uitto (1994a) Premature termination codons in the type VII collagen gene (COL7A1) underlie severe, mutilating recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Genomics*, 21, 160-8.
- Christiano, A. M., L. C. Chung-Honet, A. Hovnanian & J. Uitto (1992) PCR-based detection of two exonic polymorphisms in the human type VII collagen gene (COL7A1) at 3p21.1. *Genomics*, 14, 827-8.
- Christiano, A. M., G. G. Hoffman, L. C. Chung-Honet, S. Lee, W. Cheng, J. Uitto & D. S. Greenspan (1994b) Structural organization of the human type VII collagen gene (COL7A1), composed of more exons than any previously characterized gene. *Genomics*, 21, 169-79.
- Christiano, A. M., J. A. McGrath, K. C. Tan & J. Uitto (1996a) Glycine substitutions in the triple-helical region of type VII collagen result in a spectrum of dystrophic epidermolysis bullosa phenotypes and patterns of inheritance. *Am J Hum Genet*, 58, 671-81.

Bibliografía



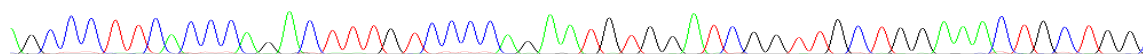
- Christiano, A. M., J. A. McGrath & J. Uitto (1996b) Influence of the second COL7A1 mutation in determining the phenotypic severity of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*, 106, 766-70.
- Christiano, A. M., M. Ryyanen & J. Uitto (1994c) Dominant dystrophic epidermolysis bullosa: identification of a Gly-->Ser substitution in the triple-helical domain of type VII collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 3549-53.
- Christiano, A. M. & J. Uitto (1996) Molecular complexity of the cutaneous basement membrane zone. Revelations from the paradigms of epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol*, 5, 1-11.
- COL7A1-Gene. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1294>.
- COL7A1-OMIM. <http://www.metabase.com/OMIM/120120>.
- Colombo, R. 2007. Dating mutations. In *Encyclopedie of life sciences*, ed. J. Wiley.
- Consortium, I. H. G. S. (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431, 931-45.
- Consortium., I. H. (2003) The International HapMap Project. *Nature*, 426, 789-96.
- Cooper, D. & H. Youssoufian (1988) The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum Genet*, 78, 151-5.
- Csikos, M., H. I. Szocs, A. Laszik, S. Mecklenbeck, A. Horvath, S. Karpati & L. Bruckner-Tuderman (2005) High frequency of the 425A-->G splice-site mutation and novel mutations of the COL7A1 gene in central Europe: significance for future mutation detection strategies in dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol*, 152, 879-86.
- Cuadrado-Corrales, N., C. Sanchez Jimeno, M. García, M. J. Escamez, N. Illera, A. Hernandez-Martin, M. J. Trujillo-Tieba, C. Ayuso & M. Del Rio (2010a) A prevalent mutation with founder effect in Spanish Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa families. *BMC Med Genet*, 29, 139.
- Cuadrado-Corrales, N., C. Sanchez-Jimeno, M. Garcia, M. J. Escamez, N. Illera, A. Hernandez-Martin, M. J. Trujillo-Tiebas, C. Ayuso & M. Del Rio (2010b) A prevalent mutation with founder effect in Spanish Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa families. *BMC Med Genet*, 11, 139.
- Danescu, S., S. Senila, L. Lelutiu, S. Nedevschi & R. Cosgarea Dystrophic epidermolysis bullosa: two case reports. *Rom J Morphol Embryol*, 52, 919-22.

Bibliografía



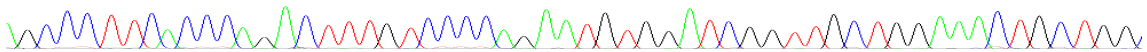
- Dang, N. & D. F. Murrell (2008) Mutation analysis and characterization of COL7A1 mutations in dystrophic epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol*, 17, 553-68.
- Diaz, G. A., B. D. Gelb, N. Risch, T. G. Nygaard, A. Frisch, I. J. Cohen, C. S. Miranda, O. Amaral, I. Maire, L. Poenaru, C. Caillaud, M. Weizberg, P. Mistry & R. J. Desnick (2000) Gaucher disease: the origins of the Ashkenazi Jewish N370S and 84GG acid beta-glucosidase mutations. *Am J Hum Genet*, 66, 1821-32.
- Dmle+ <http://www.dmle.org>.
- Durst, R., R. Colombo, S. Shpitzen, L. B. Avi, Y. Friedlander, R. Wexler, F. J. Raal, D. A. Marais, J. C. Defesche, M. Y. Mandelshtam, M. J. Kotze, E. Leitersdorf & V. Meiner (2001) Recent origin and spread of a common Lithuanian mutation, G197del LDLR, causing familial hypercholesterolemia: positive selection is not always necessary to account for disease incidence among Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet*, 68, 1172-88.
- Escamez, M. J., M. Garcia, N. Cuadrado-Corrales, S. G. Llamas, A. Charlesworth, N. De Luca, N. Illera, C. Sanchez-Jimeno, A. Holguin, B. Duarte, M. J. Trujillo-Tiebas, J. L. Vicario, J. L. Santiago, A. Hernandez-Martin, A. Torrelo, D. Castiglia, C. Ayuso, F. Larcher, J. L. Jorcano, A. Meana, G. Meneguzzi, G. Zambruno & M. Del Rio (2010) The first COL7A1 mutation survey in a large Spanish dystrophic epidermolysis bullosa cohort: c.6527insC disclosed as an unusually recurrent mutation. *Br J Dermatol*, 163, 155-61.
- Falconer, D. & T. Mackay. 1996. *Introducción a la genética cuantitativa*.
- Fawcett. 1999. *Compendio de Histología*.
- Fenner, J. N. (2005) Cross-cultural estimation of the human generation interval for use in genetics-based population divergence studies. *Am J Phys Anthropol*, 128, 415-23.
- Fine, J. D. (2010a) Inherited epidermolysis bullosa. *Orphanet J Rare Dis*, 5, 12.
- Fine, J.D. (2010b) Inherited epidermolysis bullosa: past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci*, 1194, 213-22.
- Fine, J.D. (2010c) Inherited epidermolysis bullosa: recent basic and clinical advances. *Curr Opin Pediatr*, 22, 453-8.

Bibliografía



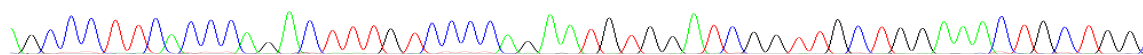
- Fine, J. D., E. A. Bauer, R. A. Briggaman, D. M. Carter, R. A. Eady, N. B. Esterly, K. A. Holbrook, S. Hurwitz, L. Johnson, A. Lin & et al. (1991) Revised clinical and laboratory criteria for subtypes of inherited epidermolysis bullosa. A consensus report by the Subcommittee on Diagnosis and Classification of the National Epidermolysis Bullosa Registry. *J Am Acad Dermatol*, 24, 119-35.
- Fine, J. D., R. A. Eady, E. A. Bauer, J. W. Bauer, L. Bruckner-Tuderman, A. Heagerty, H. Hintner, A. Hovnanian, M. F. Jonkman, I. Leigh, J. A. McGrath, J. E. Mellerio, D. F. Murrell, H. Shimizu, J. Uitto, A. Vahlquist, D. Woodley & G. Zambruno (2008) The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. *J Am Acad Dermatol*, 58, 931-50.
- Fontdevila, A. & A. Moya. 1999. Introducción a la genética de poblaciones.
- Gardella, R., S. Barlati, N. Zoppi, G. Tadini & M. Colombi (2000) A -96C-->T mutation in the promoter of the collagen type VII gene (COL7A1) abolishing transcription in a patient affected by recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Hum Mutat*, 16, 275.
- Gardella, R., D. Castiglia, P. Posteraro, S. Bernardini, N. Zoppi, M. Paradisi, G. Tadini, S. Barlati, J. A. McGrath, G. Zambruno & M. Colombi (2002) Genotype-phenotype correlation in italian patients with dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*, 119, 1456-62.
- Genin, E., A. Tullio-Pelet, F. Begeot, S. Lyonnet & L. Abel (2004) Estimating the age of rare disease mutations: the example of Triple-A syndrome. *J Med Genet*, 41, 445-9.
- Greenspan, D. S., M. G. Byers, R. L. Eddy, G. G. Hoffman & T. B. Shows (1993) Localization of the human collagen gene COL7A1 to 3p21.3 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 62, 35-6.
- Greenwood, C. M., S. Sun, J. Veenstra, N. Hamel, B. Niell, S. Gruber & W. D. Foulkes (2010) How old is this mutation? - a study of three Ashkenazi Jewish founder mutations. *BMC Genet*, 11, 39.
- Guttmacher, A. & F. Collins (2002) Genomic Medicine-A primer. *N Engl J Med*, 347, 1512-20.
- Hap-Map-Proyect. <http://www.hapmap.org/>.
- Haploview-Program. <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>

Bibliografía



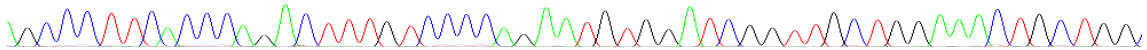
- Has, C. (2011) Molecular genetic assays for inherited epidermolysis bullosa. *Clin Dermatol*, 29, 420-6.
- Hashmi, S. & M. P. Marinkovich (2011) Molecular organization of the basement membrane zone. *Clin Dermatol*, 29, 398-411.
- Hauschild, R., U. Wollina & L. Bruckner-Tuderman (2001) Junctional epidermolysis bullosa gravis (Herlitz): diagnostic and genetic aspects. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 15, 73-6.
- Hernandez-Martin, A. & A. Torrelo (2010) [Inherited epidermolysis bullosa: from diagnosis to reality]. *Actas Dermosifiliogr*, 101, 495-505.
- Hovnanian, A., P. Duquesnoy, C. Blanchet-Bardon, R. G. Knowlton, S. Amselem, M. Lathrop, L. Dubertret, J. Uitto & M. Goossens (1992) Genetic linkage of recessive dystrophic epidermolysis bullosa to the type VII collagen gene. *J Clin Invest*, 90, 1032-6.
- Hovnanian, A., A. Rochat, C. Bodemer, E. Petit, C. A. Rivers, C. Prost, S. Fraitag, A. M. Christiano, J. Uitto, M. Lathrop, Y. Barrandon & Y. de Prost (1997) Characterization of 18 new mutations in COL7A1 in recessive dystrophic epidermolysis bullosa provides evidence for distinct molecular mechanisms underlying defective anchoring fibril formation. *Am J Hum Genet*, 61, 599-610.
- Illera, N. 2009. APLICACIÓN DE LA PCR EN GRADIENTE PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA EPIDERMOLISIS BULLOSA DISTRÓFICA.
- Iniesta R, G. E., Moreno V (2005) (Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies. *Gac Sanit.* , 19, 333-41.
- Intong, L. R. & D. F. Murrell (2011) Inherited epidermolysis bullosa: new diagnostic criteria and classification. *Clin Dermatol*, 30, 70-7.
- Jarvikallio, A., L. Pulkkinen & J. Uitto (1997) Molecular basis of dystrophic epidermolysis bullosa: mutations in the type VII collagen gene (COL7A1). *Hum Mutat*, 10, 338-47.
- Jeffrey L. Melton, M. D. 1996. *Anatomy and Histology of Normal Skin - Contents.*
- Jeffreys, A. J., L. Kauppi & R. Neumann (2001) Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex. *Nat Genet*, 29, 217-22.
- Junqueira. 2005. *Histología Básica.*
- Kalinin AE, K. A., Steinert PM. (2002) Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays*, 24, 789-800.

Bibliografia



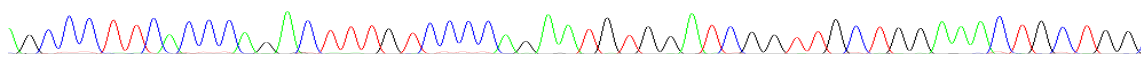
- Keene, D. R., M. P. Marinkovich & L. Y. Sakai (1997) Immunodissection of the connective tissue matrix in human skin. *Microsc Res Tech*, 38, 394-406.
- Kennedy, G. C., H. Matsuzaki, S. Dong, W. M. Liu, J. Huang, G. Liu, X. Su, M. Cao, W. Chen, J. Zhang, W. Liu, G. Yang, X. Di, T. Ryder, Z. He, U. Surti, M. S. Phillips, M. T. Boyce-Jacino, S. P. Fodor & K. W. Jones (2003) Large-scale genotyping of complex DNA. *Nat Biotechnol*, 21, 1233-7.
- Kern, J. S., G. Gruninger, R. Imsak, M. L. Muller, H. Schumann, D. Kiritsi, S. Emmert, W. Borozdin, J. Kohlhase, L. Bruckner-Tuderman & C. Has (2009) Forty-two novel COL7A1 mutations and the role of a frequent single nucleotide polymorphism in the MMP1 promoter in modulation of disease severity in a large European dystrophic epidermolysis bullosa cohort. *Br J Dermatol*.
- Kern, J. S., J. Kohlhase, L. Bruckner-Tuderman & C. Has (2006) Expanding the COL7A1 mutation database: novel and recurrent mutations and unusual genotype-phenotype constellations in 41 patients with dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*, 126, 1006-12.
- Kimber I, C. M., Dearman RJ, Bhushan M, Griffiths CE. (2000) Cytokines and chemokines in the initiation and regulation of epidermal Langerhans cell mobilization. *Br J Dermatol.*, 142, 401-12.
- Labuda, D., E. Zietkiewicz & M. Labuda (1997) The genetic clock and the age of the founder effect in growing populations: a lesson from French Canadians and Ashkenazim. *Am J Hum Genet*, 61, 768-71.
- Labuda, M., D. Labuda, M. Korab-Laskowska, D. E. Cole, E. Zietkiewicz, J. Weissenbach, E. Popowska, E. Pronicka, A. W. Root & F. H. Glorieux (1996) Linkage disequilibrium analysis in young populations: pseudo-vitamin D-deficiency rickets and the founder effect in French Canadians. *Am J Hum Genet*, 59, 633-43.
- Lander, E. S. & D. Botstein (1986) Strategies for studying heterogeneous genetic traits in humans by using a linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 7353-7.
- Leblond, C. P. & S. Inoue (1989) Structure, composition, and assembly of basement membrane. *Am J Anat*, 185, 367-90.
- Lee, S. H., S. E. Kim, E. B. Noh, S. W. Oh & S. C. Kim (2013) Novel deletion mutation (c.3717del5) in COL7A1 in a patient with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Dermatol*, 40, 59-61.

Bibliografía



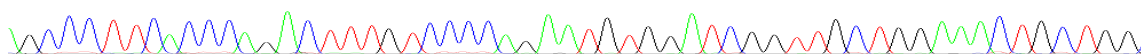
- Lewin, B. 2001. Genes VII.
- Lin, Y., X. J. Chen, W. Liu, B. Gong, J. Xie, J. H. Xiong, J. Cheng, X. L. Duan, Z. C. Lin, L. L. Huang, H. Y. Wan, X. Q. Liu, L. H. Song & Z. L. Yang (2012) Two novel mutations on exon 8 and intron 65 of COL7A1 gene in two Chinese brothers result in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *PLoS One*, 7, e50579.
- Louis, S. 2006. Histology and Cell Biology.
- Luria, S. E. & M. Delbruck (1943) Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics*, 28, 491-511.
- Makino, E., H. Nakano, D. Sawamura & W. Fujimoto (2012) Recessive dystrophic epidermolysis bullosa: identification of a novel COL7A1 mutation of D44N. *J Dermatol Sci*, 68, 109-12.
- Mega-Blast. www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/mmtrace.shtml.
- Mellerio, J. E., M. G. Dunnill, W. Allison, G. H. Ashton, A. M. Christiano, J. Uitto, R. A. Eady & J. A. McGrath (1997) Recurrent mutations in the type VII collagen gene (COL7A1) in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*, 109, 246-9.
- Morell, R. J., H. J. Kim, L. J. Hood, L. Goforth, K. Friderici, R. Fisher, G. Van Camp, C. I. Berlin, C. Oddoux, H. Ostrer, B. Keats & T. B. Friedman (1998) Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *N Engl J Med*, 339, 1500-5.
- Ogawa, H. (1996) The Merkel cell as a possible mechanoreceptor cell. *Prog Neurobiol*, 49, 317-34.
- Pearson, R. W. (1962) Studies on the pathogenesis of epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*, 39, 551-75.
- Rannala, B. & J. P. Reeve (2001) High-resolution multipoint linkage-disequilibrium mapping in the context of a human genome sequence. *Am J Hum Genet*, 69, 159-78.
- Rannala, B (2003) Joint Bayesian estimation of mutation location and age using linkage disequilibrium. *Pac Symp Biocomput*, 526-34.
- Rannala, B. & M. Slatkin (1998) Likelihood analysis of disequilibrium mapping, and related problems. *Am J Hum Genet*, 62, 459-73.
- Rao, R., J. Mellerio, B. S. Bhogal & R. Groves (2012) Immunofluorescence antigen mapping for hereditary epidermolysis bullosa. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 78, 692-7.

Bibliografía



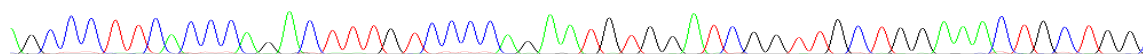
- Reeve, J. P. & B. Rannala (2002) DMLE+: Bayesian linkage disequilibrium gene mapping. *Bioinformatics*, 18, 894-5.
- Reich, D. E. & D. B. Goldstein. Estimating the age of mutations using variation at linked markers.
- Risch, N., D. de Leon, L. Ozelius, P. Kramer, L. Almasy, B. Singer, S. Fahn, X. Breakefield & S. Bressman (1995) Genetic analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews and their recent descent from a small founder population. *Nat Genet*, 9, 152-9.
- Ritelli, M., N. Chiarelli, S. Quinzani, C. Dordoni, M. Venturini, P. Calzavara-Pinton & M. Colombi (2012) Compound heterozygosity of the novel -186C>T mutation in the COL7A1 promoter and the recurrent c.497insA mutation leads to generalized dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol*.
- Rodriguez, F. A., M. J. Gana, M. J. Yubero, G. Zillmann, S. M. Kramer, J. Catalan, J. Rubio-Astudillo, S. Gonzalez, L. Liu, L. Ozoemena, J. E. Mellerio, J. A. McGrath, F. Palisson & P. Conget (2012) Novel and recurrent COL7A1 mutations in Chilean patients with dystrophic epidermolysis bullosa. *J Dermatol Sci*, 65, 149-52.
- Ross, M. H. 2007. *Histología: Texto y Atlas color, con Biología Celular y Molecular*.
- Salas-Alanis, J. C., M. Amaya-Guerra & J. A. McGrath (2000) The molecular basis of dystrophic epidermolysis bullosa in Mexico. *Int J Dermatol*, 39, 436-42.
- Sanchez-Jimeno, C., N. Cuadrado-Corrales, E. Aller, M. Garcia, M. J. Escamez, N. Illera, M. J. Trujillo-Tiebas, C. Ayuso, J. M. Millan & M. Del Rio (2012) Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa: The origin of the c.6527insC mutation in the Spanish population. *Br J Dermatol*.
- Schneider-Yin, X., M. Hergersberg, D. E. Goldgar, U. B. Rufenacht, M. M. Schuurmans, H. Puy, J. C. Deybach & E. I. Minder (2002) Ancestral founder of mutation W283X in the porphobilinogen deaminase gene among acute intermittent porphyria patients. *Hum Hered*, 54, 69-81.
- Segre, J. (2006) Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J Clin Invest*, 116, 1150-8.
- Shinkuma, S., J. R. McMillan & H. Shimizu (2011) Ultrastructure and molecular pathogenesis of epidermolysis bullosa. *Clin Dermatol*, 29, 412-9.
- Slatkin, M. & B. Rannala (1997) Estimating the age of alleles by use of intraallelic variability. *Am J Hum Genet*, 60, 447-58.

Bibliografia

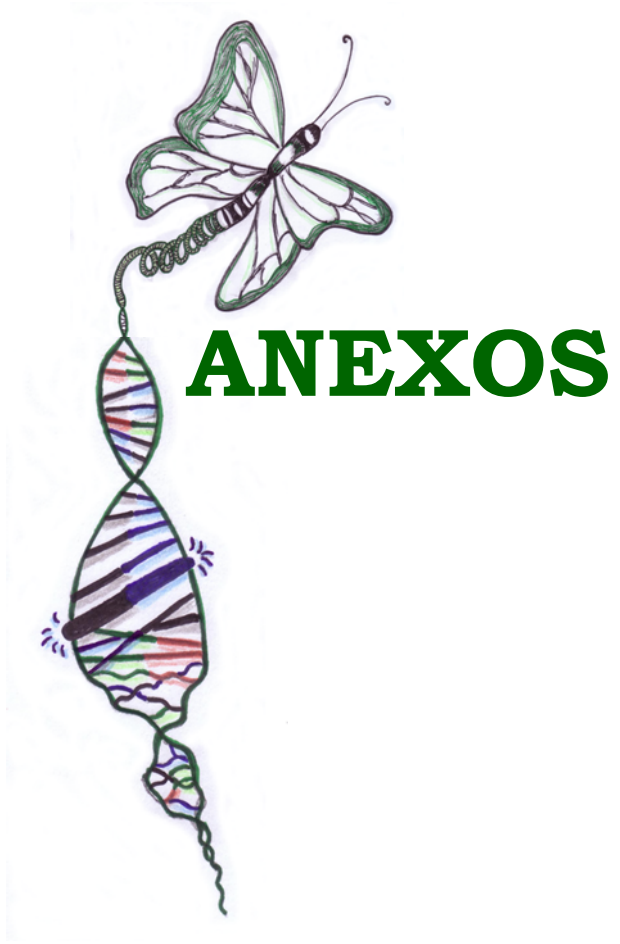


- Slatkin, M. (2000) Estimating allele age. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 1, 225-49.
- Strachan, T. & A. Read. 2004. *Human Molecular Genetics*. New York: Wiley-Liss; 1999. .
- Tamai, K., T. Murai, M. Mayama, A. Kon, K. Nomura, D. Sawamura, K. Hanada, I. Hashimoto, H. Shimizu, T. Masunaga, T. Nishikawa, Y. Mitsuhashi, A. Ishida-Yamamoto, S. Ikeda, H. Ogawa, J. A. McGrath, L. Pulkkinen & J. Uitto (1999) Recurrent COL7A1 mutations in Japanese patients with dystrophic epidermolysis bullosa: positional effects of premature termination codon mutations on clinical severity. Japanese Collaborative Study Group on Epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol*, 112, 991-3.
- Tidman, M. J. & R. A. Eady (1985) Evaluation of anchoring fibrils and other components of the dermal-epidermal junction in dystrophic epidermolysis bullosa by a quantitative ultrastructural technique. *J Invest Dermatol*, 84, 374-7.
- Titeux, M., V. Pendaries, L. Tonasso, A. Decha, C. Bodemer & A. Hovnanian (2008) A frequent functional SNP in the MMP1 promoter is associated with higher disease severity in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Hum Mutat*, 29, 267-76.
- Tremblay, M. & H. Vezina (2000) New estimates of intergenerational time intervals for the calculation of age and origins of mutations. *Am J Hum Genet*, 66, 651-8.
- van den Akker, P. C., M. F. Jonkman, T. Rengaw, L. Bruckner-Tuderman, C. Has, J. W. Bauer, A. Klausegger, G. Zambruno, D. Castiglia, J. E. Mellerio, J. A. McGrath, A. J. van Essen, R. M. Hofstra & M. A. Swertz (2011) The international dystrophic epidermolysis bullosa patient registry: an online database of dystrophic epidermolysis bullosa patients and their COL7A1 mutations. *Hum Mutat*, 32, 1100-7.
- Varki, R., S. Sadowski, J. Uitto & E. Pfenninger (2007) Epidermolysis bullosa. II. Type VII collagen mutations and phenotype-genotype correlations in the dystrophic subtypes. *J Med Genet*, 44, 181-92.
- Web-primer. <http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>
- Wertheim-Tysarowska, K., A. Sobczynska-Tomaszewska, C. Kowalewski, M. Skronski, G. Swieckowski, A. Kutkowska-Kazmierczak, K. Wozniak & J. Bal (2011) The COL7A1 mutation database. *Hum Mutat*, 33, 327-31.

Bibliografía



- Whittock, N. V., G. H. Ashton, R. Mohammadi, J. E. Mellerio, C. G. Mathew, S. J. Abbs, R. A. Eady & J. A. McGrath (1999) Comparative mutation detection screening of the type VII collagen gene (COL7A1) using the protein truncation test, fluorescent chemical cleavage of mismatch, and conformation sensitive gel electrophoresis. *J Invest Dermatol*, 113, 673-86.
- Wigginton, J. E., D. J. Cutler & G. R. Abecasis (2005) A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet*, 76, 887-93.
- Xing, C., F. R. Schumacher, G. Xing, Q. Lu, T. Wang & R. C. Elston (2005) Comparison of microsatellites, single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and composite markers derived from SNPs in linkage analysis. *BMC Genet*, 6 Suppl 1, S29.
- Yang, C. S., Y. Lu, A. Farhi, C. Nelson-Williams, M. Kashgarian, E. J. Glusac, R. P. Lifton, R. J. Antaya & K. A. Choate (2012) An incompletely penetrant novel mutation in COL7A1 causes epidermolysis bullosa pruriginosa and dominant dystrophic epidermolysis bullosa phenotypes in an extended kindred. *Pediatr Dermatol*, 29, 725-31.



ANEXOS

ANEXO I:

- **Formulario de petición estudio genético**
- **Consentimiento informado.**

ANEXO II:

- **Ficha clínica.**

ANEXO III:

- **Publicaciones**

ANEXO I:

- **Formulario de petición estudio genético**
- **Consentimiento informado.**

FORMULARIO DE PETICIÓN ESTUDIO GENÉTICO

DATOS PETICIONARIO			
Centro/Hospital	Departamento	Fecha de recogida	
Nombre	Apellidos	e-mail	
Dirección		Ciudad	
Provincia	Código Postal	Tlf.	Fax

DATOS PACIENTE			
Nombre	Apellidos	Sexo H <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>	Fecha nacimiento
Nº SS	Nº Historia		
Dirección		Ciudad	
Provincia	Código Postal	Tlf.	e-mail

DATOS MUESTRA		
Fecha de extracción	Sangre EDTA <input type="checkbox"/> SUERO <input type="checkbox"/>	Biopsia piel Sana <input type="checkbox"/> Ampolla recién inducida <input type="checkbox"/>
DNA	Código identificación en origen	Código identificación CIEMAT
OTRAS MUESTRAS (especificar)		

Conforme a la Ley 42/2002 Reguladora de la Autonomía del Paciente y a la Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, el peticionario debe disponer del consentimiento del paciente para llevar a cabo las pruebas diagnósticas solicitadas y para el tratamiento de sus datos. De este modo, y como información a facilitar al paciente, hemos de comunicarles que los datos recogidos en el presente formulario serán incorporados a un fichero automatizado de carácter confidencial, debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de datos, conforme a los términos establecidos en la Ley 15/1999, cuya titularidad corresponde al Instituto de Salud Carlos III, con la finalidad de gestionar el estudio diagnóstico descrito en el formulario, pudiendo ejercer en cualquier momento los derechos de acceso, rectificación, cancelación u oposición, reconocidos por la citada normativa en materia de protección de datos de carácter personal, mediante el envío de carta certificada a la siguiente dirección: Instituto de salud Carlos III. Att. Dr. Manuel Posada, C/ Sinesio Delgado, 6-28029 Madrid.

Prof. MARCELA DEL RIO NECHAEVSKY
 Departamento de Bioingeniería-UC3M
 CIEMAT-CIBER de Enfermedades Raras
 Unidad de Medicina Regenerativa-U714
 División de Biomedicina Epitelial
 Ministerio de Ciencia e Innovación
<http://www.ciberer.es>

Persona de contacto:
 M^a José Escámez Toledano
 Avda. Complutense 22 Edif 70-A
 28040MADRID
 Fax: 34-91-346-6484
 Tfno: 34-91- 496-25-26
 email: mj.escamez@ciemat.es

DATOS MUESTRAS OTROS FAMILIARES

Nombre y Apellidos, relación con el paciente, fecha de nacimiento, Código identificación en origen y CIEMAT/UC3M		
	EDTA <input type="checkbox"/>	DNA <input type="checkbox"/>
	EDTA <input type="checkbox"/>	DNA <input type="checkbox"/>
	EDTA <input type="checkbox"/>	DNA <input type="checkbox"/>
	EDTA <input type="checkbox"/>	DNA <input type="checkbox"/>
	EDTA <input type="checkbox"/>	DNA <input type="checkbox"/>
	EDTA <input type="checkbox"/>	DNA <input type="checkbox"/>

DATOS CLÍNICOS DEL PACIENTE

Diagnóstico	Edad de diagnóstico
Antecedentes familiares (*): SÍ <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	

(*): En caso afirmativo citar antecedentes y adjuntar cuando sea posible y con las correspondientes autorizaciones toda la información clínica pertinente

DEVOLUCIÓN DEL EXCEDENTE DE MUESTRA

¿El paciente desea ceder el excedente de muestra para que sea utilizada con fines de investigación y así contribuir al desarrollo de los avances en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la epidermolisis bullosa?

SÍ El paciente debe recibir, entender y firmar el CI para el uso de excedente de muestra en investigación biomédica (Ley 14/2007), que se encuentra adjunto a esta solicitud

NO

Firma Médico y Sello Centro

Firma paciente

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL USO DE EXCEDENTES DE MUESTRA PARA DIAGNOSTICO E INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN CASOS DE EPIDERMOLISIS BULLOSA

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE:

Finalidad

Vd. y/o su familia padecen una enfermedad de base genética y Vd. o su médico han solicitado un procedimiento de diagnóstico para ayudar a la evaluación clínica de dicha enfermedad. Vd. no va a ser sometido a ningún procedimiento extraordinario distinto del proceso de diagnóstico habitual. Este documento tiene por objeto solicitar su autorización escrita para llevar a cabo tal diagnóstico (y en los miembros no afectados mayores de edad como se contempla legalmente) y un estudio de histocompatibilidad (HLA) entre los miembros de la familia. Asimismo solicitamos también su consentimiento para la dación gratuita de la parte sobrante de muestra para ser utilizada en investigación biomédica relacionada con la Epidermolisis Bullosa e incorporarla a un Biobanco.

Es importante que lea detenidamente esta hoja de información al paciente, que entienda su contenido y el objeto de la misma y que, en su caso, haga todas las preguntas que crea preciso acerca de la misma.

El Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) es uno de los siete consorcios CIBER creados por el Instituto de Salud Carlos III en 2006 para fomentar la investigación de excelencia en el campo de la Biomedicina y las Ciencias de la Salud. Son objetivos del CIBERER el estudio, la investigación y la búsqueda de soluciones científicas, técnicas y clínicas a los problemas de conocimiento y tratamiento que se plantean a las personas que padecen enfermedades raras, así como el apoyo a las iniciativas asistenciales y sociales que afectan a los enfermos y a sus familiares. La Unidad de Medicina Regenerativa del CIEMAT (unidad 714 del CIBERER) se dedica a la investigación en diagnóstico y tratamiento por ingeniería tisular cutánea de genodermatosis, específicamente en Epidermolisis Bullosa. En el campo de las enfermedades raras el CIBERER destina sus recursos a investigación básica y aplicada, ya que tiene una especial preocupación en conseguir que los avances obtenidos en la investigación sobre la Epidermolisis Bullosa puedan trasladarse lo antes posible a la práctica clínica de modo que el paciente afectado por esta enfermedad sea el principal beneficiario del esfuerzo investigador.

El avance de la ciencia y de la medicina exige que se realice investigación sobre muestras humanas, ya sea de enfermos o de familiares sanos. Dicho avance resulta especialmente importante en el ámbito de la Epidermolisis Bullosa. La Epidermolisis Bullosa es un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas de la piel o genodermatosis caracterizadas por la formación de ampollas cutáneas espontáneas o inducidas por un trauma mínimo que, en los casos más severos, aparecen en todo el cuerpo del paciente y cicatrizan lentamente dando lugar a deformaciones físicas.

La principal vía de obtención muestras humanas es la utilización de remanentes de las muestras que se obtienen con fines diagnósticos. Parte de la muestra de tejido no es necesaria para el correspondiente estudio y para establecer un diagnóstico y por ello, es normalmente destruida.

Usted como paciente, familiar portador o familiar en el que se ha descartado la enfermedad, puede donar el sobrante de la muestra extraída para el diagnóstico, para que, en lugar de ser destruida, pueda ser utilizada en investigación biomédica relacionada con

la Epidermolisis Bullosa, pudiendo quedar parte de dicha muestra incorporada en un Biobanco. La finalidad de la dación es la de realizar estudios para profundizar en el conocimiento de las bases moleculares de la enfermedad así como desarrollar nuevas terapias que mejoren su tratamiento.

Descripción del procedimiento

Los estudios tendrán por objeto hacer un diagnóstico genético de su enfermedad (detectar el gen afectado, responsable de la enfermedad, así como conocer la mutación correspondiente para posteriormente identificarla en sus familiares). Junto a los estudios genéticos, y con objeto de completar el diagnóstico se realizarán estudios dirigidos a conocer la afectación de las células responsables del daño orgánico manifiesto en el paciente. En el mejor de los casos, las muestras extraídas también permitirán desarrollar nuevas terapias, tanto farmacológicas, celulares como genéticas, que permitan mejorar los tratamientos actualmente disponibles para pacientes con Epidermolisis Bullosa.

El diagnóstico se basa sistemáticamente en llevar a cabo en primer lugar un mapeo antigénico que nos permita identificar cual de las proteínas implicadas en la unión dermo-epidérmica esta afectada, es decir, cual es el gen candidato a ser secuenciado. El análisis de las mutaciones será realizado por la Unidad de Medicina Regenerativa, U714 del CIBERER, cuyo investigador principal es la Dra. Marcela Del Rio Nechaevsky. Al final del estudio, de ser este concluyente, se facilitará un informe de investigación que deberá ser interpretado por un profesional en el servicio de genética que le corresponda.

Su participación en estos estudios es voluntaria y consistirá en:

- A) Una consulta para recoger su historia clínica que incluirá la toma de fotografías de sus lesiones cutáneas, antecedentes personales y familiares para elaborar su árbol genealógico.
- A) Extracción de una biopsia de dos zonas distintas de piel de 4-6mm de diámetro del paciente que será realizada por su cirujano/dermatólogo con anestesia local, en el mismo acto quirúrgico
- B) Extracción de una muestra de 10 ml de sangre del paciente, padres y hermanos mediante la punción en una vena periférica. En el caso del paciente se obtendrán 10 ml adicionales de sangre.

MUESTRAS BIOLÓGICAS

a) Una biopsia de piel se conservará congelada y se utilizará para realizar el mapeo antigénico mediante el que se identificará el gen candidato a ser causante de su enfermedad.

b) Una segunda biopsia de piel se utilizará para cultivar queratinocitos y fibroblastos del paciente a partir de los que, en caso de ser necesario, se extraerá RNA y proteína, para estudiar la consecuencia de la mutación a nivel celular y completar así el diagnóstico.

c) A partir de la muestra de sangre periférica se extraerá ADN. Una pequeña parte del ADN se utilizará para identificar la mutación en el gen candidato, tal y como Vd. o su médico ha solicitado como parte de su estudio diagnóstico. Otra parte del ADN se utilizará para realizar un estudio de histocompatibilidad (HLA) en el Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid (Dr. José L. Vicario).

d) Si Vd. lo autoriza, la parte sobrante de dichas muestras (células y ADN) serán utilizadas para investigaciones únicamente relacionadas con la Epidermolisis Bullosa. Las células se incorporarán a un Biobanco que se encuentra alojado en el Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias, cuyo responsable es el Dr. Alvaro Meana, miembro también del CIBERER (U714). Para la inclusión de las células en el banco del CCST y de acuerdo al RD 1301/2006, se realizarán los análisis pertinentes para descartar la presencia de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), hepatitis B y C, *Treponema pallidum* (VDRL). Una vez finalizada dicha investigación, si aún quedase muestra, esta será destruida o anonimizada. En caso de que la muestra fuera útil para ser utilizada con otros fines será nuevamente contactado para informarle y pedirle un nuevo consentimiento.

CONSECUENCIAS SEGURAS:

Tras la biopsia le quedará una pequeña cicatriz de un máximo de 4-6 mm.

RIESGOS TÍPICOS:

Dolor e inflamación en la zona de la biopsia, que desaparecerá a los pocos días. Ocasionalmente puede infectarse y requerir tratamiento antibiótico.

RIESGOS ASOCIADOS A LA DACIÓN DEL REMANENTE DE MUESTRA

El consentimiento que ahora presta no supone para usted ningún riesgo o molestia adicional ya que únicamente va a autorizar la investigación con muestras sobrantes, que de otra forma se desecharían. Para la obtención de este material, no se llevará a cabo ninguna prueba o intervención distinta de aquella necesaria para realizar el diagnóstico.

Carácter Altruista De La Donación

Tal como recoge la Ley de Investigación Biomédica de 4 de Julio de 2007 (Ley 12/2007), "La dación y la utilización de muestras biológicas humanas será gratuita, cualquiera que sea su origen específico, sin que en ningún caso las compensaciones que se prevén en la ley tengan un carácter lucrativo o comercial. La dación implica, asimismo, la renuncia por parte de los donantes a cualquier derecho de naturaleza económica o de otro tipo sobre los resultados que pudieran derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo con dichas muestras biológicas". Los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pretenden ayudar al avance médico y a mejorar el conocimiento de las causas por las que se produce la enfermedad.

Protección De Datos, Confidencialidad Y Derecho De Acceso

La confidencialidad de los datos personales y genéticos obtenidos estará amparada, respetando en todo momento los principios éticos básicos de la investigación con muestras biológicas, y lo establecido por la legislación aplicable, básicamente en la ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y la Ley 41/2002 reguladora de la Autonomía del Paciente y de los Derechos y Obligaciones en Materia de Información y Documentación Sanitaria y la Ley 14/1986 General de Sanidad.

Teniendo en cuenta que el estudio utiliza muestras de ADN, se respetarán los principios de la Declaración de Helsinki y los contenidos de la Declaración Universal de la UNESCO referentes al genoma humano.

La información clínica y genética recogida tendrá carácter confidencial y se tratará de forma codificada (incluida cualquier publicación realizada a raíz de este estudio).

Únicamente el número de identificación permitirá a los investigadores responsables en cada centro hacer corresponder las muestras biológicas y los datos con las personas participantes.

Consejo Genético

Los resultados del estudio podrían llegar a ser inesperados y conllevar una implicación para sus familiares, por tanto es conveniente que se transmita dicha información. Por ello, se recomienda que el paciente y/o sus familiares reciban consejo genético especializado una vez finalizado el estudio. No obstante, el paciente tiene la facultad de tomar una posición en relación con recibir su comunicación como se especifica en el siguiente punto. En el caso de parejas con riesgo de recurrencia en futuros embarazos, los hallazgos del estudio de investigación podrán ser empleados para estudios prenatales en servicios de genética especializados (como es el caso de la U704 del CIBERER, Fundación Jimenez Diaz, liderado por la Dra. Carmen Ayuso).

Derecho A La Información Y Derecho A No Ser Informado

El paciente índice será informado de los datos genéticos de carácter personal que se obtengan del análisis genético según los términos en que manifestó su voluntad, sin perjuicio del derecho de acceso reconocido en la legislación sobre protección de datos de carácter personal, que podrá suponer la revocación de la previa manifestación de voluntad libre otorgada.

Cuando el paciente haya ejercido el derecho a no ser informado de los resultados de un análisis genético sólo se suministrará la información que sea necesaria para el seguimiento del tratamiento prescrito por el médico y aceptado por el paciente. Cuando esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, se podrá informar a los afectados o a su representante legalmente autorizado. En todo caso, la comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para estas finalidades.

Derecho De Revocación

La dación del sobrante de muestra es voluntaria por lo que, si Vd. da el consentimiento para su uso, en cualquier momento puede revocarlo y dejar de formar parte del estudio. Así pues, su revocación no supondrá ningún cambio en su atención médica ni de sus familiares, ni perjuicio alguno en su diagnóstico/tratamiento y/o seguimiento. En caso de revocación, su muestra dejará de formar parte de la investigación aunque los datos obtenidos hasta ese momento sí formarán parte de la misma, procediendo a la destrucción de la muestra. Para ello ha de contactar con el médico responsable e indicarle cual es su decisión acerca del destino de sus muestras y/o datos personales.

CONSENTIMIENTO INFORMADO:

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina y, de forma especial, en referencia a la investigación sobre la aparición, desarrollo y tratamiento de la **Epidermolisis Bullosa**.

DATOS DEL PACIENTE:	
Nombre y Apellidos:	
Fecha de nacimiento:	
Nombre y Apellidos del representante legal (en caso de menores de edad):	
Relación con el paciente (menores de edad):	
Dirección (incluya código postal):	
e-mail:	teléfono:
	Marcar lo que proceda
He leído la hoja de información que se me ha entregado	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
He recibido la información que me ha sido proporcionada sobre el procedimiento anteriormente indicado y he podido formular las preguntas que he considerado oportunas.	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
He hablado con:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio: 1. cuando quiera 2. sin tener que dar explicaciones 3. sin que repercuta en mis cuidados médicos	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Autorizo la dación del sobrante de las muestras biológicas para fines de investigación biomédica en Epidermolisis Bullosa.	Biopsias cutáneas SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Muestras de sangre SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Autorizo el uso de los datos recogidos en mi historia clínica incluido el material fotográfico para fines de investigación biomédica en Epidermolisis Bullosa .	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Deseo ser informado de los resultados obtenidos del presente estudio	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Firma médico/investigador responsable y sello: Prof. MARCELA DEL RIO NECHAEVSKY Dpto de Bioingeniería. UC3M, CIEMAT-CIBER de Enfermedades Raras Unidad de Medicina Regenerativa-U714	Fecha y Firma del paciente y/o representante legal:

Este documento debe ser remitido a:

Dra. María José Escámez Toledano.

CIEMAT-CIBERER U714. Avda Complutense 22 Edificio 70 P0-14. 28040 Madrid

email: mariajose.escamez@ciemat.es Fax: +34-91 346 64 84 Tlf : +34- 91 346 6251/ 91 4962526

CONSENTIMIENTO INFORMADO:

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina y, de forma especial, en referencia a la investigación sobre la aparición, desarrollo y tratamiento de la **Epidermolisis Bullosa**.

DATOS DEL FAMILIAR:	
Nombre y Apellidos:	
Fecha de nacimiento:	
Nombre y Apellidos del representante legal (en caso de menores de edad):	
Relación con el paciente (menores de edad):	
Dirección (incluya código postal):	
e-mail:	teléfono:
	Marcar lo que proceda
He leído la hoja de información que se me ha entregado	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
He recibido la información que me ha sido proporcionada sobre el procedimiento anteriormente indicado y he podido formular las preguntas que he considerado oportunas.	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
He hablado con:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio: 1. cuando quiera 2. sin tener que dar explicaciones 3. sin que repercuta en mis cuidados médicos	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Autorizo la dación del sobrante de las muestras biológicas para fines de investigación biomédica en Epidermolisis Bullosa.	Biopsias cutáneas SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Muestras de sangre SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Autorizo el uso de los datos recogidos en mi historia clínica incluido el material fotográfico para fines de investigación biomédica en Epidermolisis Bullosa .	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Deseo ser informado de los resultados obtenidos del presente estudio	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Firma médico/investigador responsable y sello: Prof. MARCELA DEL RIO NECHAEVSKY Dpto de Bioingeniería. UC3M, CIEMAT-CIBER de Enfermedades Raras Unidad de Medicina Regenerativa-U714	Fecha y Firma del paciente y/o representante legal:

Este documento debe ser remitido a:

Dra. María José Escámez Toledano.

CIEMAT-CIBERER U714. Avda Complutense 22 Edificio 70 P0-14. 28040 Madrid

email: mariajose.escamez@ciemat.es Fax: +34-91 346 64 84 Tlf : +34- 91 346 6251/ 91 4962526

CONSENTIMIENTO INFORMADO:

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina y, de forma especial, en referencia a la investigación sobre la aparición, desarrollo y tratamiento de la **Epidermolisis Bullosa**.

DATOS DEL FAMILIAR:	
Nombre y Apellidos:	
Fecha de nacimiento:	
Nombre y Apellidos del representante legal (en caso de menores de edad):	
Relación con el paciente (menores de edad):	
Dirección (incluya código postal):	
e-mail:	teléfono:
	Marcar lo que proceda
He leído la hoja de información que se me ha entregado	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
He recibido la información que me ha sido proporcionada sobre el procedimiento anteriormente indicado y he podido formular las preguntas que he considerado oportunas.	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
He hablado con:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio: 1. cuando quiera 2. sin tener que dar explicaciones 3. sin que repercuta en mis cuidados médicos	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Autorizo la dación del sobrante de las muestras biológicas para fines de investigación biomédica en Epidermolisis Bullosa.	Biopsias cutáneas SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Muestras de sangre SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Autorizo el uso de los datos recogidos en mi historia clínica incluido el material fotográfico para fines de investigación biomédica en Epidermolisis Bullosa .	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Deseo ser informado de los resultados obtenidos del presente estudio	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Firma médico/investigador responsable y sello: Prof. MARCELA DEL RIO NECHAEVSKY Dpto de Bioingeniería. UC3M, CIEMAT-CIBER de Enfermedades Raras Unidad de Medicina Regenerativa-U714	Fecha y Firma del paciente y/o representante legal:

Este documento debe ser remitido a:

Dra. María José Escámez Toledano.

CIEMAT-CIBERER U714. Avda Complutense 22 Edificio 70 P0-14. 28040 Madrid

email: mariajose.escamez@ciemat.es Fax: +34-91 346 64 84 Tlf : +34- 91 346 6251/ 91 4962526

CONSENTIMIENTO INFORMADO:

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina y, de forma especial, en referencia a la investigación sobre la aparición, desarrollo y tratamiento de la **Epidermolisis Bullosa**.

DATOS DEL FAMILIAR:	
Nombre y Apellidos:	
Fecha de nacimiento:	
Nombre y Apellidos del representante legal (en caso de menores de edad):	
Relación con el paciente (menores de edad):	
Dirección (incluya código postal):	
e-mail:	teléfono:
	<i>Marcar lo que proceda</i>
He leído la hoja de información que se me ha entregado	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
He recibido la información que me ha sido proporcionada sobre el procedimiento anteriormente indicado y he podido formular las preguntas que he considerado oportunas.	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
He hablado con:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio: 1. cuando quiera 2. sin tener que dar explicaciones 3. sin que repercuta en mis cuidados médicos	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Autorizo la dación del sobrante de las muestras biológicas para fines de investigación biomédica en Epidermolisis Bullosa.	Biopsias cutáneas SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Muestras de sangre SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Autorizo el uso de los datos recogidos en mi historia clínica incluido el material fotográfico para fines de investigación biomédica en Epidermolisis Bullosa .	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Deseo ser informado de los resultados obtenidos del presente estudio	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Firma médico/investigador responsable y sello: Prof. MARCELA DEL RIO NECHAEVSKY Dpto de Bioingeniería. UC3M, CIEMAT-CIBER de Enfermedades Raras Unidad de Medicina Regenerativa-U714	Fecha y Firma del paciente y/o representante legal:

Este documento debe ser remitido a:

Dra. María José Escámez Toledano.

CIEMAT-CIBERER U714. Avda Complutense 22 Edificio 70 P0-14. 28040 Madrid

email: mariajose.escamez@ciemat.es. Fax: +34-91 346 64 84 Tlf : +34- 91 346 6251/ 91 4962526

CONSENTIMIENTO INFORMADO:

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina y, de forma especial, en referencia a la investigación sobre la aparición, desarrollo y tratamiento de la **Epidermolisis Bullosa**.

DATOS DEL FAMILIAR:	
Nombre y Apellidos:	
Fecha de nacimiento:	
Nombre y Apellidos del representante legal (en caso de menores de edad):	
Relación con el paciente (menores de edad):	
Dirección (incluya código postal):	
e-mail:	teléfono:
	<i>Marcar lo que proceda</i>
He leído la hoja de información que se me ha entregado	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
He recibido la información que me ha sido proporcionada sobre el procedimiento anteriormente indicado y he podido formular las preguntas que he considerado oportunas.	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
He hablado con:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio: 1. cuando quiera 2. sin tener que dar explicaciones 3. sin que repercuta en mis cuidados médicos	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Autorizo la dación del sobrante de las muestras biológicas para fines de investigación biomédica en Epidermolisis Bullosa.	Biopsias cutáneas SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Muestras de sangre SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Autorizo el uso de los datos recogidos en mi historia clínica incluido el material fotográfico para fines de investigación biomédica en Epidermolisis Bullosa .	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Deseo ser informado de los resultados obtenidos del presente estudio	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Firma médico/investigador responsable y sello: Prof. MARCELA DEL RIO NECHAEVSKY Dpto de Bioingeniería. UC3M, CIEMAT-CIBER de Enfermedades Raras Unidad de Medicina Regenerativa-U714	Fecha y Firma del paciente y/o representante legal:

Este documento debe ser remitido a:

Dra. María José Escámez Toledano.

CIEMAT-CIBERER U714. Avda Complutense 22 Edificio 70 P0-14. 28040 Madrid

email: mariajose.escamez@ciemat.es Fax: +34-91 346 64 84 Tlf : +34- 91 346 6251/ 91 4962526

CONSENTIMIENTO INFORMADO:

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina y, de forma especial, en referencia a la investigación sobre la aparición, desarrollo y tratamiento de la **Epidermolisis Bullosa**.

DATOS DEL FAMILIAR:	
Nombre y Apellidos:	
Fecha de nacimiento:	
Nombre y Apellidos del representante legal (en caso de menores de edad):	
Relación con el paciente (menores de edad):	
Dirección (incluya código postal):	
e-mail:	teléfono:
	<i>Marcar lo que proceda</i>
He leído la hoja de información que se me ha entregado	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
He recibido la información que me ha sido proporcionada sobre el procedimiento anteriormente indicado y he podido formular las preguntas que he considerado oportunas.	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
He hablado con:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio: 1. cuando quiera 2. sin tener que dar explicaciones 3. sin que repercuta en mis cuidados médicos	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Autorizo la dación del sobrante de las muestras biológicas para fines de investigación biomédica en Epidermolisis Bullosa.	Biopsias cutáneas SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Muestras de sangre SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Autorizo el uso de los datos recogidos en mi historia clínica incluido el material fotográfico para fines de investigación biomédica en Epidermolisis Bullosa .	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Deseo ser informado de los resultados obtenidos del presente estudio	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Firma médico/investigador responsable y sello: Prof. MARCELA DEL RIO NECHAEVSKY Dpto de Bioingeniería. UC3M CIEMAT-CIBER de Enfermedades Raras Unidad de Medicina Regenerativa-U714	Fecha y Firma del paciente y/o representante legal:

Este documento debe ser remitido a:

Dra. María José Escámez Toledano.
 CIEMAT-UC3M- CIBERER U714

Avda Complutense 22 Edificio 70 P0-14. 28040 Madrid

email: mariajose.escamez@ciemat.es Fax: +34-91 346 64 84 Tlf : +34- 91 346 6251/ 91 4962526

ANEXO II:

- **Ficha clínica.**

Name, First name: Nombre y apellidos	Ethnic Raza	Consanguinity Consanguinidad	Other affected mb Otros mb afectad.	Familiar geographic origin Origen geográfico de la familia (Pueblo-Provincia)	Other familial diseases Otras enfermedades fam.
Date of birth F nacimiento				Patient: Father: Mother: Grand Parents. Mother: Father:	

		Neonatal	1m< 6m	6m< 1y	1y< 6y	6y<12y	12y<16y	>16y
SKIN PIEL	BLISTERS AMPOLLAS Area (%) Spontaneous Espontáneas Haemorrhagic Hemorrágicas Herpetiform Herpetiformes							
	SCARS % CICATRICES							
	GRANULATION GRANULACION (area)							
	FUSION (How many) FUSION (cuantas)							
	CONTRACTURE CONTRACTURA							
	PP KERATODERMA QUERATODERMA PP							
	PIGMENTED LESIONS LESIONES PIGMENTADA							
	BART SYNDROME SINDROME DE BART							
	ALOPECIA/SCARS ON SCALP ALOPECIA/CICATR. CUERO CABELLUDO							
	MILIA MILIA							
NAILS UÑAS	ABNORMAL (WHICH ONE ...) ANORMALES (CUALES)							
	LOSS (HOW MANY) PERDIDA (CUANTAS)							
	LOSS AND GRANULATION: PERDIDA Y GRANULACION							

			1m< 6m	6m< 1y	1y< 6y	6y<12y	12y<16y	>16y
Heart Corazón	CARDIOMYOPATHY CARDIOMIOPATIA							
genitourinary tract Tracto genitourinario	PHIMOSIS FIMOSIS							
	URINARY RETENTION RETENCION URINARIA							
	HEMATURIA HEMATURIA							
OTHER OTROS								
General conditions Estado general	ASTHENIA ASTENIA							
	PAIN DOLOR							
	PRURITUS PRURITO							
	DEPRESSION DEPRESION							
	FAILURE TO THRIVE RETRASO EN EL CRECIMIENTO							
	RECURRENT INFECTIONS INFECCIONES RECURRENTES							
	ANAEMIA ANEMIA							
	CARCINOME SPINOCELLULAIRE CARCINOMA ESPINOCELULAR							
	AREA AREA/ EVOLUTION EVOLUCION							
Tt Tto	TRANSFUSIONS TRANSFUSIONES							
	IV IRON TREATMENT HIERRO I.V.							
	SURGERY CIRUGIA							
	GASTROSTOMY GASTROSTOMIA							
	BIOPSY DATE AND PLACE FECHA BIOPSIA Y LUGAR BIOPSY LOCATION ZONA BIOPSIADA							

ANEXO III:

- **Publicaciones**

- **Novel human pathological mutations.**

Human Genet (2010) 127: 109-124.

(Gene symbol *COL7A1*: 116, 117, 120, 121)

Novel human pathological mutations

Published online: 7 November 2009
© Springer-Verlag 2009

Gene symbol: DMD

Disease: Muscular Dystrophy, Duchenne

Majed Dasouki, Richard Barohn, Hui Zhu

Department of Pediatrics, University of Kansas Medical Center, 3901 Rainbow Blvd., MS4004, 66160, Kansas City, USA,
Tel.: +19135886326, Fax: +19135886288, E-mail: mdasouki@kumc.edu

Input for small deletions (<21 bp)

Accession	Codon number/location	Deletion
HD090001	55	CTCCTC^GAAGgCCTGACAGGG

Comments: The muscle biopsy in this 10 year old caucasian boy was consistent with DMD. Western blot analysis using antibodies against the carboxy terminus and mid-rod domain showed both normal as well as multiple bands of decreased sizes. DMD gene Deletion/duplication analysis was normal while DNA sequencing revealed this novel frame shift mutation (167delG).

Gene symbol: DMD

Disease: Muscular Dystrophy, Duchenne

Majed Dasouki, Richard Barohn, Madhuri Hegde

Department of Pediatrics, University of Kansas Medical Center, 3901 Rainbow Blvd, MS4004, 66160, Kansas City, USA,
Tel.: +19135886326, Fax: +19135886288, E-mail: mdasouki@kumc.edu

Input for splicing mutations (single base-pair substitution)

Accession	Intron designation, number or letter	Donor/Acceptor	Relative location	Nucleotide substitution
HS090001	17	Donor	+1	G-C

Comments: Dystrophin immunostaining of the muscle biopsy in this 10 year old caucasian boy was absent.

Gene symbol: CYP19A1**Disease: Aromatase deficiency****Ou Wang, Min Nie, Xiaoping Xing, Zhike Chen, Shuwen Qin, Xunwu Meng**Department of Endocrinology, Peking Union Medical College Hospital, Shuai Fuyuan, 1, 100730, Beijing, China (P.R.),
Tel.: +(1086)65295074, E-mail: wang_ou2006@yahoo.com.cn*Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)*

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090001	81	TAT-TGT	Tyr-Cys

Gene symbol: CYP19A1**Disease: Aromatase Deficiency****Ou Wang, Min Nie, Xiaoping Xing, Zhike Chen, Shuwen Qin, Xunwu Meng**Department of Endocrinology, Peking Union Medical College Hospital, Shuai Fuyuan, 1, 100730, Beijing, China (P.R.),
Tel.: +(8610)65295074, E-mail: wang_ou2006@yahoo.com.cn*Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)*

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090002	451	CTC-CCC	Leu-Pro

Gene symbol: SLC4A11**Disease: Corneal endothelial dystrophy 2****Shu Ming Chai, Eranga N. Vithana, Divya Venkataraman, Huda Saleh, Najeeb P. P. Chekkalichintavida, Fathi al-Sayyed, Tin Aung**

Third Hospital Avenue, 11, 168751, Singapore, Singapore, E-mail: chai.shu.ming@singhealth.com.sg

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090003	394	cGGG-CGG	Gly-Arg

Comments: The novel missense mutation G394R was identified in a consanguineous Arab family from Qatar with recessive congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED2). The mutation segregated in all affected members of this family.

Gene symbol: SPRED1**Disease: Legius syndrome****Hoi Ping Jim, Meena Upadhyaya**

NF1 lab, Institute of Medical Genetics, University of Wales College of Medicine, CF14 4XN, Cardiff, United Kingdom, Tel.: +02920 744084, E-mail: jimh@cardiff.ac.uk

Input for small deletions (<21 bp)

Accession	Codon number/location	Deletion
HD090002	349	AAATGTC^AGGggAAAATGTCAG

Gene symbol: SPRED1**Disease: Legius syndrome****Hoi Ping Jim, Meena Upadhyaya**

NF1 lab, Institute of Medical Genetics, University of Wales College of Medicine, CF14 4XN, Cardiff, United Kingdom, Tel.: +02920 744084, E-mail: jimh@cardiff.ac.uk

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090004	262	cAGA-TGA	Arg-Term

Gene symbol: SPRED1**Disease: Legius syndrome****Hoi Ping Jim, Meena Upadhyaya**

NF1 lab, Institute of Medical Genetics, University of Medical Genetics, CF14 4XN, Cardiff, United Kingdom, Tel.: +02920 744084, E-mail: jimh@cardiff.ac.uk

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090005	73	gGAA-TAA	Glu-Term

Gene symbol: SPRED1**Disease: Legius syndrome****Hoi Ping Jim, Meena Upadhyaya**

NF1 lab, Institute of Medical Genetics, University of Wales College of Medicine, CF14 4XN, Cardiff, United Kingdom, Tel.: +02920 744084, E-mail: jimh@cardiff.ac.uk

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090006	16	aCGA-TGA	Arg-Term

Gene symbol: SPRED1**Disease: Legius syndrome****Hoi Ping Jim, Meena Upadhyaya**

NF1 lab, Institute of Medical Genetics, University of Wales College of Medicine, CF14 4XN, Cardiff, United Kingdom, Tel.: +02920 744084, E-mail: jimh@cardiff.ac.uk

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090007	44	GTC-GAC	Val-Asp

Gene symbol: SPAST**Disease: Hereditary spastic paraplegia****Riin Tamm**

IMCB, Riia street, 23, 51010, Tartu, Estonia, E-mail: riinusch@ut.ee

Input for splicing mutations (single base-pair substitution)

Accession	Intron designation, number or letter	Donor/Acceptor	Relative location	Nucleotide substitution
HS090002	8	Acceptor	-1	G-C

Gene symbol: MC2R**Disease: Glucocorticoid deficiency****O. Thomas Mueller, Adam Coovadia**

Pathology, All Childrens Hospital, 6th Street South, 801, 33701, Saint Petersburg, USA, Tel.: +011-1-727-767-8611, E-mail: muellert@allkids.org

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090008	137	CGG-CCG	Arg-Pro

Comments: p.Arg137Pro was found in heterozygous form. Protein prediction programs (SIFT and Polyphen) both predict the mutation to be pathogenic. Affected patient also carried (in heterozygous form) a known mutation (p.Ser74Ile).

Gene symbol: NCF2**Disease: Chronic granulomatous disease****M. Yavuz Köker**

Immunology, Irfan bastug cad, kurtdereli, 2, 06110, Ankara, Turkey, E-mail: kokyavuz@hotmail.com

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090009	93	GACc-GAG	Asp-Glu

Comments: c.279C>G / p.Asp93Glu

Gene symbol: SCN4A**Disease: Periodic paralysis****Daojun Hong, Xinghua Luan, Bin Chen, Riliang Zheng, Zhaoxia Wang, Yun Yuan**

Neurology, First Hospital of Peking University, Xishiku Street, 8, 100034, Beijing, China (P.R.), Tel.: +86-1066551122-2588, Fax: +8610-66176450, E-mail: hongdj@mail.bjmu.edu.cn

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090010	1129	CGG-CAG	Arg-Gln

Comments: We identified a novel R1129Q mutation in DIIS4 of SCN4A in a Chinese family. These affected individuals in same family manifested periodic paralysis with hypokalemia or normakalemia during paralytic attack.

Gene symbol: F8**Disease: Haemophilia A****Carmelo Fabiano, Marcello Niceta, Pietro Sammarco**

Laboratory of Medical Genetics, A. O. V. CERVELLO, via Trabucco, 180, 90146, Palermo, Italy, Tel.: +390916802888, Fax: +390916885287, E-mail: marcelloniceta@virgilio.it

Input for splicing mutations (single base-pair substitution)

Accession	Intron designation, number or letter	Donor/Acceptor	Relative location	Nucleotide substitution
HS090003	IVS 16	Acceptor	-2	A-G

Comments: The mutation IVS16 -2 A->G is localized in the intron 16-exon 17 junction (acceptor site of splice). The patient is a woman showing a mild phenotype of haemophilia A.

Gene symbol: HMBS**Disease: Acute intermittent porphyria****Dana Ulbrichova¹, Rivka Mamet², Gabriel Munter³, Pavel Martasek⁴, Nili Schoenfeld²**¹Department of Pediatrics and Center for Applied Genomics, 1st School of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, Ke Karlovu, 2, 12808, Prague 2, Czech Republic, Tel: +420224967758, Fax: +420224967099, E-mail: dana.u@email.cz.²National Laboratory for the Biochemical Diagnoses of Porphyrins, Rabin Medical Center, Beilinson Hospital, Petah-Tikva, Israel.³Department of Internal Medicine A, Shaare Zedek Medical Center, Jerusalem, Israel. ⁴Department of Pediatrics and Center for Applied Genomics, 1st School of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic.*Input for small insertions (<21 bp)*

Accession	Codon number/location	Insertion
HI090001	61	ACAGGG^GACAtAGATTCTTGA

Comments: This mutation of maternal origin in exon 5 of the HMBS gene was identified in one patient, female, with manifests typical for acute intermittent porphyria (AIP). During an acute attack characterized by severe abdominal pain, hyponatremia and behavioral disturbances, the level of porphyrin precursors were highly elevated. Her PBG and ALA levels were 93 and 79 mg/24h, respectively, (normal values: less than 2.5 mg/24h for PBG and less than 7.5 mg/24h for ALA), and a distinct peak in the fluorimetric plasma scan was identified at 404/622 nm. Her PBGD activity measured a month after the acute attack was 71%, (normal: >70%). DNA sequence analyses revealed small insertion 184_185insT within HMBS gene and confirmed the diagnosis of AIP. This mutation (p.Lys62IlefsX3) causes a frameshift and creates a stop codon (+3aa) resulting in truncated protein (64aa).

Gene symbol: NF1**Disease: Neurofibromatosis 1****Ibrahim Alabdulkareem, Mohammed Al Balwi**

Molecular Biology, NGH A, P O Box 22490, (2216), 11426, Riyadh, Saudi Arabia, Tel.: +966-1-2520088/16662, E-mail: abdulkarimi@ngha.med.sa

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090011	1401	TATg-TAG	Tyr-Term

Gene symbol: PYGM**Disease: McArdle disease****Irene Viéitez, Susana Teijeira, Sara Miranda, Beatriz San Millán, Carmen Navarro**

Neuropathology, University Hospital of Vigo, Meixoeiro, s/n, 36215, Vigo, Spain, Tel.: +34 986 811 111, Fax: +34 986 276 416, E-mail: irenevigo@gmail.com

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090012	669	GCG-GTG	Ala-Val

Comments: This missense mutation is located in exon 17, which harbours the highest number of mutations described in PYGM.

Gene symbol: F8

Disease: Haemophilia A

Marcello Niceta, Carmelo Fabiano, Pietro Sammarco

Medical Genetics, A.O.V. Cervello, via Trabucco, 180, 90146, Palermo, Italy, Tel.: +390916802888, Fax: +390916885287, E-mail: marcelloniceta@virgilio.it

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090013	944	tGAT-AAT	Asp-Asn

Comments: This missense mutation has been found in a male patient showing a mild phenotype of Haemophilia A.

Gene symbol: F13A1

Disease: Factor XIII Deficiency

Rashida Anwar, Elizabeth M. A. Valleley, Chi H. Trinh

Leeds Institute of Molecular Medicine, University of Leeds, St James's University Hospital, Beckett Street, LS9 7TF, Leeds, United Kingdom, Tel.: +44 113 206 5645, Fax: +44 113 343 8702, E-mail: r.anwar@leeds.ac.uk

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090014	703	CGG-CAG	Arg-Gln

Comments: In the native protein, residue Arg703 is located at the surface of the barrel 2 domain where it forms a key interaction in the barrel 2/core domain interface. The arginine head-group nitrogen atoms, 703NH1 and 703NH2, salt bridge to the oxygen atoms, 208OD2 and 208OD1, of Asp208 in the core domain. This is likely to contribute to the stability of the packing of the barrel 2 and core domains and therefore to the tertiary structure of the subunit-A of FXIII. The replacement of Arg703 with a glutamine by computer modelling does not give rise to any steric hindrance if the side chain adopts the same conformation as that of Arg703 with χ_1 and χ_2 approximately 60 degrees. However, the side chain of the glutamine is no longer able to make the salt bridge with Asp208 but instead is more likely to make a single hydrogen bond

with the main chain carbonyl oxygen of Pro670 (670O) within the barrel 2 domain. The loss of the Arg703-Asp208 salt bridge in this mutation therefore results in the loss of interactions between barrel 2 and core domains.

Salt bridge atoms and their distances:

NH2 Arg703 to OD1 Asp208 3.1 Å

NH1 Arg703 to OD2 Asp208 3.4 Å

Hydrogen bonding atoms and the hydrogen bond distances:

NE2 Gln703 to O Pro670 2.8 Å

Gene symbol: SLC26A4

Disease: Deafness, non-syndromic, autosomal recessive

Fatemeh Alasti, Nils Peeters, Wim Wuyts, Mohammad Hossein Sanati, Guy Van Camp

The Department of Medical Genetics, The University of Antwerp, Universiteitsplein, 1, 2610, Antwerp, Belgium, Tel.: -(0032)-03820-2725, Fax: -(0032)-03820-2566, E-mail: fatemeh.alasti@ua.ac.be

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090015	558	AATg-AAG	Asn-Lys

Comments: A novel mutation in the SLC26A4 gene in an Iranian family with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. Mutations in SLC26A4 are a frequent cause of autosomal recessive non-syndromic hearing impairment (ARNSHI) as well as Pendred syndrome (HI accompanied with thyroid goiter). Up to now, more than 40 mutations for ARNSHI and more than 60 pathogenic variants for Pendred syndrome have been identified in this gene. Here we report a novel missense mutation in exon 15 which affects a highly conserved amino acid. The mutation was found in all 4 patients of an Iranian consanguineous family from Persian ethnicity suffering from ARNSHI. The mutation was not found in 100 chromosomes of Iranian normal hearing individuals.

Gene symbol: COL7A1

Disease: Epidermolysis bullosa dystrophica

Marta García, MJ Escamez, N Cuadrado-Corrales, C Sánchez-Jimeno, N Illera, MA López-Martínez, MJ Trujillo-Tiebas, C Ayuso, M Del Río

Regenerative Medicine Unit, CIEMAT-CIBERER, Av Complutense, 22, 28040, Madrid, Spain, Tel.: 34-91-346-6484, Fax: 34-91-346-6484, E-mail: marta.garcia@ciemat.es

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090016	2221	GGA-GCA	Gly-Ala

Comments: Mutation identified in a 37 years-old-female patient from Spain, with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. This mutation has been identified in exon 84 of the COL7A1 gene.

Gene symbol: COL7A1

Disease: Epidermolysis Bullosa, Dystrophic

Natividad Cuadrado-Corrales, M García, MJ Escámez, C Sánchez-Jimeno, N Illera, MA López-Martínez, MJ Trujillo-Tiebas, C Ayuso, M Del Río

Regenerative Medicine Unit, CIEMAT-CIBERER, Av. Complutense, 22, 28040, Madrid, Spain, Tel.: 34-91-346-6051, Fax: 34-91-346-6484, E-mail: natividad.cuadrado@ciemat.es

Input for small deletions (<21 bp)

Accession	Codon number/location	Deletion
HD090003	19	AGAGGCG^CCCcagtgcgagcccAGCACAGGGA

Comments: Mutation identified in a 13 year-old-female from Spain, with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. This mutation resulted in a downstream PTC. This mutation has been identified in exon 1 of the COL7A1.

Gene symbol: MECP2

Disease: Rett Syndrome

Rajni Khajuria, Savita Sapra, Manju Ghosh, Neerja Gupta, Sheffali Gulati, Veena Kalra, Madhulika Kabra

Genetics Unit, Department of Pediatrics, All India Institute of Medical Sciences, Old O.T building, 1st Floor, Room no. 110, 110029, New Delhi, India, Tel.: +919999343421, E-mail: rajni.khajuria@gmail.com

Input for small insertions (<21 bp)

Accession	Codon number/location	Insertion
HI090002	17	AAGAC^CAGGAaCCTCCAGGGC

Comments: This c.50_51insA or c.50dupA change was found in a classical Rett syndrome patient of Indian Origin. This insertion of single base pair causes a frame shift in the protein. This Mutant sequence has been submitted to Genbank which is not released yet and the Accession no. of the same is FJ212168. This insertion was found in exon 2 of MECP2 gene. Reference sequence of MECP2 which was used to compare the sequence was NM_004992 (transcript variant 1).

Gene symbol: MECP2

Disease: Rett Syndrome

Rajni Khajuria, Savita Sapra, Manju Ghosh, Neerja Gupta, Sheffali Ghulati, Veena Kalra, Madhulika Kabra

Genetics Unit, Department of Pediatrics, All India Institute of Medical Sciences, Old O.T building, 1st Floor, Room no. 110, 110029, New Delhi, India, Tel.: +919999343421, E-mail: rajni.khajuria@gmail.com

Input for small insertions (<21 bp)

Accession	Codon number/location	Insertion
HI090003	289	CCGTG^AAGGAaGTCTTCTATC

Comments: This novel Change (c.869dupA) is found in an Indian female patient diagnosed with Rett syndrome. This change is predicted to cause frameshift in protein at codon number 290 (p.E290fs). This mutation was found in exon 3 of MECP2 gene and associated with the disease. The Refseq DNA of MECP2 used for comparison is NM_004992 (Transcript variant 1).

Gene symbol: MECP2

Disease: Rett Syndrome

Rajni Khajuria, Savita Sapra, Manju Ghosh, Neerja Gupta, Sheffali Gulati, Veena Kalra, Madhulika Kabra
Genetics Unit, Department of Pediatrics, All India Institute of Medical Sciences, Old O.T building, 1st Floor, Room no. 110, 110029, New Delhi, India, Tel.: +919999343421, E-mail: rajni.khajuria@gmail.com

Input for small insertions (<21 bp)

Accession	Codon number/location	Insertion
HI090004	485	GAGAGA^GTTAaGCTGACTTTA

Comments: This novel change (c.1455_1456dupTA) was found in an Indian Female patient with Rett syndrome. This Change is predicted to cause a frameshift (p.S486fs) and predicted to result in a late truncating protein or longer protein than usual. This mutation was found in the C-terminal region of MECP2 gene. The Refseq DNA used for analysis was NM_004992 (Transcript variant 1).

Gene symbol: LCA5

Disease: Leber Congenital Amaurosis (LCA)

Elena Vallespin, A Avila-Fernandez, B Almoguera, D Cantalapiedra, M Garcia-Hoyos, R Riveiro-Alvarez, J Aguirre-Lamban, A Bustamante-Aragones, MJ Trujillo-Tiebas, C Ayuso
Genetics, Fundación Jimenez Diaz, Avenida Reyes Católicos, 2, 28040, Madrid, Spain, E-mail: evallespin@gmail.com

Input for small deletions (<21 bp)

Accession	Codon number/location	Deletion
HD090004	130	AGCTG^CTAAAaGAAAATAAAT

Comments: c.828delA, p.Lys131fs

Gene symbol: CRB1**Disease: Leber congenital amaurosis**

Elena Vallespin, A Avila-Fernandez, C Velez-Monsalve, B Almoguera, M Martinez-Garcia, B Gomez-Dominguez, C Gonzalez-Roubaud, D Cantalapiedra, MJ Trujillo-Tiebas, C Ayuso

Genetics, Fundacion Jimenez Diaz, Avenida Reyes Católicos, 2, 28040, Madrid, Spain, E-mail: evallepin@gmail.com

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090017	1161	TAT-TGT	Tyr-Cys

Comments: c.3482 A>G, p.Tyr1161Cys

Gene symbol: ABCA4**Disease: Stargardt disease**

Jana Aguirre-Lamban, R Riveiro-Alvarez, D Cantalapiedra, M Garcia-Hoyos, A Avila-Fernandez, C Villaverde-Montero, MJ Trujillo-Tiebas, C Ayuso

Genetics, Fundacion Jimenez Diaz, Avda. Reyes Catolicos, 2, 28040, Madrid, Spain, Tel.: 0034-91-5504872, E-mail: jaguirre@fjd.es

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090018	531	GAA-GGA	Glu-Gly

Gene symbol: ABCA4**Disease: Stargardt disease**

Jana Aguirre-Lamban, R Riveiro-Alvarez, D Cantalapiedra, M Garcia-Hoyos, A Avila-Fernandez, C Villaverde-Montero, MJ Trujillo-Tiebas, C Ayuso

Genetics, Fundacion Jimenez Diaz, Avda. Reyes Catolicos, 2, 28040, Madrid, Spain, Tel.: 0034-91-5504872, E-mail: jaguirre@fjd.es

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090019	1850	CTG-CCG	Leu-Pro

Gene symbol: TPO**Disease: Thyroid peroxidase deficiency****Ozgul Alper, Doga Turkkahraman, İffet Bircan, Guven Luleci**

Department of Medical Biology and Genetics, Akdeniz University Faculty of Medicine, Arapsuyu, 3, 07070, Antalya, Turkey, Tel.: 902422496972, Fax: 902422274484, E-mail: oalper@akdeniz.edu.tr

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090020	315	gCAG-TAG	Gln-Term

Comments: This novel mutation is detected by DHPLC and confirmed with DNA sequencing in Turkish siblings from a nonconsanguineous heterozygous carrier parents. Although both of the sisters carrying the same homozygous mutation, the degree of organification defect is quite different. One had partial IOD, other has total IOD, the difference may be caused by PDT procedures. The elder sister had mental retardation, short stature, and goitrous thyroid gland. Detailed clinical and molecular data will be given in a research article which is in preparation.

Gene symbol: NR0B1**Disease: Adrenal Hypoplasia****O. Thomas Mueller, Adam Coovadia**

Pathology and Laboratory Medicine, All Childrens Hospital, 6th Street South, 801, 33701, Saint Petersburg, USA, Tel.: 011-1-727-767-8985, E-mail: coovadiaa@allkids.org

Input for small deletions (<21 bp)

Accession	Codon number/location	Deletion
HD090005	454	ATCATC^GGCacaGTCAGCATGG

Comments: Adrenal insufficiency and speech delay in a 3 year old boy. A deletion of two bases in the second exon was found which causes frameshift substitutions in codons 455 to 458 and a nonsense change (premature termination) at codon 459. This deletion has not been previously described but is likely to be pathogenic based on several reports of frameshift deletions in this region of NR0B1 that were reported to be pathogenic (HGMD).

Gene symbol: COL7A1**Disease: Epidermolysis bullosa dystrophica****Marta García, MJ Escamez, N Cuadrado-Corrales, N Illera, C Sánchez Jimeno, C Vélez, MJ Trujillo-Tiebas, C Ayuso, M Del Río**

Regenerative Medicine Unit, CIEMAT-CIBERER, Av Complutense, 22, 28040, Madrid, Spain, Tel.: 34-91-346-6265, Fax: 34-91-346-6251, E-mail: marta.garcia@ciemat.es

Input for splicing mutations (single base-pair substitution)

Accession	Intron designation, number or letter	Donor/Acceptor	Relative location	Nucleotide substitution
HS090004	111	Donor	+1	G-A

Comments: Mutation identified in a patient from Spain, with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. This mutation has been identified in intron 111 of the COL7A1 gene.

Gene symbol: COL7A1

Disease: Epidermolysis bullosa dystrophica

María José Escámez, N Cuadrado-Corrales, M García, C Sanchez-Jimeno, N Illera, MA López-Martínez, MJ Trujillo-Tiebas, C Ayuso C, M Del Río

Regenerative Medicine Unit, CIEMAT-CIBERER, Av. Complutense, 22, 28040, Madrid, Spain, Tel.: 34-91-346-6251, Fax: 34-91-346-6484, E-mail: mariajose.escamez@ciemat.es

Input for small deletions (<21 bp)

Accession	Codon number/location	Deletion
HD090006	2906	GCCTGT^CACCcTTTTGTCTAT

Comments: Mutation identified in a 12 year-old-male from Spain, with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. This mutation resulted in a downstream PTC, and was identified in exon 117 of the COL7A1 gene.

Gene symbol: PROS1

Disease: Protein S deficiency

Maria Pintao, A.A. Garcia, D. Borgel, M. Alhenc-Gelas, C.A. Spek, M.C.H. de Visser, S. Gandrille, P.H. Reitsma
Albinusdreef, 2, 2300 RC, Leiden, Netherlands, E-mail: m.c.t.pintao@lumc.nl

Input for gross insertions

Accession	Description
HN090001	Duplication of exons 4-11.

Comments: Exon 3 can not be excluded as it was not possible to evaluate it.

Gene symbol: MAN2B1**Disease: Mannosidosis, alpha****Mohammed Al Balwi¹, Eyaid Waffa², Al-Abdulkareem Ibrahim^{3,4}**^{1,3,4}Section of Molecular Pathology and Genetics, Department of Pathology, King Abdulaziz Medical City, PO. Box 22490, MC1122, 11426, Riyadh, Saudi Arabia, Tel.: +966-506435733, Fax: +966-12520130, E-mail: balwim@ngha.med.sa²Department of Pediatrics, King Abdulaziz Medical City, Riyadh, Saudi Arabia³King Abdullah International Medical Research Center, Riyadh, Saudi Arabia⁴King Saud bin Abdulaziz University for Health sciences, Riyadh, Saudi Arabia*Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)*

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090021	447	GAC-GTC	Asp-Val

Comments: c.1340**Gene symbol: GLA****Disease: Fabry disease****Dau-Ming Niu, Hsiang-Yu Lin, Kah-Wai Chong, Ju-Hui Hsu, Hsiao-Chi Yu, Cheng-Hung Huang**

Department of Pediatrics, Taipei Veterans General Hospital, Sec. 2, Shih-Pai Road, No. 201, 112, Taipei, Taiwan (R.O.C.), Tel.: 886-2-28767181, Fax: 886-2-28767181, E-mail: dmniu@vghtpe.gov.tw

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090022	296	cATG-TTG	Met-Leu

Comments: The patient's plasma alpha-Galactosidase A activity was very low and found this mutation in GLA gene.**Gene symbol: GLA****Disease: Fabry disease****Hsiang-Yu Lin, Dau-Ming Niu, Kah-Wai Chong, Ju-Hui Hsu, Hsiao-Chi Yu, Cheng-Hung Huang**

Department of Pediatrics, Mackay Memorial Hospital and Mackay Medicine, Nursing and Management College, Sec. 2, Chung-Shan North Road, No.92, 10449, Taipei, Taiwan (R.O.C.), Tel.: +886-2-2543-3535 ext. 3090, Fax: +886-2-2543-3642, E-mail: lxc46199@ms37.hinet.net

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090023	391	AAA-ACA	Lys-Thr

Comments: The patient's plasma alpha-Galactosidase A activity was very low and found this mutation in GLA gene.

Gene symbol: HBB

Disease: Thalassaemia beta

Sadhna Arora, Madhulika Kabra

Pediatrics, AIIMS, Ansari Nagar, New Delhi, 110029, New Delhi, India, Tel.: +91-11-26594585, Fax: +91-11-26588411, E-mail: arorasdhna@yahoo.com

Input for small insertions (<21 bp)

Accession	Codon number/location	Insertion
HI090005	51	CCACT [^] CCTGActcctgaTGCTGTTATG

Comments: This insertion was seen in a beta thalassemia carrier.

Gene symbol: EDAR

Disease: Ectodermal dysplasia, hypohidrotic

Mohammed Al Balwi^{1,2,3}, Al Abdulkareem Ibrahim^{2,3}, Al Swaid Abdulrahman^{3,4}

¹Section of Molecular Pathology and Genetics, Department of Pathology, King Abdulaziz Medical City, PO.Box 22490, MC1122, 11426, Riyadh, Saudi Arabia, Tel.: +966-506435733, Fax: +966-12520130, E-mail: balwim@ngha.med.sa

²King Abdullah International Medical Research Center, Riyadh, Saudi Arabia

³King Saud bin Abdulaziz University for Health sciences, Riyadh, Saudi Arabia

⁴Department of Pediatrics, King Abdulaziz Medical City, Riyadh, Saudi Arabia

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090024	31	TGCg-TGA	Cys-Term

Gene symbol: GLA**Disease: Fabry disease****Hsiang-Yu Lin, Kah-Wai Chong, Ju-Hui Hsu, Hsiao-Chi Yu, Cheng-Hung Huang, Dau-Ming Niu**

Pediatrics, Mackay Memorial Hospital and Mackay Medicine, Nursing and Management College, Sec. 2, Chung-Shan North Road, 92, 10449, Taipei, Taiwan (R.O.C.), Tel.: +886-2-2543-3535 ext. 3090, Fax: +886-2-2543-3642, E-mail: lxc46199@ms37.hinet.net

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090025	104	GGC-GTC	Gly-Val

Comments: The patient's plasma alpha-Galactosidase A activity was very low and found this mutation in GLA gene.

Gene symbol: PTEN**Disease: PTEN Hamartoma Tumour Syndrome****Jay Ellison, David Driscoll**

Medical Genetics, Mayo Clinic, 200 First St SW, na, 55905, Rochester, USA, Tel.: 507-284-8208, Fax: 507-284-1067, E-mail: ellison.jay@mayo.edu

Input for Missense/Nonsense Mutations (single base-pair substitutions)

Accession	Codon number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
HM090026	128	aAAG-GAG	Lys-Glu

Comments: Patient has macrocephaly, a few skin tags, probable scalp lipoma, hyperplastic colon polyps, thyroid nodules, a specific learning disability, and a vascular malformation, with associated leg girth discrepancy. There is significant overlap with Cowden, Proteus-like, and Bannayan-Ruvalcaba-Riley syndromes.

- **The first *COL7A1* mutation survey in a large Spanish Dystrophic Epidermolysis Bullosa cohort: c.6527insC disclosed as an unusually recurrent mutation.**

Br J Dermatol (2010) 163: 155-161.

The first *COL7A1* mutation survey in a large Spanish dystrophic epidermolysis bullosa cohort: c.6527insC disclosed as an unusually recurrent mutation

M.J. Escámez,* M. García,* N. Cuadrado-Corrales,* S.G. Llamas,† A. Charlesworth,‡ J. N. De Luca,§ N. Illera,* C. Sánchez-Jimeno,* A. Holguín,* B. Duarte,¶ M.J. Trujillo-Tiebas,** J.L. Vicario,†† J.L. Santiago,‡‡ A. Hernández-Martín,§§ A. Torrelo,§§ D. Castiglia,§ C. Ayuso,** F. Larcher,¶¶ J.L. Jorcano,*¶¶ A. Meana,† G. Meneguzzi,‡ G. Zambruno§ and M. Del Rio*

*Basic Research Department, Epithelial Biomedicine Division, Regenerative Medicine Unit, CIEMAT-CIBERER U714, Av. Complutense 22, 28040 Madrid, Spain

†Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias, Tissue Engineering Laboratory, CIBERER U714, Oviedo, Spain

‡INSERM U634, Nice, France

§Laboratory of Molecular and Cell Biology, Istituto Dermopatico dell'Immacolata, IRCCS, Rome, Italy

¶Basic Research Department, Epithelial Biomedicine Division, Cutaneous Diseases Modeling Unit, CIEMAT, Madrid, Spain

**Department of Genetics, Fundación Jiménez Díaz, CIBERER U704, Madrid, Spain

††Histocompatibilidad, Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid, Madrid, Spain

‡‡Department of Dermatology, Hospital General de Ciudad Real, Ciudad Real, Spain

§§Department of Dermatology, Hospital Niño Jesús, Madrid, Spain

Summary

Correspondence

Marcela Del Rio.

E-mail: marcela.delrio@ciemat.es

Accepted for publication

13 February 2010

Key words

COL7A1, rare skin diseases, recurrent mutations, skin blistering

Conflicts of interest

None declared.

DOI 10.1111/j.1365-2133.2010.09713.x

Background Dystrophic epidermolysis bullosa (DEB) is a genodermatosis caused by mutations in *COL7A1*. The clinical manifestations are highly variable from nail dystrophy to life-threatening blistering, making early molecular diagnosis and prognosis of utmost importance for the affected families. Mutation identification is mandatory for prenatal testing.

Objectives To conduct the first mutational analysis of *COL7A1* in a Spanish cohort, to assess mutation consequences at protein/mRNA level and to establish genotype–phenotype correlations.

Methods Forty-nine Spanish patients with DEB were studied. Antigen mapping was performed on patient skin biopsies. *COL7A1* mutation screening in genomic DNA was performed by polymerase chain reaction (PCR) and direct sequencing. Mutation consequences were determined by reverse transcriptase-PCR.

Results Eight patients belonged to three unrelated families with dominant DEB. Forty-one were affected with recessive DEB (RDEB). Specifically, 27 displayed the severe generalized subtype, eight the other generalized subtype and six a localized phenotype (two pretibial, three acral and one inversa). Thirty-five mutations were identified, 20 of which are novel. The pathogenic mutation c.6527insC accounted for 46.3% of Spanish RDEB alleles. A consistent genotype–phenotype correlation was established.

Conclusions Although the *COL7A1* database indicates that most DEB mutations are family specific, the pathogenic mutation c.6527insC was highly recurrent in our cohort. This level of recurrence for a single genetic defect has never previously been reported for *COL7A1*. Our findings are essential to the clinicians caring for patients with DEB in Spain and in the large population of Spanish descendants in Latin America. They also provide geneticists a molecular clue for a priority mutation screening strategy.

Forms of dystrophic epidermolysis bullosa (DEB) encompass a group of autosomal skin disorders characterized by trauma-induced blistering and scarring.¹ Ultrastructurally, DEB is char-

acterized by abnormalities in the number and morphology of anchoring fibrils,² microstructures composed of type VII collagen and present at the dermal-epidermal junction (DEJ).³ DEB

- **A prevalent mutation with founder effect in Spanish Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa families.**

BMD Med Genet (2010) 11: 139

RESEARCH ARTICLE

Open Access

A prevalent mutation with founder effect in Spanish Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa families

Natividad Cuadrado-Corrales^{1,2}, Carolina Sánchez-Jimeno^{1,2}, Marta García^{1,2}, María-José Escámez^{1,2}, Nuria Illera¹, Ángela Hernández-Martín³, María-José Trujillo-Tiebas^{4,5}, Carmen Ayuso^{4,5}, Marcela Del Rio^{1,2*}

Abstract

Background: Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa (RDEB) is a genodermatosis caused by more than 500 different mutations in the *COL7A1* gene and characterized by blistering of the skin following a minimal friction or mechanical trauma.

The identification of a cluster of RDEB pedigrees carrying the c.6527insC mutation in a specific area raises the question of the origin of this mutation from a common ancestor or as a result of a hotspot mutation. The aim of this study was to investigate the origin of the c.6527insC mutation.

Methods: Haplotypes were constructed by genotyping nine single nucleotides polymorphisms (SNPs) throughout the *COL7A1* gene. Haplotypes were determined in RDEB patients and control samples, both of Spanish origin.

Results: Sixteen different haplotypes were identified in our study. A single haplotype cosegregated with the c.6527insC mutation.

Conclusion: Haplotype analysis showed that all alleles carrying the c.6527insC mutation shared the same haplotype cosegregating with this mutation (**CCGCTCAA_6527insC**), thus suggesting the presence of a common ancestor.

Background

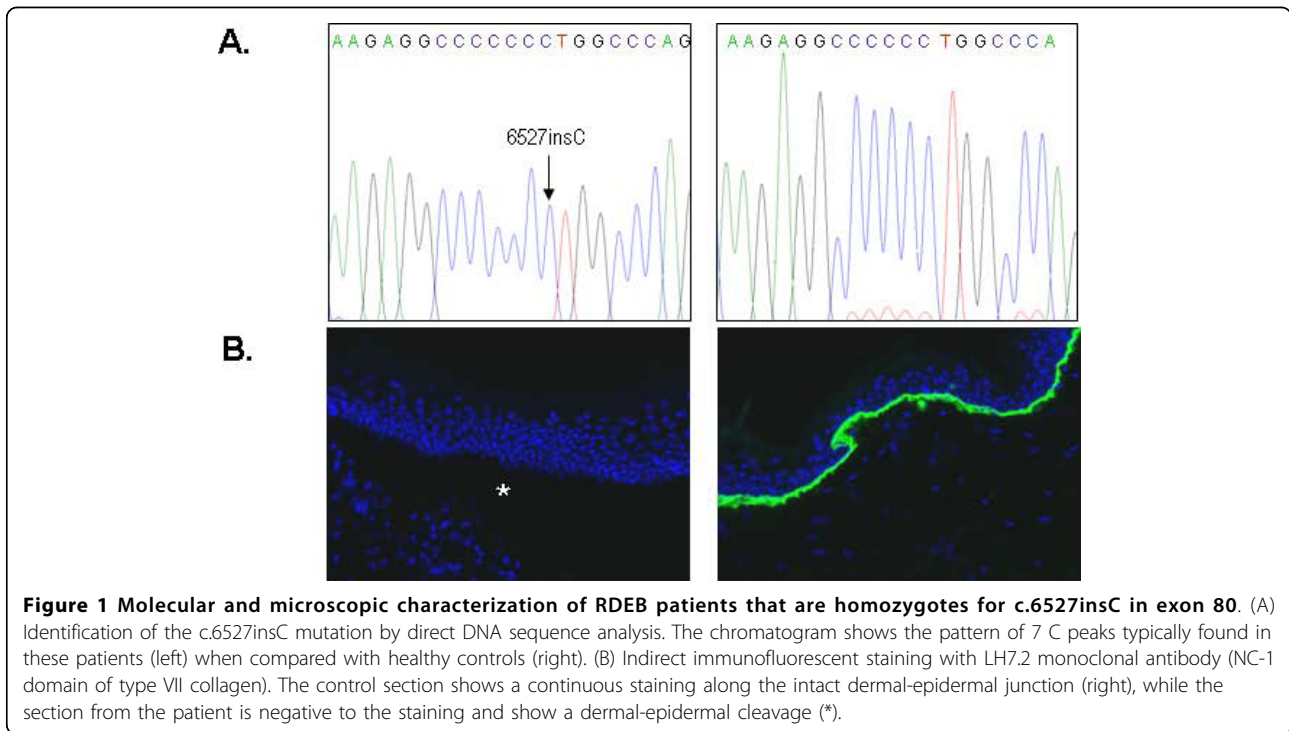
Dystrophic Epidermolysis Bullosa (DEB) is a rare disease, characterized by trauma induced-blistering and scarring [1]. This genodermatosis is a rare autosomal dominant (DDEB [MIM#131750, #131800]) or recessive (RDEB [MIM#226600]) disorder caused by mutations in *COL7A1* gene [MIM*120120], encoding type VII collagen (protein component of anchoring fibrils) [2]. *COL7A1* gene is an unusually complex gene with 118 exons. It has the second largest number of exons of all genes described to date [3]. So far, more than 500 mutations have been described in the *COL7A1* gene <http://www.hgmd.cf.ac.uk> [4]. Although *COL7A1* genetic database indicates that most of the DEB mutations are family specific, with few recurrent mutations, in the Spanish cohort, a high recurrence of the c.6527insC pathogenic mutation has recently been

reported by our group [5]. Accounting for 46.3% of alleles this is a level of recurrence for a single genetic defect hardly ever found for the *COL7A1* gene [5,6]. The c.6527insC mutation creates a premature codon termination (PTC), leading to nonsense mediated decay (NMD) that manifests as a complete absence of collagen protein (Fig. 1). This insertion mutation was detected mainly in families native of the southwest of the Iberian Peninsula (Fig. 2). The overrepresentation of a single mutation and the geographic clustering of the c.6527insC pedigrees indicate at least one founder effect or a mutational hotspot. We investigated the putative founder effect of the c.6527insC mutation through the construction of SNP haplotypes throughout the *COL7A1* gene. A rare single haplotype in the Spanish population was present in all patients and relatives who carried the c.6527insC mutation, supporting the hypothesis that all chromosomes carrying the c.6527insC mutation arise from a single founder effect.

* Correspondence: marcela.delrio@ciemat.es

¹Basic Research Department, Epithelial Biomedicine Division, Regenerative Medicine Unit, CIEMAT, Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



Methods

Subjects

A total of 49 DEB patients were included in this study. Patient written informed consent was obtained in agreement with the collaborative centers where biopsies and

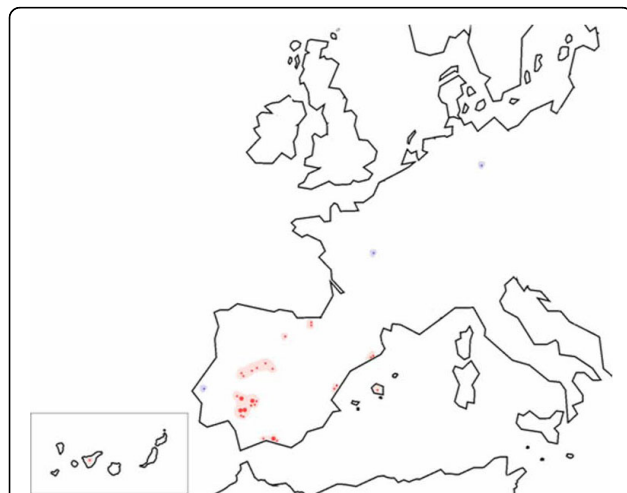


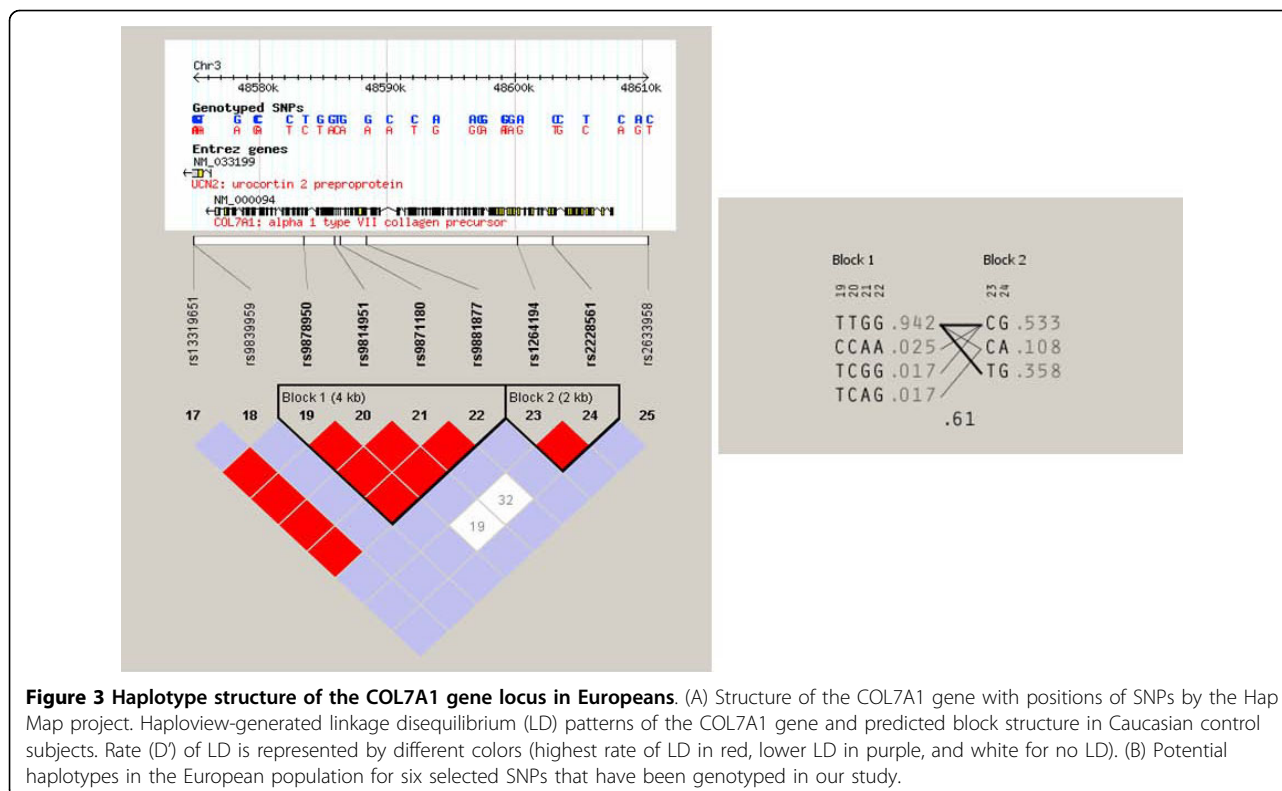
Figure 2 Geographic location of alleles carrying the c.6527insC mutation in RDEB patients (red circles). Circle size is proportional to the number of CCGCTCAA_6527insC alleles. The mutation follows a south-north spatial gradient in the Iberian Peninsula, from Andalusia to Northern Spain. Note that only three alleles that carry the c.6527insC mutation occur in the rest of Europe (blue circles, France, Germany and Portugal).

blood/DNA samples were obtained. The Ethics Committee of Fundación Jimenez Díaz (Madrid, Spain) evaluated and approved this research work, stating that the project adheres to the Helsinki Guidelines and further reviews (Edinburgh, 2000; <http://www.wma.net>).

Eleven RDEB patients carried the c.6527insC mutation in both alleles. Sixteen RDEB patients were heterozygote, exhibited the c.6527insC mutation on one allele and contained different mutations on the other allele. Twenty two DEB patients carried other mutations of the *COL7A1* gene (Additional file 1, Table S1). In addition, 93 non-affected individuals from the general population of Spain were incorporated to this study as a reference group. Informed consent was obtained from all subjects included in the study. Putative geographic origin of pedigrees was empirically established based on proof that individuals carrying this mutation stem from ancestors who have lived in the same geographic area for at least 3 generations.

SNPs selection and haplotyping assay

We used the HapMap data <http://www.hapmap.org> to select informative SNPs from the *COL7A1* gene. Using the Haploview program, two blocks of linkage disequilibrium (LD) are located throughout the *COL7A1* gene (Fig. 3). Two SNPs (rs2228561 and rs1264194) from block 1 and five SNPs (rs9881877, rs9871180, rs9814951, rs9878950 and rs2532848) from block 2 were analyzed to determine common haplotypes according to the



Hap-Map data. We also included in the analysis two novel polymorphisms, NM-000094.3:c.25215C >T (intron 75) and NM-000094.3:c.11639C >T (intron 19) recognized in the Spanish population.

Haplotypes for chromosomes harboring the c.6527insC mutation and other mutations were determined by genotyping SNPs for DEB patients and their parents (Fig. 4).

The genotyping of SNPs was performed with Snapshot assay kits (Applied Biosystems Inc.). Amplicons were purified by Exo-SAP treatment (ExoSAP-IT, USB). Three µl aliquots of the purified amplification products were added to a 5 µl Snapshot Multiplex Ready reaction mixture containing 0.4 pmol of each Snapshot oligonucleotide primers (Additional file 1, Table S2). Primer extension reactions were carried out over 25 cycles of 96°C for 10 sec, 50°C for 5 sec, and 60°C for 30 sec. Reaction products were treated with 1 U of SAP at 37°C for 1 h and 72°C for 15 min to dephosphorylate unincorporated fluorescent ddNTPs. The Snapshot reactions were resolved on an ABI Prism 3730 (Applied Biosystems). Results were analyzed using Peak Scanner™ Software v1.0 (Applied Biosystems).

Statistical analysis

We evaluated the Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) distributions, in a control sample from the general population of Spain, for the SNPs involved in our study.

Results

We identified 5 novel SNPs in the region corresponding to COL7A1 gene, NM-000094.3:c.11639C>T, 24558C>T, 25215C>T, 29056C>T, 31427C>A. The distribution of all SNPs in the control Spanish population did not deviate from HWE (?2-test; p > 0.05) (Additional file 1, Table S3). The NM-000094.3:c.11639C>T and 25215C>T were considered for the construction of haplotypes.

The existence of complete two-generation pedigrees in all our patients allowed the construction of different haplotypes formed by nine SNPs. Considering the two blocks of linkage LD located throughout the COL7A1 gene, we determined twelve haplotypes in DEB patients (from H1 haplotype to H7 haplotype, H9, H12, H14, H15 and H16 haplotypes) and thirteen haplotypes in the Spanish population (from H1 to H13). The overall distribution of the estimated haplotypes was significantly different between healthy controls and patients (see Table 1 and Table 2).

The total number of the alleles (n = 38) that carry the c.6527insC mutation cosegregated exclusively with H5 haplotype (CCGCTCAA), namely all alleles that carry the c.6527insC mutation were CCGCTCAA_6527insC. On the other hand, the frequency of H5 haplotype in the Spanish population was 5.81%. Consequently, the c.6527insC mutation in the Spanish cluster is a result of a single mutational event, and the affected pedigrees must descend from one genetic founder who exhibited the H5

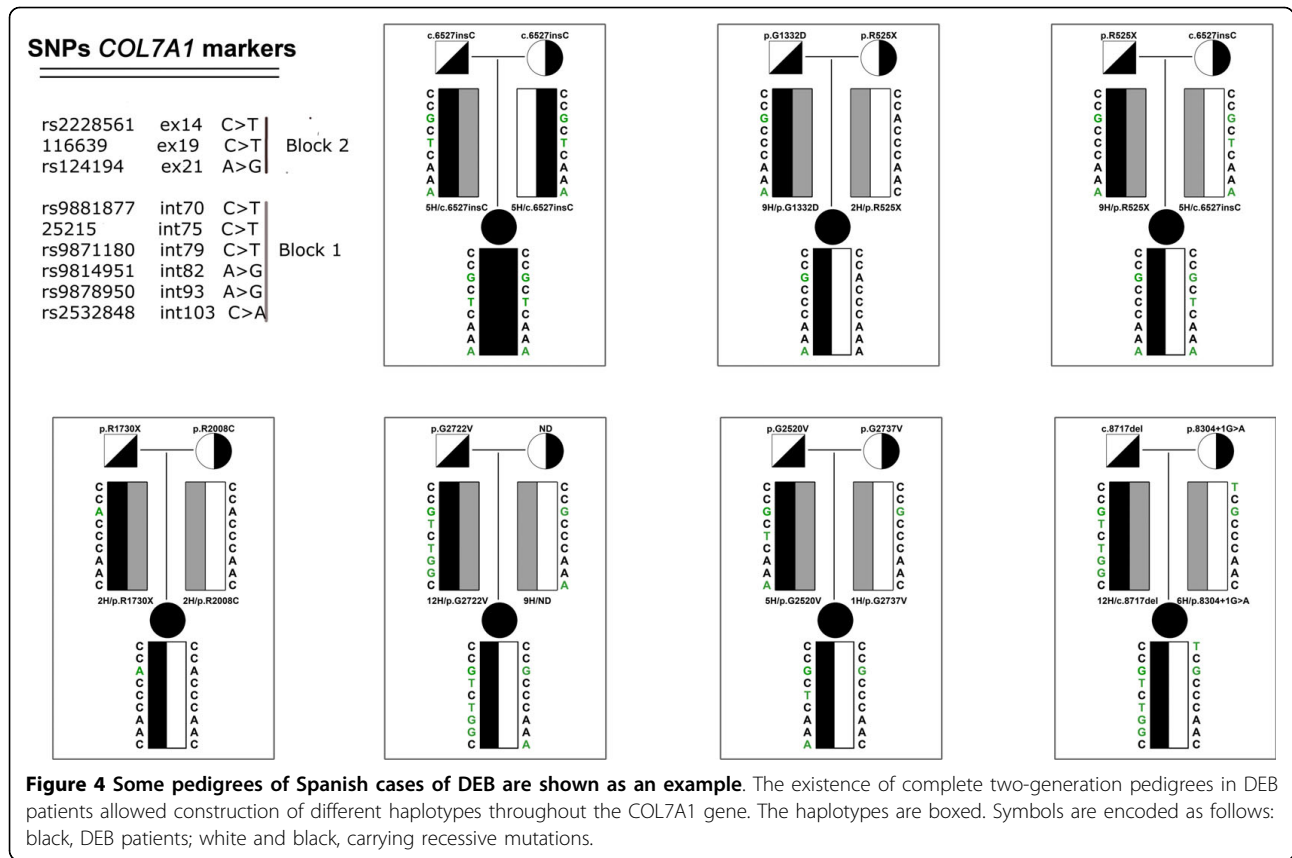


Table 1 The total number of haplotypes described in the Spanish population

Haplotypes	Block 2				Block 1					Haplotype frequency %
	rs2228561	11639 C>T	rs1264194	rs9881877	25215C>T	rs9871180	rs9814951	rs9878950	rs2532848	
H1	C	C	G	C	C	C	A	A	C	33.7
H2	C	C	A	C	C	C	A	A	C	17.44
H3	C	C	A	C	C	C	G	G	C	10.46
H4	C	C	G	C	C	C	A	G	C	5.81
H5	C	C	G	C	T	C	A	A	A	5.81
H6	T	C	G	C	C	C	A	A	C	4.65
H7	C	C	G	T	C	C	A	A	C	4.65
H8	C	C	G	C	C	C	G	G	C	4.65
H9	C	C	G	C	C	C	A	A	A	3.49
H10	C	C	G	C	T	C	A	A	C	3.49
H11	C	-	A	C	C	C	A	G	C	3.49
H12	C	C	G	T	C	T	G	G	C	1.16
H13	C	-	A	C	T	C	A	A	C	1.16
H14	C	T	G	C	T	C	A	A	A	0
H15	C	T	G	C	T	C	A	G	A	0
H16	C	T	G	C	C	C	A	A	C	0

Table 2 The total number of haplotypes described in DEB Spanish patients

Haplotypes	Mutation COL7A1 gene	Block 2				Block 1				
		rs2228561	11639 C>T	rs1264194	rs9881877	25215C>T	rs9871180	rs9814951	rs9878950	rs2532848
H1	p.Y112X (1), p.R185X (2), p.G1318R (1), p.G1791E (1), p.R1814C (1), p.G2061V (1), p.G2061V (1), p.R2424W (1), p.G2587 D (1), p.R2622W(1), p.2737V (1), c.267-3C>G (2), c.4401+1G>A(1), c.7420A>G (1), c.7930-1G>C (3), c.7930+2T>C, c.7756insC.	C	C	G	C	C	C	A	A	C
H2	p.R525X (1), p.R1730X (1), p.R2063W (1), c.7104+5G>A (1), c.5576delAA (1), c.325insGC (2),	C	C	A	C	C	C	A	A	C
H3	p.G2434R (1), p.R2808C (1)	C	C	A	C	C	C	G	G	C
H4	c.58del13 (1)	C	C	G	C	C	C	A	G	C
H5	c.6527insC (38), p.G2520V (1)	C	C	G	C	T	C	A	A	A
H6	p.Y1098X (2), c.2781InsACGAC (1), c.8304+1G>A (1)	T	C	G	C	C	C	A	A	C
H7	p.G2366 D (1), p.G2114 D (1)	C	C	G	T	C	C	A	A	C
H8	-	C	C	G	C	C	C	G	G	C
H9	p.G1332 D (1), c.R525X (1), ND(1)	C	C	G	C	C	C	A	A	A
H10	-	C	C	G	C	T	C	A	A	C
H11	-	C	-	A	C	C	C	A	G	C
H12	p.G2722V, c.8717delC (1), ND (1).	C	C	G	T	C	T	G	G	C
H13	-	C	T	A	C	T	C	A	A	C
H14	c.5131nsCTCAC (2), c.3277-1G>C (1)	C	T	G	C	T	C	A	A	A
H15	ND (2)	C	T	G	C	T	C	A	G	A
H16	c.7929+2T>C (1)	C	T	G	C	C	C	A	A	C

haplotype. Out of 27 pedigrees bearing at least one CCGCTCAA_6527insC allele, 26 stemmed from ancestors who had been living in the southern half of the Iberian Peninsula for at least 3 generations. The other lineage bearing the CCGCTCAA_6527insC allele comes from ancestors who had been living in Northern Spain for over 3 generations. In addition, we analyzed a Portuguese pedigree carrier of the CCGCTCAA_6527insC allele. These results reveal that the c.6527insC mutation is not the result of separate mutations occurring independently in different individuals, but is the result of a one-time mutation occurring in a common ancestor of all the families.

Furthermore, we also found a pedigree where the chromosome carrying the mutation cosegregated with G2520V H5 haplotype. The other forty recessive pathogenic mutations cosegregate with other fifteen different haplotypes (Table 2).

Discussion

High carrier rates are usually attributed to a founder effect in a population and are usually evidenced by conservation of haplotypes with directly associated markers [7]. We constructed fifteen different intragenic haplotypes throughout the COL7A1 gene to explore the origin of the

alleles carrying the c.6527insC mutation and other mutations described in our DEB patients. All alleles carrying the c.6527insC mutation were CCGCTCAA_6527insC, indicating a common origin. This hypothesis is supported by the diversity of haplotypes throughout the *COL7A1* gene. Moreover, H5 haplotype is rare in the control population (5.81%).

The c.6527insC mutation is found at a high prevalence among patients from the southern half of the Iberian Peninsula. This mutation has previously been found in one patient in France [8] and in another in Germany [9]. However, a Spanish predecessor of those patients cannot be excluded, taking into account the large Spanish emigration to France that occurred after the Spanish civil war (1936-1939) and to Germany in the early 1960s due to economic hardship.

The overall distribution of the estimated haplotypes was significantly different between patients and healthy controls. The absence of recurrence in the other mutations did not allow us to distinguish whether a single haplotype is associated with a mutation, or conversely, if one mutation is associated with general haplotypes suggesting multiple origins. The H1 and H2 haplotypes identified as cosegregating with other mutations are common in the background population. This finding is neither surprising nor unexpected. In terms of elementary probability, the probability of occurrence of a pathogenic mutation in a chromosome harboring a relatively common haplotype in the population is obviously high.

We found a single mutation, p.R525X, which cosegregated with two different haplotypes (H2 haplotype and H9 haplotype). Moreover this nonsense mutation has been described previously in other DEB patient cohorts [10]. This could indicate the presence of a mutational hotspot in codon 525 of *COL7A1* gene. Codon 525 contains a CpG dinucleotide, which is the known site of DNA modification by cytosine methylation.

Conclusion

In summary, the conservation of a single haplotype surrounding the c.6527insC mutation suggested that this allele has a single origin. The finding of a founder effect in a highly recurrent mutation in a rare disease characterized by intrafamilial mutations is essential for the implementation of protocols for genetic diagnosis, for genetic counselling of affected pedigrees and is fundamental to search for new therapies.

Additional material

Additional file 1: Supplementary tables. Table S1. Summary of DEB Spanish patients included in this study. Table S2. Primer sequences used for Analysis of SNPs throughout the *COL7A1* gene and primers used for SNaPshot. Table S3. Novel *COL7A1* SNPs recognized in the present study.

Acknowledgements

The authors are indebted to the patients and their families who participated in this study for their constant support and motivation. We also thank all the clinicians and nurses involved. Our special thanks to DEBRA Spain for their continuous help.

This work was supported in part by grants from Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2007-61019 and SAF2010-16976) and INTRA/08/714 from Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Enfermedades Raras (CIBERER).

Author details

¹Basic Research Department, Epithelial Biomedicine Division, Regenerative Medicine Unit, CIEMAT, Madrid, Spain. ²Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Enfermedades Raras (CIBERER- U714), Madrid, Spain. ³Department of Dermatology, Hospital Niño Jesús, Madrid, Spain. ⁴Department of Genetics, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain. ⁵Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Enfermedades Raras (CIBERER- U704), Madrid, Spain.

Authors' contributions

NCC drafted the manuscript and conceived and designed the study concept. MDR coordinated the analysis and interpretation of data and was responsible for final approval of the article. CSJ, MG and NI performed and assembly the molecular data, MJE contributed to the collection and assembly of clinical data and the statistical analysis. AHM performed the dermatological examinations. MJT and CA provided critical revision of the manuscript.

All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 1 June 2010 Accepted: 29 September 2010

Published: 29 September 2010

References

1. Fine JD, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Bruckner-Tuderman L, Heagerty A, Hovnanian A, Jonkman MF, Leigh I, McGrath JA, Mellerio JE, Murrell DF, Uitto J, Vahlquist A, Woodley D, Zamburo G: **The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB.** *J Am Acad Dermatol* 2008, **58**:931-50.
2. Christiano AM, Hoffman GG, Chung-Honet LC, Lee S, Cheng W, Uitto J, Greenspan DS: **Structural organization of the human type VII collagen gene (*COL7A1*) composed of more exons than any previously characterized gene.** *Genomics* 1994, **21**:169-79.
3. Strachan T, Read AP: *Human molecular genetics* Garland Science, New York, 3 2004.
4. Kern JS, Grüninger G, Imsak R, Müller ML, Schumann H, Kiritsi D, Emmert S, Borozdin W, Kohlhaase J, Bruckner-Tuderman L, Has C: **Forty-two novel *COL7A1* mutations and the role of a frequent single nucleotide polymorphism in the *MMP1* promoter in modulation of disease severity in a large European dystrophic Epidermolysis Bullosa cohort.** *Br J Dermatol* 2009, **161**:1089-1097.
5. Escámez MJ, García M, Cuadrado-Corrales N, Llamas SG, Charlesworth A, De Luca N, Illera N, Sánchez-Jimeno C, Holguín A, Duarte B, Trujillo-Tiebas MJ, Santiago JL, Hernández-Martín A, Torrelo A, Castiglia D, Ayuso C, Larcher F, Jorcano JL, Meana A, Meneguzzi G, Zamburo G, Del Rio M: **The first *COL7A1* mutation survey in a large Spanish dystrophic epidermolysis bullosa cohort: c.6527insC disclosed as an unusually recurrent mutation.** *Br J Dermatol* 2010, **163**:155-161.
6. Csikós M, Szocs HI, Lászik A, Mecklenbeck S, Horváth A, Kárpáti S, Bruckner-Tuderman L: **High frequency of the 425A→G splice-site mutation and novel mutations of the *COL7A1* gene in central Europe: significance for future mutation detection strategies in dystrophic epidermolysis bullosa.** *Br J Dermatol* 2005, **152**:879-886.
7. Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, Goforth L, Friderici K, Fisher R, Van Camp G, Berlin CI, Oddoux C, Ostrer H, Keats B, Friedman TB: **Mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness.** *N Engl J Med* 1998, **339**:1500-1505.

8. Hovnanian A, Rochat A, Bodemer C, Petit E, Rivers CA, Prost C, Fraitag S, Christiano AM, Uitto J, Lathrop M, Barrandon Y, de Prost Y: **Characterization of 18 new mutations in COL7A1 in recessive dystrophic Epidermolysis Bullosa provides evidence for distinct molecular mechanisms underlying defective anchoring fibril formation.** *Am J Hum Genet* 1997, **61**:599-610.
9. Kern JS, Kohlhase J, Bruckner-Tuderman L, Has C: **Expanding the COL7A1 mutation database: novel and recurrent mutations and unusual genotype-phenotype constellations in 41 patients with dystrophic epidermolysis bullosa.** *J Invest Dermatol* 2006, **126**:1006-1012.
10. Whittock NV, Ashton GH, Mohammedi R, Mellerio JE, Mathew CG, Abbs SJ, Eady RA, McGrath JA: **Comparative mutation detection screening of the type VII collagen gene (COL7A1) using the protein truncation test, fluorescent chemical cleavage of mismatch, and conformation sensitive gel electrophoresis.** *J Invest Dermatol* 1999, **113**:673-86.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
<http://www.biomedcentral.com/1471-2350/11/139/prepub>

doi:10.1186/1471-2350-11-139

Cite this article as: Cuadrado-Corrales *et al.*: A prevalent mutation with founder effect in Spanish Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa families. *BMC Medical Genetics* 2010 **11**:139.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



- **A recurrent nonsense mutation occurring as a de novo event in a patient with Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa.**

Dermatology (2011) 223: 219-221.

Dermatology 2011;223:219–221

DOI: [10.1159/000330331](https://doi.org/10.1159/000330331)

A Recurrent Nonsense Mutation Occurring as a de novo Event in a Patient with Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa

N. Cuadrado-Corrales^{a,e}, C. Sánchez-Jimeno^{a,e}, M. García^{a,e}, C. Ayuso^{b,e}, R. De Lucas^c, J.L. Vicario^d, C.J. Conti^g, G. Zambruno^h, M.J. Escamez^{a,e,f}, M. Del Rio^{a,e,f}

^aBasic Research Department, Epithelial Biomedicine Division, Regenerative Medicine Unit, ^bDepartment of Genetics, Fundación Jiménez Díaz, ^cDepartment of Dermatology, La Paz University Hospital, ^dHLA Laboratory, Regional Transfusion Center, ^eCentro de Investigaciones Biomédicas en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), U704 and U714, Madrid, and ^fDepartment of Bioengineering, Universidad Carlos III (UC3M), Leganés, Spain; ^gThe University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Science Park Research Division, Smithville, Tex., USA; ^hLaboratory of Molecular and Cell Biology, Istituto Dermopatico dell'Immacolata, IDI-IRCCS, Rome, Italy

Key Words

De novo mutation • Dystrophic epidermolysis bullosa • Genetic counseling • Skin disease

Dystrophic epidermolysis bullosa (DEB) is a rare genodermatosis characterized by persistent blister development on the skin and mucous membranes in response to minor trauma. Both autosomal-dominant (MIM 131750, 131800) and autosomal-recessive (RDEB; MIM 226600) forms of DEB are caused by mutations in the *COL7A1* gene (MIM 120120), encoding type VII collagen, a protein that assembles into anchoring fibrils [1]. To date, more than 550 mutations, most of which are family-specific, have been described in the *COL7A1* gene (Human Gene Mutation Database; www.hgmd.cf.ac.uk). Herein, we report a *COL7A1* deletion mutation in compound heterozygosity with the recurrent nonsense p.R1763X mutation [2] in a Spanish patient affected with severe generalized RDEB. Of note, mutation R1763X occurred as a de novo event in our proband.

The patient is a 38-year-old woman born to non-consanguineous parents and with no family history of skin diseases. The generalized cutaneous blistering with scarring from birth and the presence of pseudosyndactyly on the hands and feet since early infancy supported a clinical diagnosis of severe generalized RDEB (fig. 1a–d). Oral screening revealed ulcerations, ankylo-

glossia, excessive caries, premature loss of teeth and microstomia (fig. 1e). The patient also complained of ocular pain, which was in agreement with the findings of blisters, erosions and scarring of the cornea on ophthalmic examination (fig. 1f). She presented other physical deformities, such as joint contractures, and exhibited esophageal strictures, chronic anemia and growth retardation.

Since the age of 33 years, she had undergone repeated surgical interventions for the excision of primary and recurrent squamous cell carcinomas (SCC) of both hands/arms (fig. 1g) and of the left foot and leg. In all cases, histopathological examination showed well to moderately differentiated SCC (fig. 1h, i), as usually described in RDEB patients. At the time of the last surgery, complete staging investigations – including ultrasound, CT and PET scans – were negative. Following written informed consent, skin and blood samples were obtained from the patient. Routine histological examination of a skin biopsy showed subepidermal blisters and indirect immunofluorescence, using the monoclonal antibody LH7.2, complete absence of VII collagen protein (fig. 1j, k) in accordance with the clinical presentation. Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes of the patient and her parents by standard methods, and mutations were identified and characterized by PCR amplification and direct sequencing as described previously [3]. The patient was a heterozygous carrier for the R1763X mutation located in exon 60 and the c.6266delCCCC mutation (also designated as c.6266_6269del) located in exon 75 (fig. 2a) and predicted to result in a frameshift and a stop codon in exon 82. Thus, the patient bore two premature-termination-codon-causing mutations in her *COL7A1*. Further mutation analysis in the patient's parents revealed that the mother was a carrier of the c.6266delCCCC mutation, this deletion has already been reported by our group in this patient [patient No. 25 in reference 3]; however, the second disease-causing mutation (the de novo mutation) had not been disclosed at that time. In contrast, the father did not carry either mutation, suggesting that the p.R1763X mutation occurred de novo on the paternal allele. Paternity was therefore confirmed by human leukocyte antigen (HLA) haplotype analysis (fig. 2b) and intragenic SNP genotyping (fig. 2c) [4]. The nonsense mutation p.R1763X, previously identified in a DEB patient from Central Europe [2] is due to a C→T transition that affects a CpG dinucleotide. CpG dinucleotides are frequent sites of mutations due to hypermutability of 5-methyl-cytosine to thymine [5]. The occurrence of the same mutation in DEB patients of a different geographical origin suggests that the residue 1763 of the *COL7A1* represents a mutation 'hotspot', probably due to the vulnerability of the nucleotide sequence.

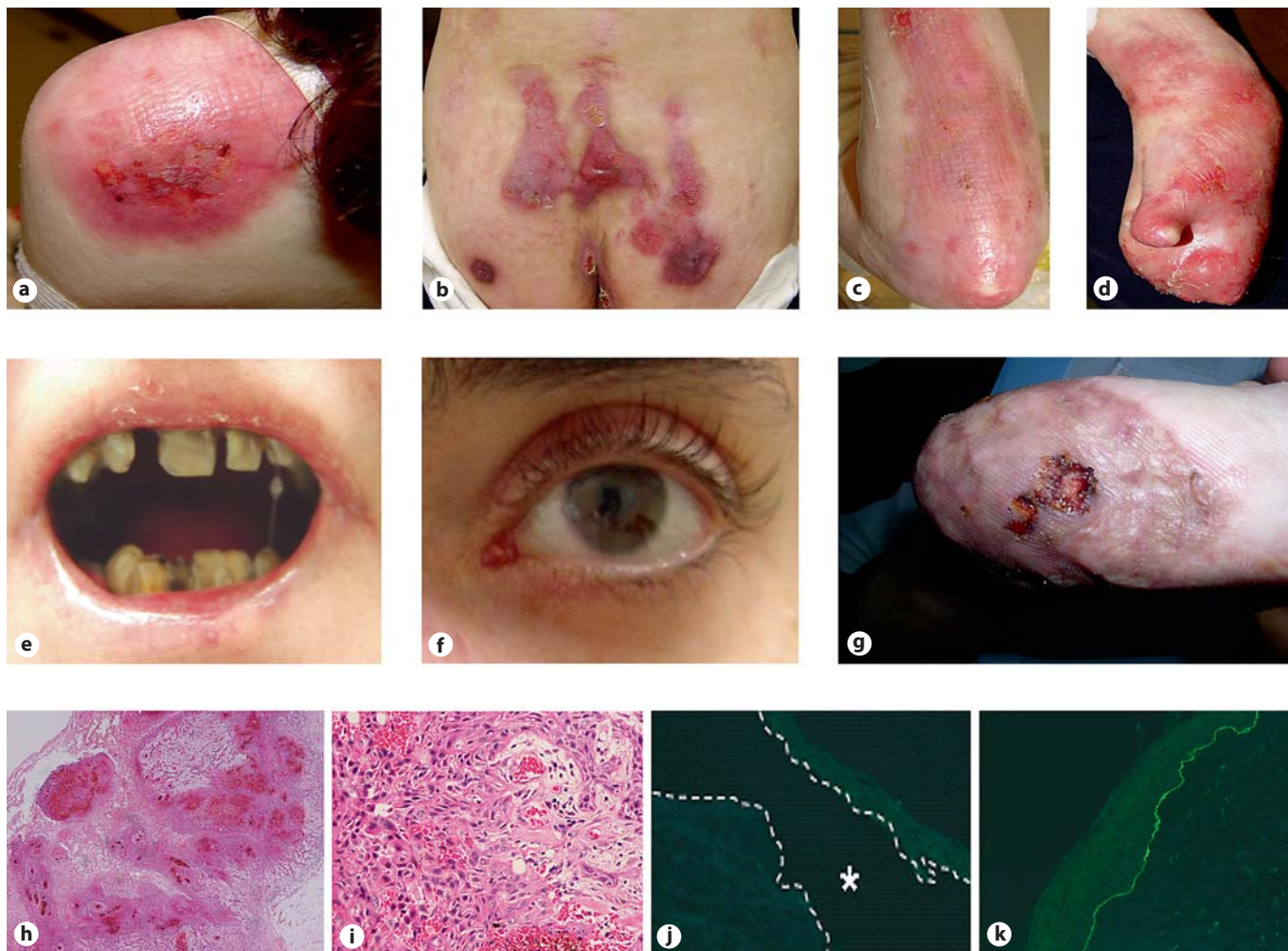


Fig. 1. Clinical and histopathological features. **a–c** Characteristic cutaneous blistering with scarring of left shoulder (**a**), sacral area (**b**) and forearm (**c**). **d** Pseudosyndactyly and mitten deformity of the left hand. **e** Severe microstomia with tooth deformities and caries. **f** Ocular findings: corneal scarring and blistering of the lower lid. **g** SCC on the right hand stump. **h** Panoramic view of a section from the tumor shown in **g**. Several tumoral masses with an aggressive pattern of infiltration into the adipose tissue are

depicted. The masses have minimal cornification, but present extensive hemorrhagic foci. HE. **i** Higher magnification of the same tumor showing atypical keratinocytes with marked nuclear polymorphism, cellular dyskeratosis and minimal areas of keratinization. Dilated blood vessels and hemorrhage are seen throughout the tumor. Small foci of clear cells can also be observed. **j, k** Indirect immunofluorescence shows the absence of collagen VII in the blister patient's biopsy (**j**) versus the normal control's biopsy (**k**).

Finally, the presence of p.R1763X mutation in the patient's lymphocyte DNA, together with the generalized clinical presentation, argues against somatic mosaicism and in favour of a de novo mutation event in a single gamete or a germline mosaicism of the father. De novo mutations are infrequent in RDEB and, to our knowledge, only two have been reported to date [6, 7]. This case emphasizes the importance of mutation verification in the family as a part of the molecular diagnostic procedure so that de novo mutations can be identified and accurate genetic counseling provided to couples at risk of recurrence. The risk of de novo mutations in DEB, although small, should be considered when planning prenatal diagnosis.

Disclosure Statement

The authors declare no conflict of interest.

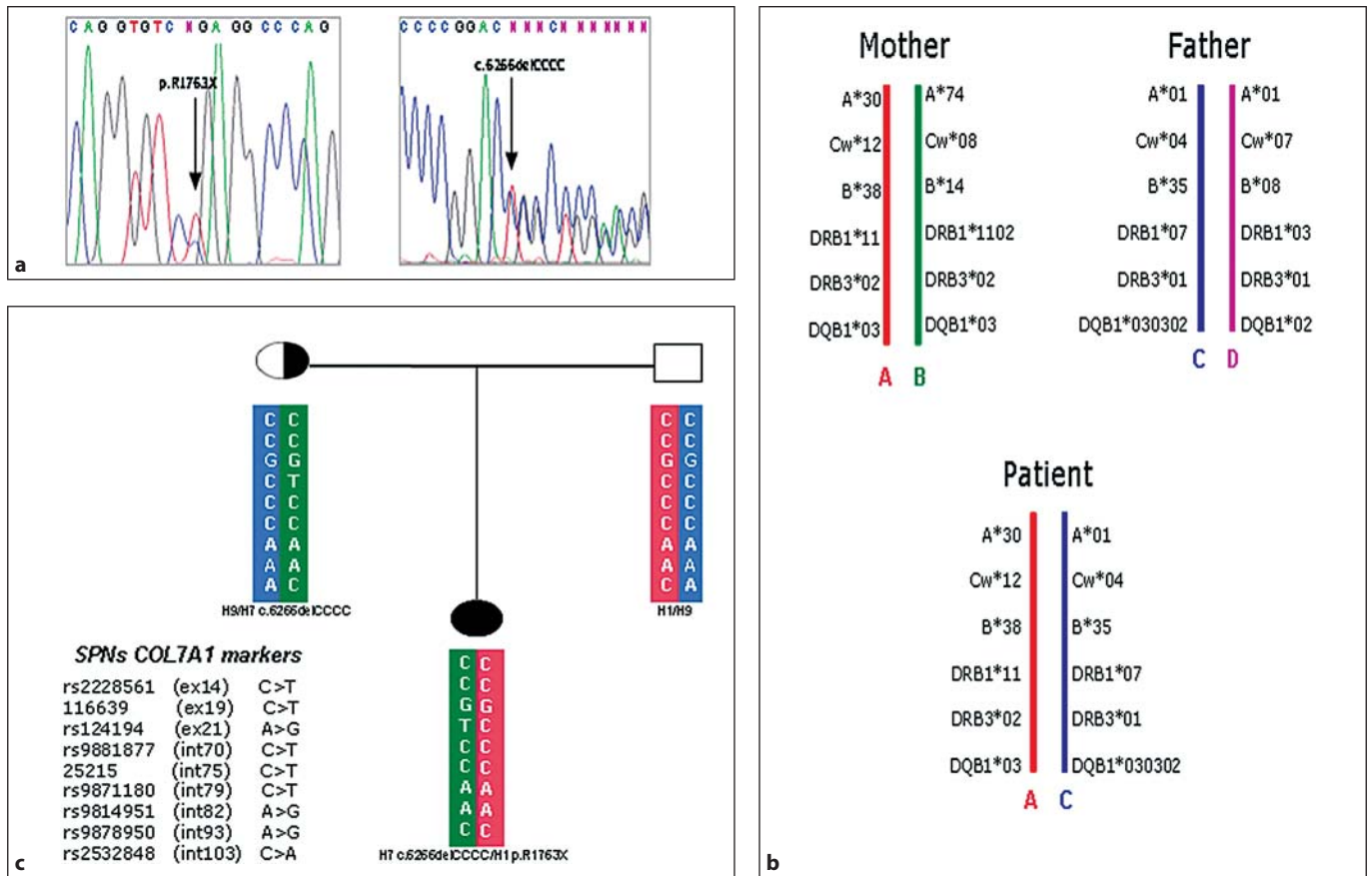


Fig. 2. Molecular characterization of the proband. **a** C→G transversion at nucleotide position 5287 leading to the missense mutation (p.R1763X) falls in exon 60 of the COL7A1 gene. The c.6266CCCC deletion (c.6266_6269del) in exon 75 leads to a premature termination codon in exon 82. **b** Pedigree with haplotype assignment of HLA typing results of the family. The proband in-

herited one HLA haplotype from each parent. **c** Haplotyping assay based on intragenic SNP selection shows that the haplotype 7 (H7) cosegregated with the deletion mutation inherited from her mother. The haplotype 1 (H1) was inherited from the father who does not carry the R1763X mutation.

References

- Christiano AM, Hoffman GG, Chung-Honet LC, et al: Structural organization of the human type VII collagen gene (COL7A1) composed of more exons than any previously characterized gene. *Genomics* 1994; 21:169–179.
- Kern JS, Grüninger G, Imsak R, et al: Forty-two novel COL7A1 mutations and the role of a frequent single nucleotide polymorphism in the MMP1 promoter in modulation of disease severity in a large European dystrophic epidermolysis bullosa cohort. *Br J Dermatol* 2009;161: 1089–1097.
- Escámez MJ, García M, Cuadrado-Corrales N, et al: The first COL7A1 mutation survey in a large Spanish dystrophic epidermolysis bullosa cohort: c.6527insC disclosed as an unusually recurrent mutation. *Br J Dermatol* 2010;163:155–161.
- Cuadrado-Corrales N, Sánchez-Jimeno C, García M, et al: A prevalent mutation with founder effect in Spanish recessive dystrophic epidermolysis bullosa families. *BMC Med Genet* 2010;11:139.
- Labuda D, Striker G: Sequence conservation in Alu evolution. *Nucleic Acids Res G* 1989;11:2477–2479.
- Dunnill MG, McGrath JA, Richards AJ, et al: Clinicopathological correlations of compound heterozygous COL7A1 mutations in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 1996;107:171–177.
- Kern JS, Kohlhase J, Bruckner-Tuderman L, Has C: Expanding the COL7A1 mutation database: novel and recurrent mutations and unusual genotype-phenotype constellations in 41 patients with dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 2006;126:1006–1012.

Marcela Del Rio
 Universidad Carlos III de Madrid
 Avda. de la Universidad, 30
 ES-28911 Campus de Leganés
 Madrid (Spain)
 Tel. +34 91 624 9123, E-Mail mrnechae@ing.uc3m.es

- **Recessive dystrophic epidermolysis bullosa: the origin of the c.6527insC mutation in the Spanish population**

Br J Dermatol (2013) 168: 213-232