

**ESTUDIO DEL SPLICING ABERRANTE EN EL GEN
SUPRESOR DE TUMORES BRCA1 MEDIANTE
MINIGENES HÍBRIDOS Y SU IMPACTO EN LA
PREDISPOSICIÓN GENÉTICA A CÁNCER DE
MAMA Y OVARIO.**

CRISTINA HERNÁNDEZ MORO.

Tutor: Eladio Andrés Velasco Sampedro.

ÍNDICE

Abreviaturas	Pág. 1
Introducción	Pág. 3
Objetivos	Pág. 12
Materiales y Métodos	Pág. 13
Resultados y Discusión	Pág. 23
Conclusiones	Pág. 30
Anexos	Pág. 32
Bibliografía	Pág. 36

ABREVIATURAS.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

ADNg: Ácido desoxirribonucleico genómico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

AS: *Splicing* alternativo.

AV: Secuencia aceptora del vector.

BARD1: *BRCA1-associated RING domain protein 1.*

BASC: *BRCA1-associated genome surveillance complex.*

BIC: *Breast Cancer Information Core.*

BRC: Repeticiones de aminoácidos en BRCA2.

BRCA1 y 2: *Breast cancer 1 and 2 gene.*

BRCT: Dominio C-terminal de BRCA1.

BRIP1: *BRCA1-interacting protein C-terminal helicase 1.*

CM: Cáncer de mama.

CMO: Cáncer de mama y ovario.

CMOH: Cáncer de mama y ovario hereditario.

dNTPs: 2'3'-dideoxirribonucleótidos trifosfato.

D-MEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium.*

Downstream: Posterior en la secuencia.

DV: Secuencia donadora del vector.

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

ESE: *Exonic splicing enhancer.* Secuencia enhancer del *splicing* exónica.

ESS: *Exonic splicing silencer.* Secuencia silenciadora del *splicing* exónica.

FANC2: *Fanconi Anemia complementation group D2.*

FBS: Suero bovino fetal.

hnRNP: *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins.* Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares.

IBGM: Instituto de Biología y Genética Molecular.

ISE: *Intronic splicing enhancer.* Secuencia enhancer del *splicing* intrónica.

ISS: *Intronic splicing silencer.* Secuencia silenciadora del *splicing* intrónica.

IVS: *Intervening sequence variant or Intronic variant.* Variante intrónica.

Kb: Kilobase.

KDa: Kilodalton.

LB: Medio Luria-Bertani.

MCS: *Multiple cloning site.* Sitio de clonación múltiple o poliensamblador.

MD: Mutagénesis dirigida.

MG: Minigén.

NMD: *Nonsense-mediated mRNA decay.* Degradación del ARNm mediada por mutaciones.

nt: nucleótido.

P53: *Tumor protein 53.*

bp: Par de bases.

PBS: *Phosphate buffered saline.* Tampón fosfato salino.

PCR: *Polymerase Chain Reaction.* Reacción en cadena de la polimerasa.

PreARNm: Ácido ribonucleico pre-mensajero.

PTB: *Polypyrimidine tract-binding protein.* Proteína de unión al tracto de polipirimidina.

RAD50: *DNA repair RAD50.*

RAD51: *DNA repair RAD51.*

RNAi: *Interference nuclear ribonucleic acid.* Ácido ribonucleico de interferencia.

RT-PCR: *Reverse transcriptase PCR.* Reacción en cadena de la polimerasa tras transcripción reversa.

SC35: *Splicing factor arginine/serine-rich 2 or Splicing component 35 kDa.* Factor de *splicing* rico en arginina/serina 2 o componente del *splicing* de 35 KDa.

SF2/ASF: *Splicing factor arginine/serine-rich 1 or pre-mRNA-splicing factor SF2.* Factor de *splicing* rico en arginina/serina 1 o factor de *splicing* del pre-mRNA SF2.

snRNA: *Small nuclear ribonucleic acid.* Ácido ribonucleico pequeño nuclear.

Splicing: Ajuste o empalme del ARN.

SR: *Arginine-serine-rich protein.* Proteína rica en arginina-serina.

TBE: Solución tampón Tris/Borato/EDTA.

tRNA: *Transfer ribonucleic acid.* Ácido ribonucleico de transferencia.

UCG: Unidad de consejo genético.

Upstream: Anterior en la secuencia.

UTR: *Untranslated region.* Región no traducida.

UV: *Unclassified variant.* Variante no clasificada.

Wt: *Wild type.* Alelo silvestre.

INTRODUCCIÓN.

1. SPLICING COMO PROCESO FUNDAMENTAL.

El proceso de *splicing* (o corte y empalme) es propio de los organismos eucariotas y consiste en el procesamiento del pre ARNm de manera que los intrones (partes no codificantes del ARN) son eliminados, y los exones (parte codificante para proteínas) se unen de manera secuencial. Los genes de eucariotas contienen en su mayoría múltiples exones separados por intrones de variable longitud que pueden ser procesados siguiendo patrones diferentes de *splicing*. Es por esto que a partir de un número limitado de genes (~17.000) se obtiene una gran cantidad de diferentes isoformas proteicas (100 – 200.000) sintetizadas a partir del mismo gen (David et al., 2010). Este proceso se denomina *splicing alternativo*.

1.1 Elementos básicos del splicing.

Existen ciertas bacterias y virus que muestran capacidad de autoprocesamiento de sus ARNs sin necesidad de factores proteicos adyacentes (Guo and Cech, 2002), pero la gran mayoría de los intrones se escinden mediante reacciones de *splicing* catalizadas por un complejo ribonucleoprotéico denominado *spliceosoma*.

Existen dos tipos de intrones que difieren en su secuencia del sitio específico de *splice* y por tanto, los factores que conforman el *spliceosoma* también son diferentes:

- Intrones U2 dependientes.
- Intrones U12 dependientes.

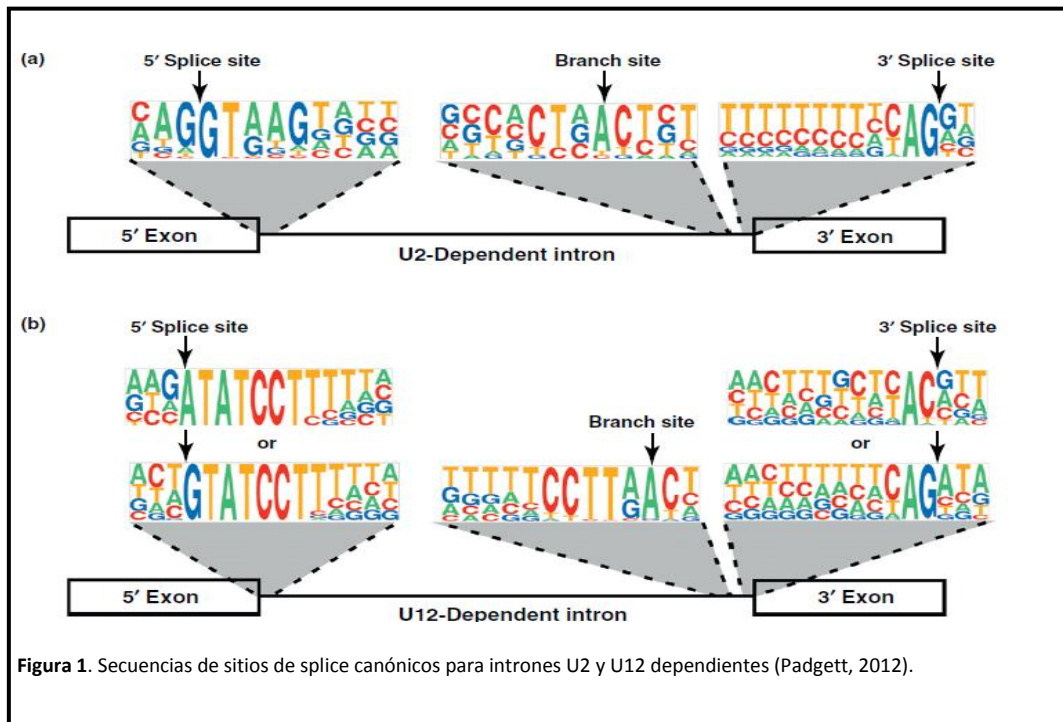
Para el reconocimiento de estos intrones y la adhesión de la maquinaria de *splicing* son necesarias determinadas secuencias intrónicas y exónicas.

- Sitio de *splicing* 5' o donador.
- Sitio de *splicing* 3' o aceptor.
- Punto de ramificación (BR) localizado de 14 a 50 nucleótidos *upstream* del sitio 3'.
- Tracto de polipirimidinas (desde 8 hasta 16 apróx.) localizado entre el punto de ramificación y el sitio 3' de *splice*.

Además existen secuencias degeneradas que corresponden a lugares de unión de distintos factores de *splicing* críticos que intervienen en dicho proceso como reguladores (Ast, 2004). Se clasifican según su función y su posición en:

- ESE (*Exonic splicing enhancer*; secuencia exónica que potencia el *splicing*).

- ESS (*Exonic splicing silencer*; secuencia exónica silenciadora del splicing).
- ISE (*Intronic splicing enhancer*; secuencia intrónica que potencia el splicing).
- ISS (*Intronic splicing silencer*; secuencia intrónica silenciadora del splicing).



1.2 Espliceosoma y reacción de splicing.

El espliceosoma es un complejo macromolecular formado por 5 ARNnp (ARN nuclear pequeño) una gran variedad de ribonucleoproteínas (snRNPs) y otras proteínas asociadas. Existen dos tipos de espliceosomas y cada uno de ellos es específico de cada tipo de intrón. Actualmente se emplean cada vez más, métodos computacionales que predicen el espliceosoma responsable del procesamiento de cada intrón (Wahl, 2009).

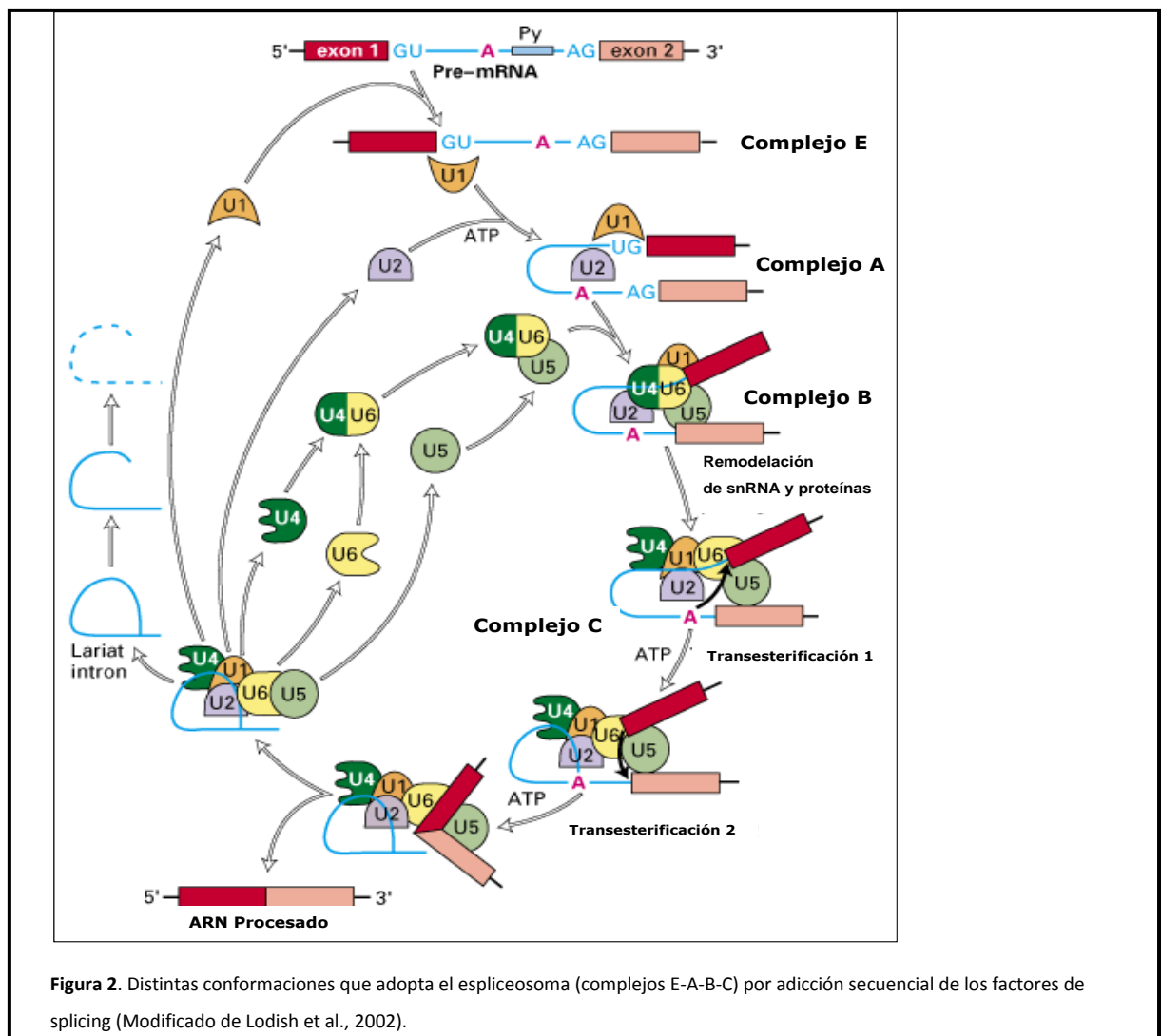
Los intrones U2 dependientes son procesados por espliceosomas formados por los ARNnp U1 y U2 (que forman un complejo binario) y U4, U5 y U6 (que forman un complejo tri-ARNnp). Los ARNnp que intervienen en el procesamiento de intrones U12 dependientes son equivalentes a los anteriores y se denominan U11, U12, U4atac, U5 (este es el único común) y U6atac (Padgett, 2012).

Los diferentes factores que conforman el espliceosoma se ensamblan alrededor de las secuencias específicas reconocidas en un proceso que consta de varias etapas anteriormente caracterizadas (Black, 2003; Tardiff, 2006). Este ensamblaje ocurre de manera simultánea a la reacción de splicing y la catálisis del intrón.

- 1- El primer paso es el reclutamiento del ARNnp U1 al sitio 5' de splice y del complejo U2AF65/35 al sitio 3' de splice por mediación de la proteína SRSF2 (de la familia de proteínas SR). Seguidamente el factor U2AF recluta a la proteína SF1 hacia el punto de ramificación.

- 2- El ARNnp U2 desplaza a SF1 uniéndose al punto de ramificación ayudada por el complejo SF3B1/SF3A1. Los complejos conformados en los sitios críticos de splice se unen a modo de “puente” por medio de proteínas adicionales como PRPF40B Y ZRSR2.
- 3- En la siguiente etapa el complejo U4- U5-U6 se asocia con el complejo inicial. Dentro de este complejo, U4 y U6 son complementarios y el punto de activación del proceso de splicing se relaciona con el desapareamiento de dichos factores. De este modo quedará la unidad catalítica formada por U2, U5 y U6 y las ribonucleoproteínas adyacentes.

Este proceso es explicado por la formación de los complejos E, A, B y C (Lodish et al., 2002) mostrados en la siguiente figura.



Desde el punto de vista bioquímico, la reacción de splicing comienza con la ruptura del enlace fosfodiéster del sitio donador y la unión del extremo 5' del intrón al residuo hidroxilo en posición 2' de la adenosina del punto de ramificación.

El enlace fosfodiéster del sitio aceptor se rompe y el extremo 5' del exón posterior se une al hidroxilo libre en 3' del exón anterior. El resultado es la unión secuencial de los exones contiguos y la eliminación del lazo intrónico o *ariat*.

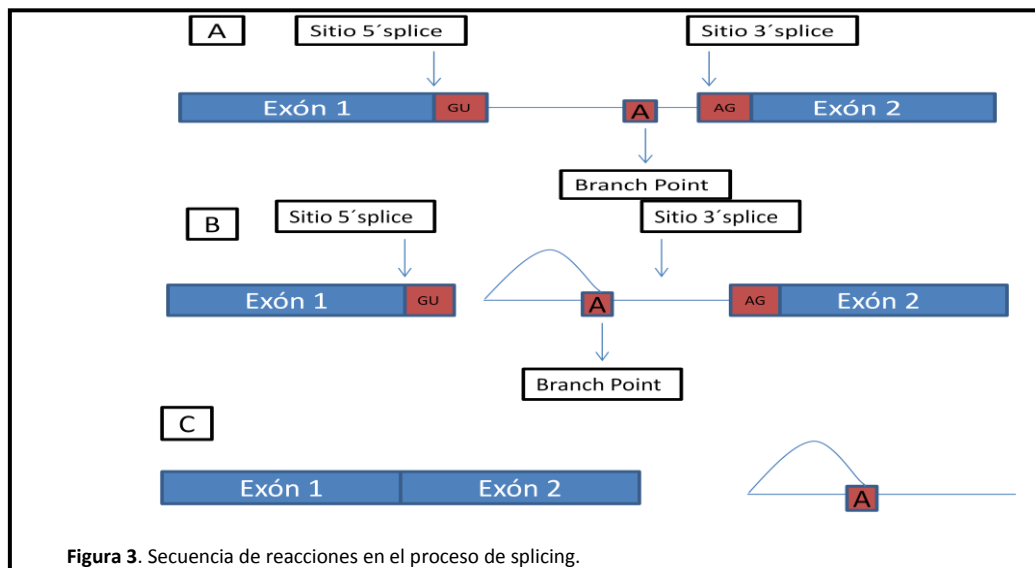


Figura 3. Secuencia de reacciones en el proceso de splicing.

2. SPLICING ALTERNATIVO. FUNDAMENTO DE VARIABILIDAD.

El proceso de splicing ha sido fundamentado durante años en el reconocimiento específico de las secuencias del sitio donador (GU), punto de ramificación (A) y sitio aceptor (AG), pero estudios recientes de secuenciación masiva (*RNA-seq*) indican que el número de sucesos de splicing alternativo (AS) y las isoformas producidas son mucho más abundantes de lo que se había podido estimar previamente (Wang, 2008).

El AS permite un aumento de la variabilidad de los transcritos producidos, lo que se traduce en una mejor adaptación de los organismos que han incorporado estos mecanismos a lo largo de la evolución.

2.1 Elementos reguladores.

Los largos genes de mamíferos (28.000 nt de longitud media), su compleja estructuración en intrones y exones, y la conservación de los sitios de splicing sugieren el requerimiento de otros elementos reguladores que actúen en “*cis*” y que faciliten el reconocimiento de los exones que den lugar a la síntesis de las proteínas requeridas en una fase del desarrollo concreta, tejido o para una respuesta específica. (Fairbrother, 2002; Goren, 2006; Keren, 2010). Estos factores reguladores se unen a las secuencias descritas en el apartado anterior fomentando la inclusión de exones o su exclusión.

Entre los reguladores cabe destacar las proteínas SR que promueven las etapas iniciales del splicing como SF2/ASF, SC35, SRp55 y SRp40 actuando como potenciadores del proceso. Por el contrario, las proteínas de la familia de las hnRNPs median efectos de represión mediante la unión a secuencias silenciadoras específicas (Wang, 2007). Los elementos potenciadores o silenciadores de splicing actúan en coordinación sobre el ARNm correspondiente e interviniendo proteínas asociadas en “*trans*”. Esto

representa una parte importante de los componentes del código de splicing para la explicación de cómo, cuándo y dónde ocurre específicamente el procesamiento. Estas interacciones y equilibrios entre elementos reguladores suponen otro punto crítico en la fidelidad y regulación del correcto procesamiento del ARNm.

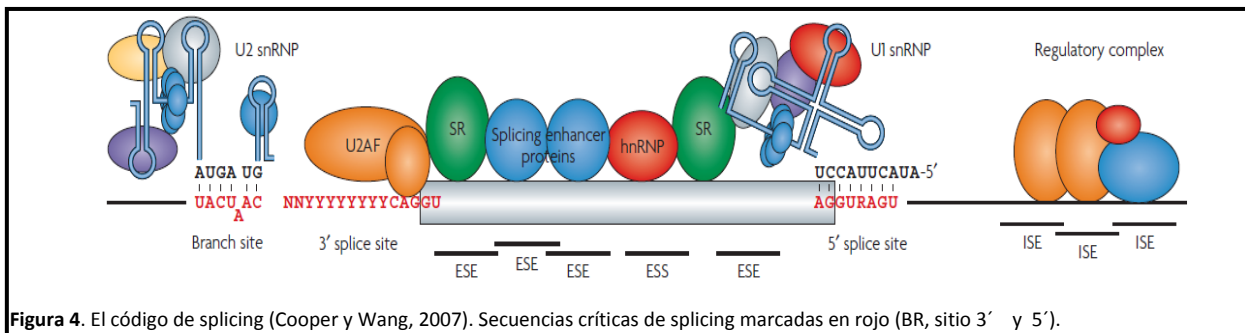


Figura 4. El código de splicing (Cooper y Wang, 2007). Secuencias críticas de splicing marcadas en rojo (BR, sitio 3' y 5').

2.2 Control combinatorial.

Se ha propuesto un modelo de control combinatorio en el que intervienen una serie de parámetros a tener en cuenta en la generación de isoformas de ARNm (Hertel, 2008). Se valoran la fuerza del sitio de splicing (dada por la similitud con la secuencia consenso), los potenciadores y silenciadores que intervienen en la regulación (ayudando al reconocimiento de los exones cuyos sitios de splicing tienen una fuerza menor), la arquitectura exón/intrón, la estructura secundaria del ARN (de lo que depende la capacidad de ensamblaje del espliceosoma del que forman parte) y la síntesis del pre- ARNm por la Polimerasa II, variando el patrón de splicing con los distintos promotores reconocidos y la cinética específica de la polimerasa en la transcripción. La interrelación de estos factores incrementa aún más, si cabe, la especificidad y la importancia biológica de los eventos de splicing alternativo.

3. SPLICING Y ENFERMEDAD.

Los nuevos métodos bioinformáticos desarrollados facilitan cada vez más la posible interpretación de los efectos de una mutación en el proceso de splicing, pero por razones obvias es necesario validar experimentalmente estas pruebas como ya han hecho anteriormente en ensayos *in vitro* dando una máxima fiabilidad a la posible lectura clínica (Duran, 2003). Estimaciones recientes fijan la cantidad de mutaciones de splicing patológicas entre un 15% a un 60% del total (Krawczack et al., 1992; López-Bigas et al., 2005).

Se han estudiado principalmente mutaciones en los sitios aceptor y donador de splicing y los niveles de pérdida o ganancia de elementos reguladores del splicing (ESRs) por mutaciones en sus secuencias de reconocimiento. Además se analizan SNPs que a priori son neutrales y mutaciones de los factores proteicos y ARNs que conforman el espliceosoma propiamente dicho.

Existen numerosos ejemplos que permiten dar una mayor importancia al estudio de dichas mutaciones. Este es el caso de la Retinitis Pigmentosa, una enfermedad autosómica dominante causada por

mutaciones en los factores proteicos *PRPF*, asociados a la conformación del espliceosoma funcional. Dichos factores sufren alteraciones en su estructura debido a mutaciones en sus secuencias y esto impide que el espliceosoma del que forman parte sea funcionalmente correcto. La maquinaria de procesamiento de la que forman parte interviene en el splicing de los fotorreceptores dando lugar a patrones aberrantes del mismo. Esto provoca una disfunción de los fotorreceptores de la retina y la gravedad de la enfermedad variará de acuerdo a la cantidad de proteína correctamente sintetizada.

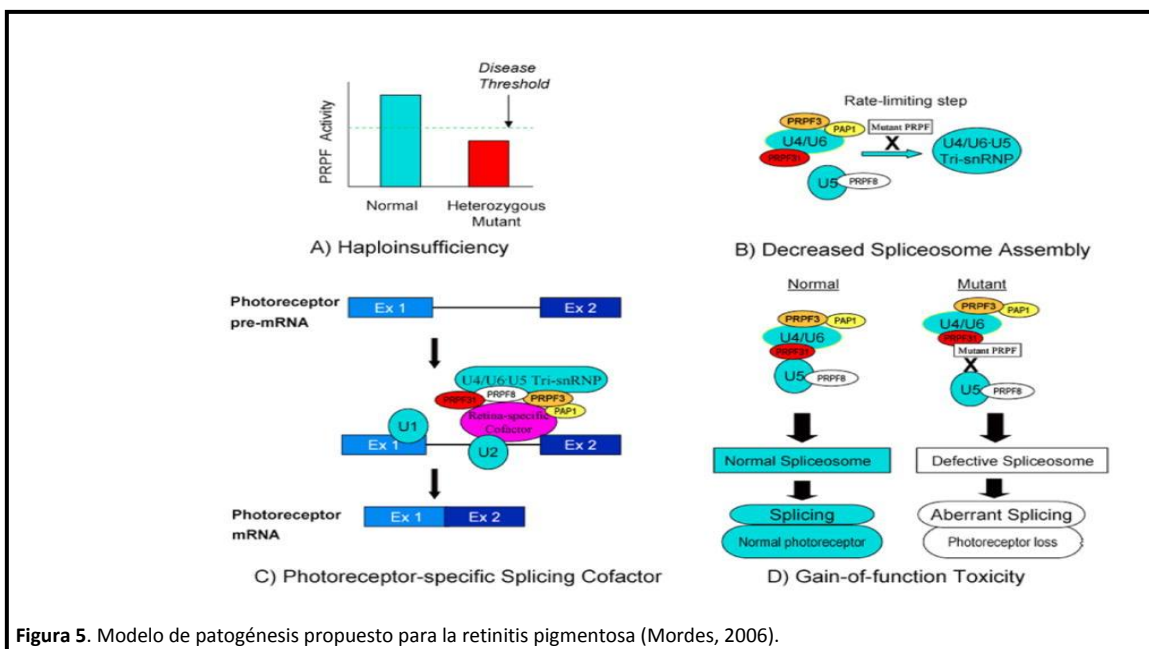


Figura 5. Modelo de patogénesis propuesto para la retinitis pigmentosa (Mordes, 2006).

4. CÁNCER DE MAMA Y OVARIO Y SPLICING ABERRANTE.

El cáncer de mama es la causa de mortalidad y morbilidad más común entre las mujeres. En 1994 y 1995 se descubren dos genes, *BRCA1* y *BRCA2*, de alta penetrancia en cáncer de mama y ovario hereditario. Las mujeres portadoras de mutaciones deletéreas en cualquiera de estos genes tienen un riesgo significativamente incrementado de padecer cáncer de mama (85% a los 70 años) y ovario, así como otros tipos de tumores (www.geneclinics.org). A ambos se les atribuye la función de asegurar la estabilidad genómica y la supervivencia celular, así como la reparación del ADN mediante recombinación homóloga.

4.1 BRCA 1 y el modelo poligénico.

El gen *BRCA 1* se localiza en el cromosoma 17, en la región q21 y codifica para una proteína de 1863 aminoácidos. Contiene un dominio en el extremo amino terminal denominado "Ring Finger" de unión a la proteína *BARD1* (implicada en la actividad ubiquitin-ligasa) y dos dominios *BRCT* en el extremo carboxilo terminal (implicados en la transactivación transcripcional y reparación del ADN), ambos altamente

conservados, los cuales confieren la función supresora de tumores a *BRCA1*. *BRCA1* además actúa en diferentes procesos y realizando las siguientes funciones (Huen, 2010):

- Se localiza en el lugar del daño del ADN por interacción con proteínas (entre ellas histonas) fosforiladas que señalizan dichos puntos. La acumulación de *BRCA1* está mediada por proteínas de interacción y helicasas.
- *BRCA1* muestra actividad E3 ubiquitin ligasa, con lo que podría mediar la ubiquitinación de proteínas, un proceso de marcaje de proteínas para su degradación en el proteasoma. Además se la confiere la propiedad de “*scaffold*” o soporte para la adhesión de proteínas señalizadoras como *ATM* y *ATR* (Foray, 2003).
- *BRCA1* forma parte del complejo *BASC* (*BRCA1-associated genome surveillance complex*) implicado en la remodelación de la cromatina tras la ruptura del ADN. El heterodímero que forma con *BARD1* (*BRCA1 associated ring domain*) controla la duplicación del centrosoma y modula el control del ciclo celular.

Se ha propuesto un modelo multifactorial en el que *BRCA1* participaría en diferentes complejos con funciones solapantes (Huen et al., 2010). Entre estas funciones destacan el control del ciclo en fase G2-M, la replicación correcta del ADN y la progresión de la fase S, y la reparación de daños por recombinación homóloga. En estos complejos intervienen otros genes de predisposición a cáncer como *BACH1*, *MERIT40* o el complejo *MRN* (*MRE11-RAD50-NBS1* esencial para la detección y señalización de daños).

Los genes *BRCA1* y *BRCA2* son responsables de tan sólo el 16% del riesgo familiar por lo que el espectro de predisposición genética a cáncer de mama/ovario no se ha clarificado. En la actualidad se sabe que existen otros genes de susceptibilidad, entre los que se encuentran *ATM*, *CtBP*, *PALB2*, *PTEN*, *RAP 80*, *Abraxas* y los complejos *FANC*, entre otros (Shuen, 2011). Una mutación en cualquiera de estos genes supone un incremento en el riesgo de cáncer de mama, y su detección tiene una repercusión directa en la prevención de la enfermedad a través de la detección de mujeres portadoras asintomáticas y la activación de los protocolos de prevención indicados por las Unidades de Consejo Genético y los Servicios de Oncología.

La importancia clínica de que una mutación cause desajustes en algún punto de esta ruta confiere una mayor susceptibilidad a padecer diversas enfermedades puesto que pueden verse afectados procesos como el splicing, la reparación del ADN, la división celular, etc. Entre estas posibles enfermedades cabe destacar el cáncer de mama y ovario.

4.2 Mutaciones en *BRCA1*.

Se han reportado más de 3500 mutaciones en la Base de datos de *BRCA1* y *BRCA2* (*BIC database*) de las que una buena parte truncan la proteína (*nonsense* y *frameshift*) por lo que en su mayoría tendrán efecto patogénico. La base de datos del BIC clasifica las mutaciones como patogénicas o de relevancia desconocida

según sea el tipo de mutación y evidencias recogidas en la literatura científica recogida a día de hoy. Por regla general, las mutaciones se clasifican como patogénicas o causantes de enfermedad atendiendo al efecto producido por la proteína. Entre todas ellas destacan las mutaciones truncantes (*nonsense* y *frameshift*) que introducen un codón STOP prematuro, y las mutaciones de cambio de aminoácido o *missense* a las que se les atribuye una alteración de la funcionalidad de la proteína, aunque el ensayo funcional es una tarea muy complicada y laboriosa. Sin embargo, el efecto de las mutaciones en el splicing es un factor muy importante a tener en cuenta, dado que los cambios de nucleótidos en los sitios de splicing, la interrupción de potenciadores o la creación de nuevos silenciadores del proceso pueden dar lugar a patrones aberrantes resultando en la obtención de transcritos erróneos que dan lugar a proteínas disfuncionales.

Han sido identificadas variantes en *BRCA1* de gran importancia biomédica como c. 5074+3A>G (causa la eliminación del exón 17) o c. 4357+1G>T (causa la eliminación del exón 13) y en *BRCA2* como c.8332-1G>A que causa la delección de 14 bp al inicio del exón 19 (Menendez, 2012). Además de las específicas de sitios canónicos de splicing existen evidencias experimentales de variantes UV que provocan desregulación del splicing por el aumento de silenciadores creados *de novo* o la interrupción de potenciadores; tal es el caso en el estudio de la mutación c.5242C>A, que provoca la delección del exón 18 por unión de las proteínas represoras hnRNPH y hnRNPA1 a una nueva secuencia silenciadora creada por la mutación. Esta mutación se ha encontrado en 8 familias CMOH no relacionadas cuyas pacientes desarrollaron cáncer de mama y/o ovario a edades comprendidas entre los 30 y 48 años (Millevoi, 2010). Se recogieron entre los resultados obtenidos el número de afectados dentro de la misma familia, las edades de diagnóstico, los afectados con cáncer de mama y ovario de entre los casos de estudio y la diagnosis de otros tipos de cáncer relacionados como el de endometrio, colon o leucemia.

Se han realizado multitud de análisis funcionales a partir de ADN de pacientes portadoras (obtenido desde linfocitos principalmente) o bien mediante la tecnología de minigenes híbridos en los cuales se han introducido las mutaciones detectadas en pacientes mediante mutagénesis dirigida, y los ensayos funcionales de splicing se realizan “*ex vivo*” en células en cultivo. Los resultados experimentales aportaron evidencias de que mutaciones en las secuencias *BRCA1* y *BRCA2* pueden estar implicadas en la etiopatogenia a través de alteraciones relevantes en el mecanismo de splicing. En un estudio previo de los exones 19, 20, 23 y 24 de *BRCA2* en pacientes de Castilla y León se mostró que la variante c.8488-1G>A de *BRCA2* provocaba la ruptura del sitio aceptor de splicing e inducía una alteración profunda de los patrones fisiológicos normales de splicing que incluía retención del intrón 19, con la consecuente introducción de un codón stop prematuro, y delección de 12 nucleótidos, es decir, 4 codones, dos de los cuales están altamente conservados en la escala evolutiva hasta erizo de mar, sugiriendo su importancia en la funcionalidad de *BRCA2* (Infante, 2006; Acedo, 2012; Sanz, 2010).

La clasificación de la vasta cantidad de mutaciones que puedan afectar al splicing no es ni mucho menos directa o inmediata y debe ser realizada a través de un ensayo funcional, como es el caso de los minigenes híbridos que representan la herramienta adecuada para este tipo de estudios, ya que, primero, no requiere una nueva muestra de la paciente y segundo, es un método robusto y fiable para la clasificación de las variantes en mutaciones deletéreas o meros polimorfismos. No sólo eso, datos epidemiológicos y familiares (presencia de la variante en la población de estudio, segregación familiar, etc.) deben tenerse en cuenta, así como el porcentaje de transcrito aberrante que se sintetiza y la especificidad de tejido del patrón de splicing afectado.

Todos los resultados recogidos hasta la fecha certifican la gran relevancia de los estudios de rastreo de mutaciones que predispongan a cáncer de mama u ovario con el fin de facilitar un programa de prevención, diagnóstico familiar y consejo genético (en los casos en los que sea necesario) mejorando así la calidad de vida de las pacientes.

Dada la alta repercusión de las alteraciones de splicing en la susceptibilidad hereditaria a cáncer de mama/ovario, nos propusimos el estudio del impacto en el splicing mediante minigenes híbridos de 3 variantes de ADN del exón 16 de *BRCA1* detectadas en pacientes españolas con cáncer de mama y ovario hereditario. Aprovechando estas construcciones se procedió al mapeo de elementos reguladores de splicing y al análisis de mutaciones candidatas de splicing registradas en las bases de datos internacionales. Se han identificado 6 mutaciones que implican patrones aberrantes de splicing dado que afectan a los sitios canónicos del proceso, así como una mutación encontrada en pacientes de Castilla y León que muestra una duplicación en el exón 16. Con esto demostramos la fiabilidad y utilidad del análisis de mutaciones mediante minigenes híbridos y su directa relación con el estudio de enfermedades de predisposición genética.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo se centra en el estudio de la correlación entre *splicing* anómalo del gen supresor de tumores *BRCA1* y la predisposición genética a cáncer de mama/ovario (CMO). Los objetivos concretos a desarrollar son:

1. Construcción de un minigén híbrido “*wild type*” con los exones 15, 16, 17, 18 y 19 de *BRCA1* para la realización de ensayos funcionales de *splicing* “*ex vivo*”.
2. Mapeo de elementos reguladores del procesamiento del ARNm (*splicing*) en *BRCA1* mediante microdeleciones solapantes.
3. Evaluar el impacto en el proceso de *splicing*, de mutaciones en *BRCA1* presentes en pacientes con CMO, procedentes de las Unidades de Consejo Genético de Cáncer Hereditario de Castilla y León. Este punto, a su vez, se puede dividir en:
 - Selección de mutaciones candidatas mediante análisis bioinformático con los programas de *splicing* de todas las variantes de ADN registradas en las bases de datos internacionales.
 - Generación de las variantes seleccionadas mediante mutagénesis dirigida en el minigén híbrido.
 - Ensayo funcional en células eucariotas.
 - Caracterización molecular de las diferentes isoformas de *splicing* generadas.
 - Contribución de las anomalías de *splicing* al espectro de predisposición genética del cáncer de mama y ovario hereditario.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. SELECCIÓN DE MUTACIONES.

Se seleccionaron pacientes atendiendo a los criterios de la Unidad de Consejo Genético (Complejo hospitalario de Burgos). Los estudios realizados en este trabajo fueron aprobados por el Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid. Previamente a la extracción de sangre las pacientes firmaron un consentimiento informado. Se seleccionaron pacientes portadoras de 3 mutaciones, 2 eran variantes no clasificadas (UV) y la otra mutación era un SNP.

Las mutaciones UV (c.5075G>A y c.4931A>G) y el SNP correspondieron al exón 16 (4956A>G) de *BRCA1*. La decisión de incorporar el polimorfismo en el estudio es la alta frecuencia del genotipo A/G (34.4% de los individuos, evaluado por la base de datos de SNPs, dbSNP), que da lugar al cambio de aminoácido S1613G.

La nomenclatura de todas las variantes genéticas sigue las directrices de la Human Genome Variation Society (HGVS) basadas en el ADNc del gen *BRCA1*.

1.1. ANÁLISIS DE MUTACIONES IN SILICO.

Se seleccionan a partir de las bases de datos públicas de mutaciones de los genes BRCA BIC (The Breast Cancer Information Core Database; <http://research.nhgri.nih.gov//bic/>) y UMD (Universal Mutation Database; <http://www.umd.be/>), aquellas mutaciones que pueden afectar al splicing de dichos genes. Todas las mutaciones del exón 16 (tanto las seleccionadas de pacientes como las seleccionadas de bases de datos) se estudian “in silico” mediante los software disponibles presentados a continuación, y se seleccionan un total de 11 mutaciones atendiendo a los siguientes criterios:

- a) Ruptura o disminución notable del valor probable de los sitios aceptor y donador de splicing canónicos.
- b) Creación de sitios crípticos donadores y aceptores.
- c) Ruptura del punto de ramificación (BR).
- d) Creación de secuencias de reconocimiento de silenciadores (ESS).

Para ello se emplean los siguientes programas online:

- **ESRsearch** (<http://esrsearch.tau.ac.il/>)

Programa informático que permite el reconocimiento de secuencias (ESS, ESE) a las que se unen elementos trans-reguladores del splicing. Emplea para ello tres algoritmos de búsqueda diferentes: ESE finder, PESX y RESCUE-ESE (Goren et al., 2006; Fairbrother et al., 2004; Zhang y Chasin et al., 2004). El programa ofrece un análisis de posibles secuencias reguladoras de unión, sin tener en cuenta los factores de splicing que puedan unirse (hnRNP-I, hnRNP-F, Nova, SRp40...).



Figura 1. Secuencias degeneradas detectadas por ESEfinder para los factores sc35, sf2 y Srp40.

- **NNsplice** (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)

Programa disponible en internet que permite predecir los sitios de splice canónicos y crípticos otorgándoles a cada uno una puntuación determinada entre cero y uno que representaría la similitud con la secuencia consenso en cada caso. Desarrollado por la Universidad de Berkeley dentro del Proyecto Genoma de Drosophila (BDGP) (Reese et al., 1997).

- **Human Splicing Finder** (<http://www.umd.be/HSF/>)

Uno de los programas de predicción de splicing más completos hasta el momento (FO Desmet, Hamroun D et al., 2009). Integra matrices de detección de elementos intrónicos y exónicos, matrices de detección de secuencias de reconocimiento para las secuencias reguladoras (ESR) ya existentes y algunos algoritmos nuevos para detección de hnRNP-A1, Tra2β y 9G8 como el EIE y IIE (Zhang et al., 2008); además del reconocimiento de sitios de splicing con un valor de probabilidad asignado.

2. CONSTRUCCIÓN DE MINIGENES.

Para realizar los ensayos funcionales de las posibles mutaciones seleccionadas que pueden afectar al proceso de splicing, se emplea el minigén 15-19 construido a partir del plásmido exón trapping desarrollado en el laboratorio a partir del pSPL3.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, descatalogado).

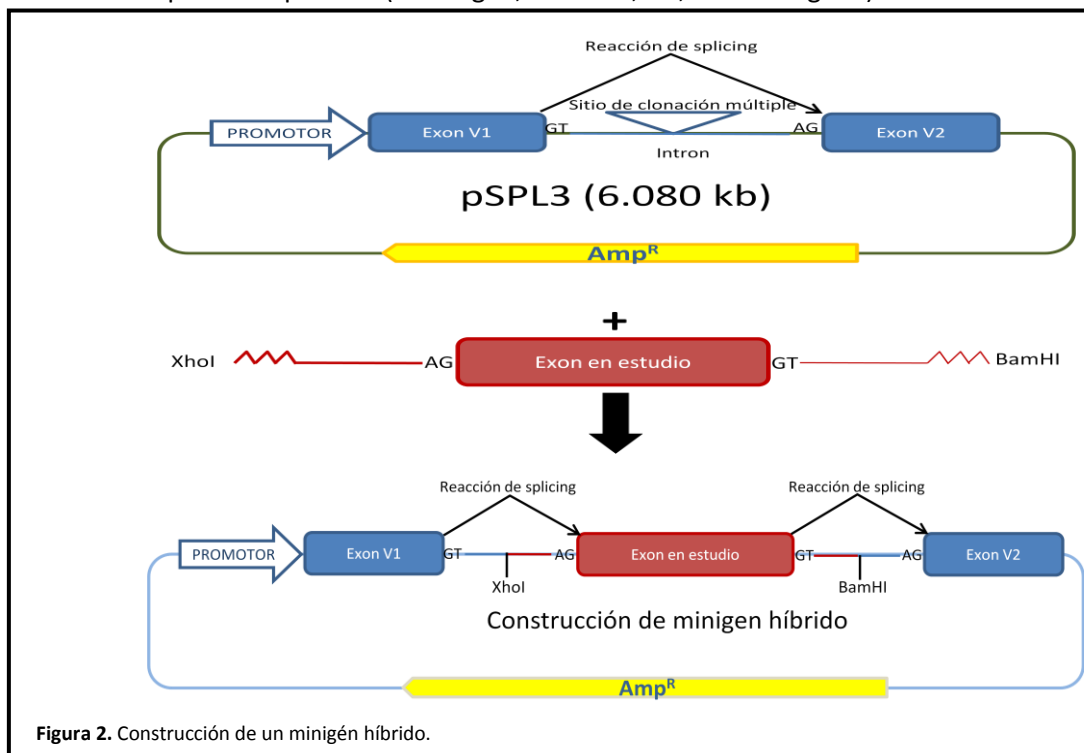


Figura 2. Construcción de un minigén híbrido.

Para dicha construcción se amplifican los exones 15, 16, 17 y 18-19 (estos últimos se amplifican juntos dado su pequeño tamaño) a partir de ADN de un control anónimo, empleando cebadores específicos a los que se añaden colas con dianas de restricción específicas para su posterior digestión y ligación.

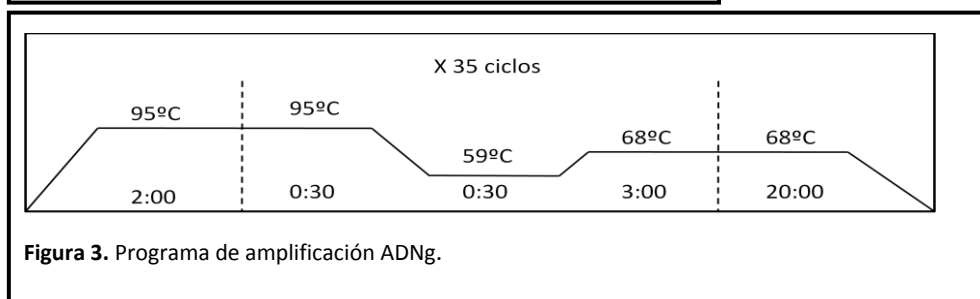
Tabla 1. Primers amplificación exones ADNg.

Exón	Primer	Diana	Tamaño
16	CACACAGAATTCATACTATTCCTATGACTAAACCT	<i>EcoRI</i>	870pb
	CACACACTCGAGCGAAAGTCCTATATCATACCCA	<i>XhoI</i>	
17	CACACACTCGAGCTTCAGGTGTCTTAGAATTTTT	<i>XhoI</i>	777pb
	CACACAGGTACCCACACACAAGCTTATCCATGCTATGCTCAACAAA	<i>HindIII-KpnI</i>	
15	CACACAGGATCCCCCATGTTATATGTCAACCC	<i>BamHI</i>	642pb
	CACACAGAATTCGAAGACTCCCTCATCCTCAA	<i>EcoRI</i>	
18-19	CACACAAAGCTTTAGAAGATGGGTGTTGAGAAGA	<i>HindIII</i>	1033pb
	CACACAGGTACCCACACAATCGATGCCTGCATAATTCTTGATGATCC	<i>KpnI-Clal</i>	

Se realiza una PCR de alta fidelidad con la enzima *Phusion* Hot Start II (Finnzymes, Espoo, Finlandia).

Tabla 2. Mix PCR alta fidelidad para amplificación de ADNg.

Primer FW 0.2 µM	} por tubo → Vol. Final: 50 µL
Primer RV 0.2 µM	
dNTPs - 1 mM	
Buffer <i>Phusion</i> 1x	
Enzima <i>Phusion</i> 0.5 µL	
Agua	



2.1 GEL DE AGAROSA.

Una vez obtenidas las amplificaciones de los exones correspondientes, se realiza un gel de agarosa de comprobación. El porcentaje de agarosa varía de acuerdo al tamaño del amplificado con el fin de obtener la mejor resolución posible de la banda.

Se emplean geles de agarosa de concentración 1%-1.5% (p/v) de agarosa en tampón TBEx1 (tris 0.1mM PH8, ácido bórico 0.09mM y EDTA 0.001mM) a los que se añade 1 μ L de RedSafe (Nucleic Acid Staining Solution 20,000x; INtRON BIO) en substitución al bromuro de etidio para detectar ADN en agarosa.

Se mezclaron las muestras de ADN con tampón de carga Green Gotaq 5x (Promega, Madison, WI) en ratio 2.5 μ L/2 μ L antes de ser introducidas en cada pocillo. Se añade un marcador de peso molecular de acuerdo al tamaño de fragmento esperado, 123/1000 pb de Invitrogén. La electroforesis se realiza a un voltaje de 100V.

Finalizada la electroforesis se visualiza el gel en un transiluminador ultravioleta, y se digitalizan las imágenes mediante el software GelDoc (BioRad, Hercules, CA), que además permite cuantificar las bandas reveladas.

2.2 PURIFICACIÓN POR COLUMNA.

Se utiliza el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI) para purificación de productos PCR (exones amplificados), para purificar productos de digestión (eliminar sales y enzimas) y para la extracción de ADN desde bandas de agarosa utilizando agarosa de bajo punto de fusión (low melting point, Pronadisa, Madrid) en la elaboración del gel correspondiente. En cada caso seguimos el protocolo recomendado por el fabricante.

2.3 DIGESTIÓN POR ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

En cada caso las concentraciones de inserto y plásmido se miden en el nanodrop. Se realiza la digestión con enzimas de restricción teniendo en cuenta que en la ligación se van a utilizar 100ng de vector y el inserto en un ratio molar 5:1 (inserto: plásmido) en todas las construcciones de los minigenes.

El vector y el exón 16 se digieren con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* (NEW ENGLAND BioLabs, Ipswich, MA), realizando una doble digestión siguiendo las instrucciones del fabricante. El MGBR1_ex16 y exón 17 se digieren en dos etapas sucesivas con *KpnI* y *XhoI* (teniendo en cuenta el suplemento de BSA en este caso, recomendación del fabricante). El MGBR1_ex16-17 y exón 15 se digieren con *EcoRI* y *BamHI* en digestiones independientes siguiendo las condiciones del fabricante, del mismo modo que se digieren MGBR1_ex15-16-17 y exones 18-19 con las enzimas *HindIII* y *KpnI* en una doble digestión con suplemento de BSA.

2.4 LIGACIÓN.

Una vez extraídas las bandas de estudio del gel de agarosa y purificadas, se emplea para cada clonación, el kit Fast-Link™ DNA Ligation Kit (Illumina, San Diego, CA) de acuerdo al protocolo del fabricante y manteniendo el ratio vector/ inserto (1/5). Se incuba a 37º, de 2h a 3h y se inactiva la reacción a 70º, 20 minutos.

2.5 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS.

Para este proceso se emplean cepas bacterianas de *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen), cuyo genotipo es: F- ϕ 80lacZΔM15 Δ (\square lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -. Se emplean 70 μ L de células competentes y 5 μ L de la ligación y se incuba 30 min en hielo, 1 min a 42º y 2 min en hielo. Tras esto añadimos 500 μ L de medio SOC e incubamos 1h—2h a 37º en estufa. Para el cultivo líquido de dichas células se empleó medio LB (Luria-Bertani) de composición 1% Triptona, 0,5% extracto de levadura 1% NaCl. Se utilizaron medios LB premezclados Agar-LB-Miller (Merck/VWR, West Chester, PA, EEUU) y Caldo-LB-Miller (Merk) para preparar las placas y los medios líquidos de cultivo. A estos medios se les añade Ampicilina a concentración final de 100 μ g/ml como método de selección de colonias.

Las placas se preparan antes de la siembra con Xgal (60 μ L) e IPTG (25 μ L), (Fermentas, Burlington, ON, Canada) para la selección de colonias. Se plaquean 100-150 μ L de bacterias y se seleccionan colonias blancas que se reestrían y se ponen en medio de cultivo líquido a 37º con agitación (250 rpm).

2.6 PCR COMPROBACIÓN DE COLONIAS.

Se realiza una PCR de rastreo de colonias para comprobar la clonación del inserto. Se emplea para ello la enzima Phire (Finnzymes, Espoo, Finlandia), los primers correspondientes de rastreo de cada exón y ADN de estudio. Se reparte la máster mix en cada tubo, y se seleccionan las colonias a ensayar. Las colonias seleccionadas, se reestrían con un asa de siembra en medio sólido en placa, y el mismo asa de siembra se incluye en el tubo de la mix puesto que una pequeña cantidad de ADN es suficiente.

Tabla 3. Mix PCR comprobación de colonias.

Buffer Phire 1x	} por tubo → Vol. Final: 20 μ L
Agua	
dNTPs - 1 mM	
Polimerasa Phire – 0.2 μ L	
Primer FW- 0.2 μ M	
Primer RV – 0.2 μ M	

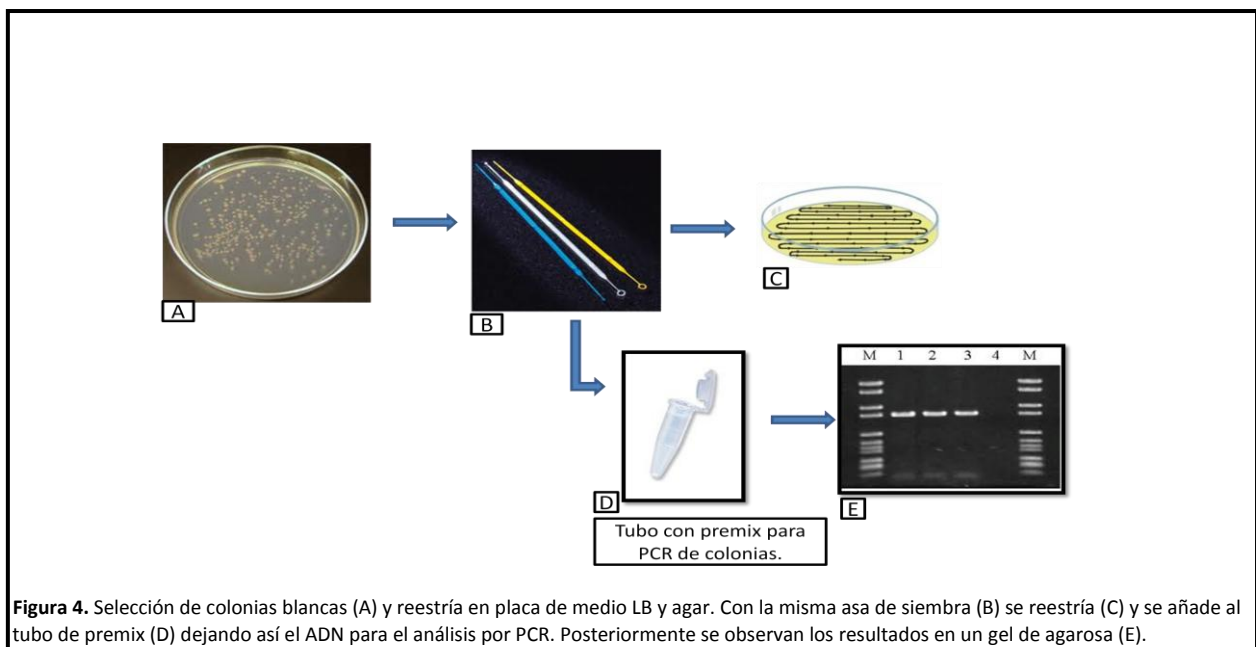


Figura 4. Selección de colonias blancas (A) y reestrija en placa de medio LB y agar. Con la misma asa de siembra (B) se reestrija (C) y se añade al tubo de premix (D) dejando así el ADN para el análisis por PCR. Posteriormente se observan los resultados en un gel de agarosa (E).

2.7 EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO.

Se emplea el kit comercial PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, Madison, WI) siguiendo las instrucciones del fabricante para obtener un volumen final de 50 µL de plásmido purificado.

3. INTRODUCCIÓN DE MUTACIONES MEDIANTE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.

El motivo de introducir las mutaciones en un minigén de construcción propia es la ausencia de muestras biológicas de pacientes para los correspondientes ensayos. Se realiza mutagénesis dirigida con una enzima de alta fidelidad (*Pfu Turbo*, Agilent, California) que introduzca las mutaciones puntuales o realice las microdeleciones seleccionadas empleando cebadores (Anexo I, Tabla 1) diseñados para tal objetivo.

Para la PCR de mutagénesis se sigue el siguiente ciclo: 94°/2min+ 16 ciclos x (94°/30seg +55°/30seg +68°/12min) +68°/20min, y posteriormente se elimina la cadena molde del plásmido con una enzima específica de ADN metilado, la *Dpn I* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 4. Mix PCR mutagénesis.	
Buffer <i>Pfu Turbo</i> 1x	} por tubo y mutación → Vol. Final: 25 µL
Enzima <i>Pfu</i> 1.5 unidades	
dNTPs – 1 mM	
Agua	
Primer FW- 0.2 µM	
Primer RV – 0.2 µM	
DNA MG_BR1_ex15-19 – 100-200 ng	

4. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HUMANAS Y EXTRACCIÓN DE ARNm PARA ANÁLISIS FUNCIONAL.

Se transfectan células humanas HeLa, linaje perteneciente a una muestra de cáncer cérvico uterino (Jones et al., 1971; Macville et al., 1999) con las distintas construcciones: el plásmido WT como control, y el

MG_BR1_ex15-19 con las diferentes mutaciones dirigidas del minigén, seleccionadas anteriormente y comprobada su fidelidad por secuenciación.

Se cultivan las células HeLa en medio DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA), con un 10% de FBS (Invitrogen), 1% de L-Glutamina (Invitrogen) y 1% de Penicilina/Estreptomicina (Invitrogen) como suplemento. Se mantienen a 37° en un incubador con 5% de CO2. Se realizaron dos subcultivos semanales; mediante tripsinización (Gibco) se despegan las células del flask general y se recoge una fracción del cultivo anterior que se resuspende en medio DMEM suplementado nuevo. Esto se realiza a intervalos regulares de tiempo.

La transfección se realiza con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del fabricante. Además se prepara medio DMEM estéril al que suplementamos con un 10% de FBS pero sin antibióticos. Tras 5h de cultivo se retira este medio, y se añade DMEM normal con FBS y antibiótico, y dejamos el cultivo en crecimiento 48h antes de la extracción de ARN.

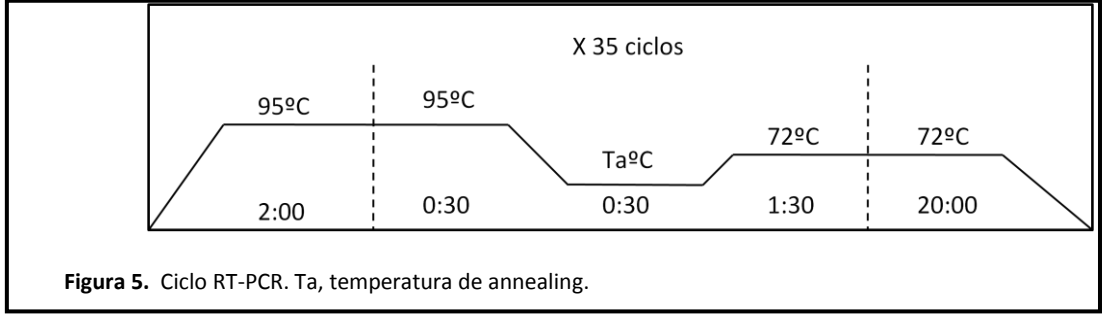
4.1 EXTRACCIÓN DE ARNm y RT-PCR.

Para la extracción del ARNm y la posterior RT-PCR para obtener el ADNc, se recogen las células transfectadas con las construcciones introducidas. Para ello se tripsinizan, se centrifugan 15min a 16g y se retira el sobrenadante. Obtenemos RNAm con el kit Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel) realizando el protocolo en una campana extractora, siguiendo las especificaciones del fabricante (<http://www.mn-net.com>). El ARNm obtenido se retrotranscribe a ADNc mediante el kit Transcriptor (Roche). Se amplifica empleando cebadores exónicos específicos para tal fin, y teniendo en cuenta que deben de anillar en la secuencia exónica del vector que se emplea. Con esto evitamos amplificar ADNc de transcritos propios derivados de las células HeLa. En el caso de que se quiera comprobar si se han transcrito todos los exones en un gel de agarosa, utilizaremos un primer RT que anille en el exón del vector, y otro que anille en el exón de estudio. Realizaremos la PCR con la enzima *Phire* siguiendo las condiciones anteriormente descritas, teniendo en cuenta las temperaturas de unión de los primers que empleamos. Para ello se emplean los siguientes cebadores.

Cebador	Secuencia 5'-3'	Amplicón MG_BR1_ex15-19
RT_ex15 FW	ACGGAAACATCTTACTTGCC	653pb
RT_pSAD RV	TGAGGAGTGAATTGGTCGAA	

Para observar el efecto de las mutaciones en el splicing, se amplifica el cDNA obtenido empleando los cebadores RT_pSAD forward y reverse, y la PCR se realiza con la enzima *GoTaq* Hot Start (Promega, Madison, WI) atendiendo a las siguientes especificaciones para un volumen final de 25 µL:

Tabla 6. Mix RT-PCR. Buffer GoTaq 1x MgCl ₂ – 2-2.5 mM dNTPs – 0.5 mM Agua Enzima GoTaq 1.5 unidades cDNA - 2 µL Primer RT RV – 0.2µM Primer RT FW 0.2 µM	} por tubo → Vol. Final 25 µL
---	----------------------------------



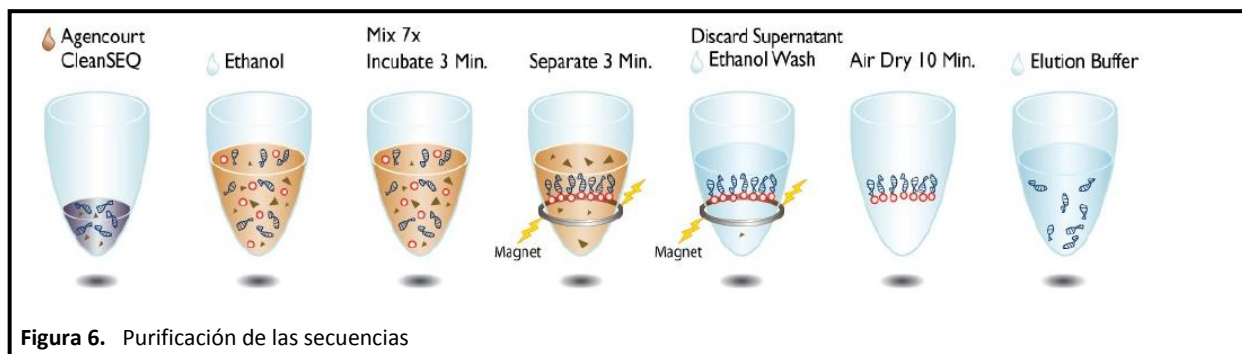
4.2 SECUENCIACIÓN POR ELECTROFORESIS CAPILAR.

El proceso de secuenciación automática se emplea para verificar cada construcción plasmídica, comprobando en cada etapa de elaboración del minigén la correcta inserción de cada exón y la fidelidad de su secuencia. Además se emplea para secuenciar las mutagénesis dirigidas antes de las transfecciones (comprobando que la mutación ha ocurrido específicamente) y una vez extraído el ARNm, para caracterizar los productos RT-PCR que hubiéramos visualizado en el gel de agarosa, pudiendo conocer las diferentes isoformas de splicing.

Las reacciones de secuencia se realizaron una vez obtenido el producto PCR y medida su concentración, con el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de secuencia se basa en una amplificación en la que se incorporan didesoxinucleótidos (ddNTPs) o terminadores de cada una de las 4 bases nitrogenadas que impiden la elongación por la polimerasa. Estos terminadores se marcan con 4 fluorocromos diferentes, uno para cada base nitrogenada, de manera que podamos identificar cada base con la que terminan los distintos fragmentos, al ser estos estimulados por un láser, por el color del fluorocromo correspondiente. La reacción de secuencia se lleva a cabo en un termociclador siguiendo las siguientes etapas: 96º/1min + 25 ciclos x (96º/10seg + Ta/10seg + 60/4min) + 4º/indefinido.

Tras esto se purifican las secuencias de estudio. Este paso se basa en la precipitación de la reacción de secuencia donde se eliminan los reactivos sobrantes de la reacción y otras moléculas que puedan interferir

en la lectura del secuenciador. Para ello se emplea el kit AGENCOURT® CLEANSEQ® (Agentcourt Bioscience Corporation, Beverly, Massachusetts). Con esta tecnología, los ácidos nucleicos se unen selectivamente a bolas paramagnéticas en presencia de sales caotrópicas mientras que el resto de los contaminantes son eliminados de la muestra. Los ácidos nucleicos purificados (unidos a las bolas paramagnéticas) se eluyen de la solución en condiciones de baja salinidad.

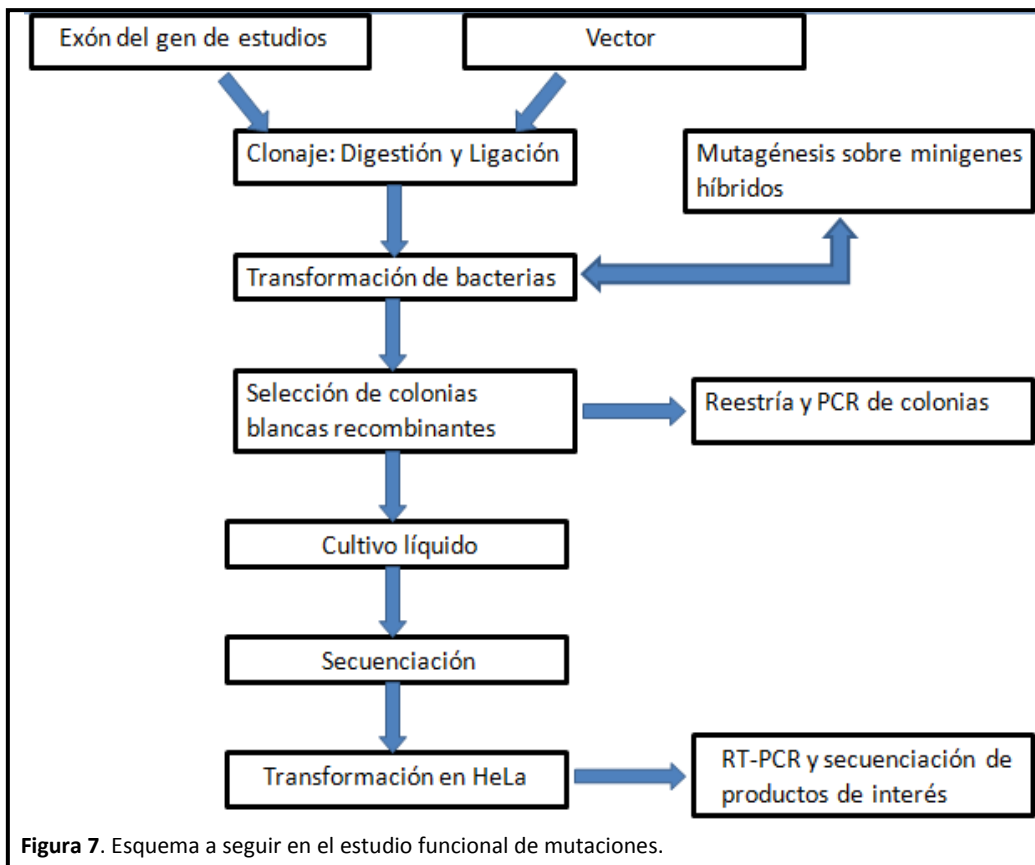


La carrera electroforética capilar se lleva a cabo en un secuenciador automático ABI Prism® 3130 (Applied Biosystems) con capilares de 36 cm, utilizando POP-7 (Applied Biosystems) como polímero de electroforesis y tampón de carrera con EDTA x 1 (Applied Biosystems).

Tabla 6. Condiciones de carrera de la electroforesis capilar para secuenciación

Parámetros	Valor
Temperatura del horno	50 °C
Voltaje de inyección	1 Kvolts
Tiempo de inyección	22 segundos
Voltaje de carrera	12,2 Kvolts
Tiempo de carrera	6.500 segundos

Los datos de secuencia son recogidos a través del programa Data Collection v.3.0 (Applied Biosystems) y analizados con el programa Sequencing Analysis Software 5.2. (Applied Biosystems). Los cromatogramas de secuencia fueron visualizados con el programa Chromas 2.3. (Technelisyum, Tewantin, Australia).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Existe una gran cantidad de mutaciones clasificadas como variantes de efecto desconocido en la base de datos del BIC, así como mutaciones que según las herramientas bioinformáticas podrían predisponer a cáncer de mama u ovario. En este trabajo se presenta un estudio *“in silico”* y funcional de mutaciones de pacientes seleccionadas de Castilla y León, y de variantes de ADN del exón 16 de *BRCA1* reportadas en pacientes CMOH de Castilla y León y en las bases de datos internacionales con los programas descritos en el apartado de materiales y métodos. De las que se seleccionaron aquellas que cumplían alguno de los siguientes criterios: interrupción de sitios canónicos de splicing, ruptura de puntos de ramificación o creación de silenciadores *de novo*.

1. CONSTRUCCIÓN DEL MINIGÉN 15-19.

Los análisis bioinformáticos no son suficientes para la clasificación de mutaciones teniendo que corroborarlos con estudios funcionales en el laboratorio.

Dado que solo se cuenta con muestra de ARN de la paciente portadora de la variante c.4812A>G del exón correspondiente a una de las mutaciones seleccionadas de Castilla y León, para el estudio del resto de mutaciones se empleó la tecnología de los minigenes híbridos a partir de un plásmido original específico para ensayos funcionales de splicing. En éste se clonaron de manera progresiva los exones 16, 17, 15 y 18-19 con enzimas de restricción, de manera que se logró crear un entorno genómico más adecuado para el ensayo funcional de las mutaciones del exón 16, objeto de este estudio.

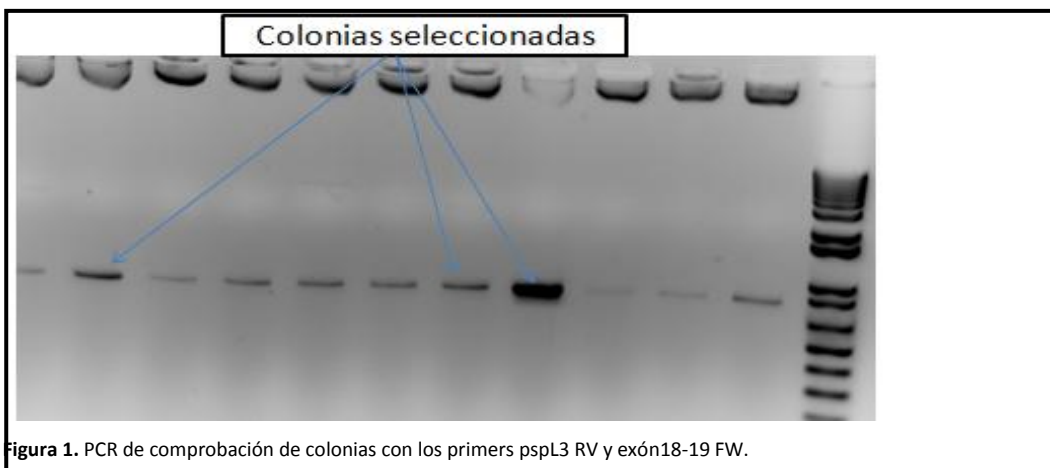
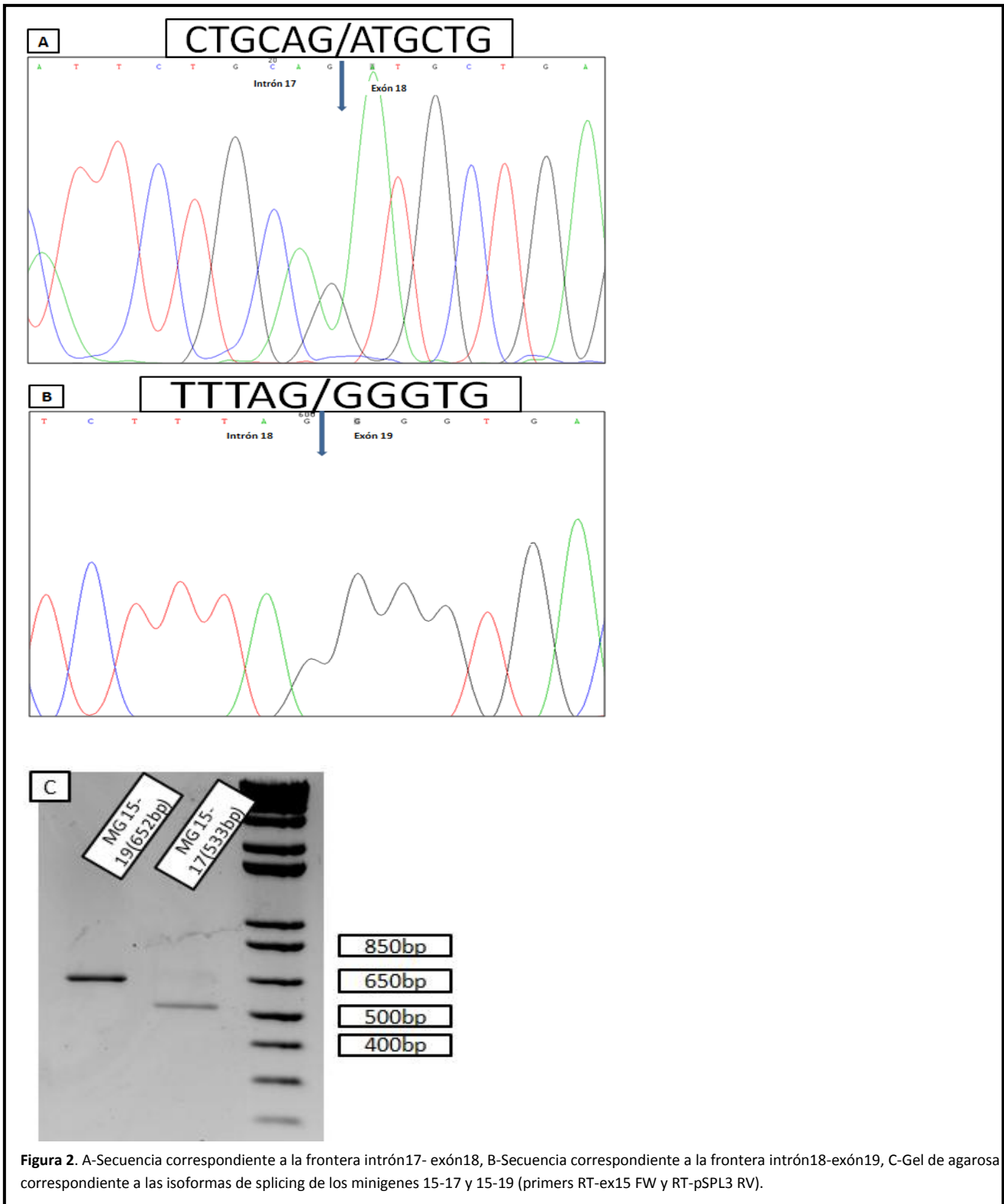


Figura 1. PCR de comprobación de colonias con los primers pspL3 RV y exón18-19 FW.

La construcción del minigén se realiza de forma secuencial añadiendo los exones 16, 17, 15 y 18-19 (en este orden), y comprobando en cada paso las colonias que contienen el constructo y las secuencias de los mismos (Anexo I, Figura 1). En el caso del minigén empleado, en cada una de las etapas de clonaje de exones se seleccionaron 3 colonias (según la densidad de la banda amplificada) que fueron rastreadas mediante PCR, y será con estas construcciones con las que se continúe el estudio tras su secuenciación y la comprobación de que están las secuencias correspondientes a los diferentes exones.



Una vez que obtenemos nuestro minigén y se comprueba que se sintetiza el ARNm correctamente (Figura 2c), no se necesita material adicional (como el ARNm de pacientes), lo cual supone una ventaja esencial dado que no es fácil conseguir muestras de pacientes, y además evitamos artefactos de la manipulación o conservación del ARN de muestra. Sobre el constructo podremos introducir cualquier mutación real o teórica mediante mutagénesis dirigida y observar su efecto en el splicing. Más aún el minigén permite el análisis de un alelo aislado permitiendo cuantificar fácilmente las diferentes isoformas de

ARNm generadas por una variante de ADN. Por tanto, la mutagénesis dirigida y la transfección en células HeLa hacen de esta una herramienta fiable y sencilla para el análisis de posibles patrones de splicing aberrantes, básico en el estudio de enfermedades genéticas. También tiene ciertas desventajas dado que se pierde el contexto genómico del gen de estudio (aunque se intenta salvar con la adición de exones colindantes al de estudio), la expresión del gen ocurre desde un promotor diferente al promotor natural del gen, y por tanto varían su nivel de expresión y su velocidad de transcripción, la última de las cuales influye en el proceso de splicing.

2. EFECTOS DE LAS MUTACIONES EN EL PROCESO DE SPLICING.

Se realizó un estudio bioinformático de las mutaciones de las bases de datos citadas y de las artificiales mediante los software disponibles en la red, y los resultados predictivos del efecto en el splicing se recogen en la tabla 1.

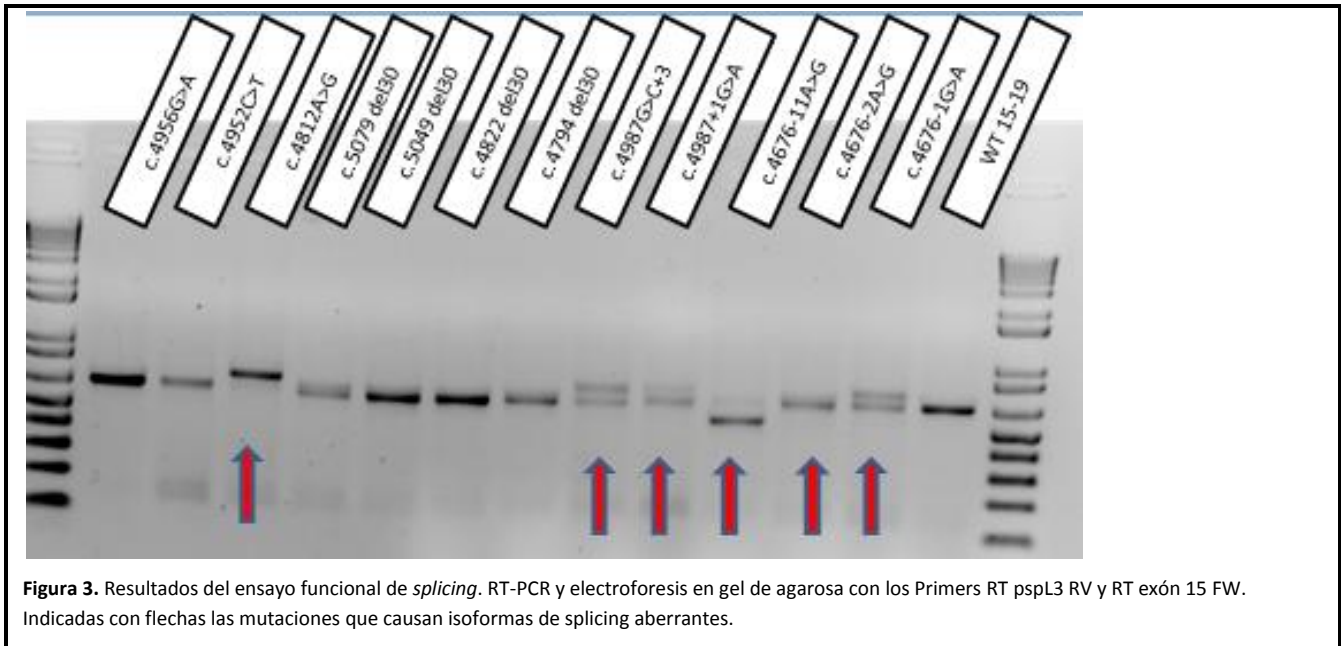
Dado que no es posible obtener ARN mensajero de muestras biológicas de pacientes portadoras de mutaciones del exón 16 de *BRCA 1* descritas en el BIC o la UMD, se procedió a realizar mutagénesis dirigida sobre el minigén híbrido construido, empleando oligonucleótidos diseñados en el laboratorio y que incluían la mutación que deseamos introducir (las seleccionadas y las creadas *de novo*).

Posteriormente se transfectan células HeLa con cada una de las construcciones y se extrajo el ARNm 48h después de transfectar para caracterizar los efectos de las mutaciones en el splicing por RT-PCR.

Tabla 1. Análisis bioinformático y resultados de las mutaciones de *splicing* del exón 16 de *BRCA1*.¹Nomenclatura de las mutaciones en los niveles de ADN, ARN y proteínas sigue las pautas de la *Human Genome Variation Society* (HGVS).²Resumen del análisis bioinformático con NNSPLICE y HSF: [-], Interrupción; [+], Creación. ESE; ESS; BP, punto de ramificación (*branch point*).³ Se describen las principales isoformas. El minigén híbrido produce solo la isoforma de splicing *wt*. Las variantes con una fracción relevante de transcrito canónico se muestran en cursiva (SP: *Splicing normal*)).

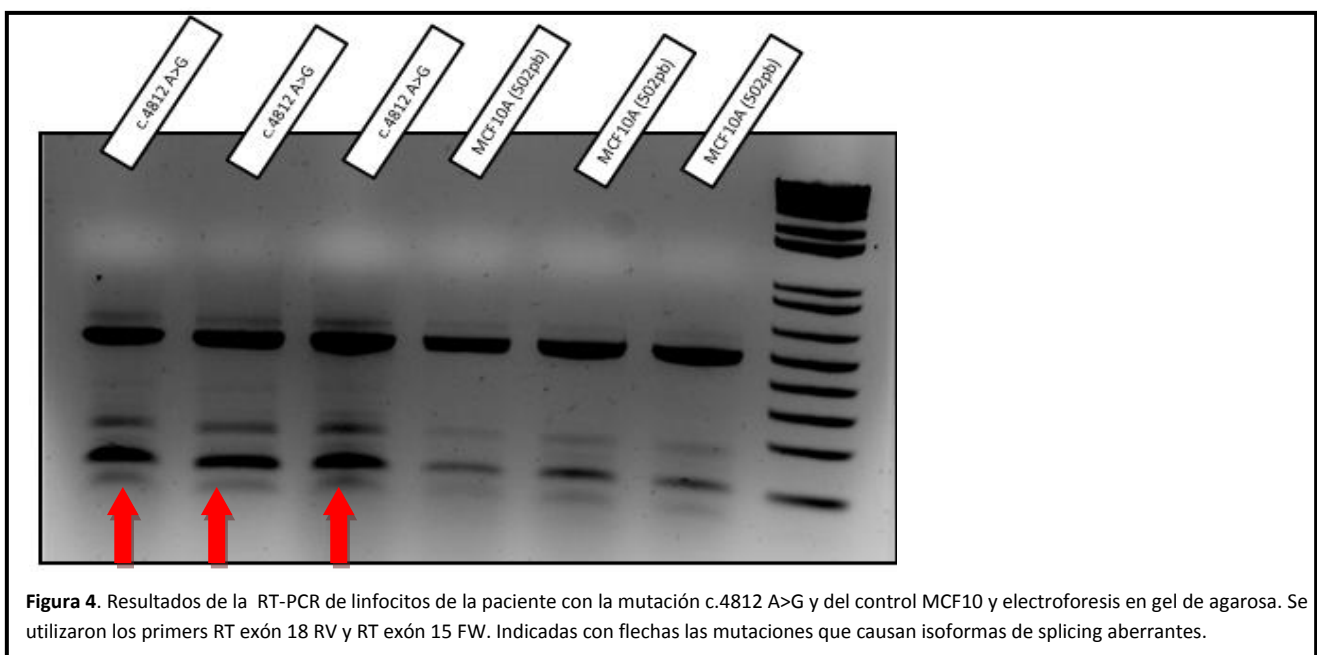
MUTACION (HGVS) ¹	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO ²	RESULTADO DE SPLICING ³	EFEECTO PREDECIBLE EN LA PROTEÍNA ¹ (HGVS)
Ex_16 BRCA1			
c.4987+3G>C	[-]sitio donador canónico	Retención de 65 nucleótidos IVS 16.	
c.4987+1G>A	[-]sitio donador canónico; [-]ESE; [+]hnRNPA1	Retención de 65 nucleótidos IVS 16.	
c.4676-2A>G	[+]hnRNPF; [-]SRP40		
c.4676-1G>A	[+]hnRNPF	Sitio donador alternativo	
c.4797del30	-		
c.4822del30	-		
c.4930del30	-		
c.4955del30	-		
c.4823C>T	[-]ESE; [-]PESE		<i>p. Ala1608Val</i>
c.4837A>G	[-]SF2; [-]SRp40		<i>p. Ser1613Gly</i>
c.4952C>T	[-]SF2; [+]IIE		<i>p. Ser1651Phe</i>
c.4956G>A	[+]hnRNP A1; [-] SF2		<i>p. Met1652Ile</i>

De las 14 mutaciones ensayadas (datos no mostrados de c.4823C>T y c.4837A>G), 6 presentaron patrones de splicing diferentes al del *wild type* cuando se amplificó por RT-PCR y se visualizó en un gel de agarosa (Figura 3).



2.1 Mutaciones de pacientes de Castilla y León.

Se estudiaron 3 mutaciones que corresponden a pacientes de CM (c.4652C>T, c.4659G>A y c.4812A>G) y se realizó un estudio bioinformático y funcional mediante RT-PCR de linfocitos (c.4812A>G) o minigenes híbridos (c.4652C>T y c.4659G>A). Solo la mutación c.4812A>G presenta un patrón de *splicing* aberrante. Los estudios en el minigén 15-19 no pudieron efectuarse ya que la mutagénesis provoca una duplicación artefactual en el exón 16 de 82 nt. El estudio desde ARNm de la paciente, mostró un patrón de bandas aberrante respecto al ARNm de MCF10A tomadas como control. Se observó en el gel un enriquecimiento de las isoformas de 101 pb y 191 pb que corresponden al skipping de los exones 16+17 o 16 solo, respectivamente.



Cuando se realiza el estudio de fragmentos por electroforesis capilar, realizando la RT-PCR con uno de los primers marcado con el fluorocromo FAM, se observó un enriquecimiento de las isoformas antes descritas que cuantificamos teniendo en cuenta el área de los picos y los porcentajes respecto de la suma total de todos los picos. Los datos se recogen en la Tabla 2 del Anexo 1.

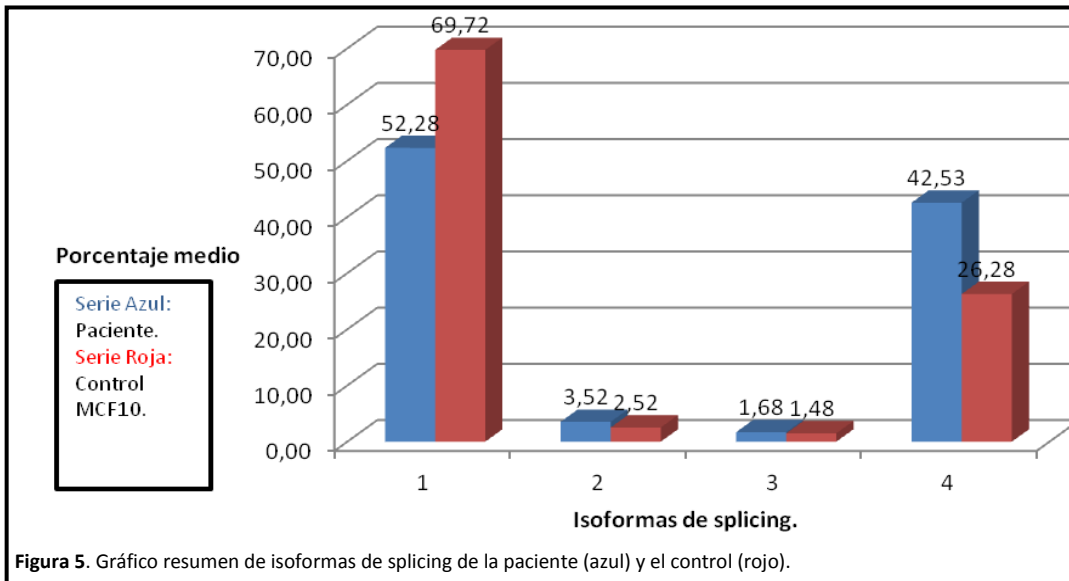


Figura 5. Gráfico resumen de isoformas de splicing de la paciente (azul) y el control (rojo).

En la siguiente figura podemos ver las diferencias en el área de los picos entre la paciente con la mutación c.4812A>G y el control.

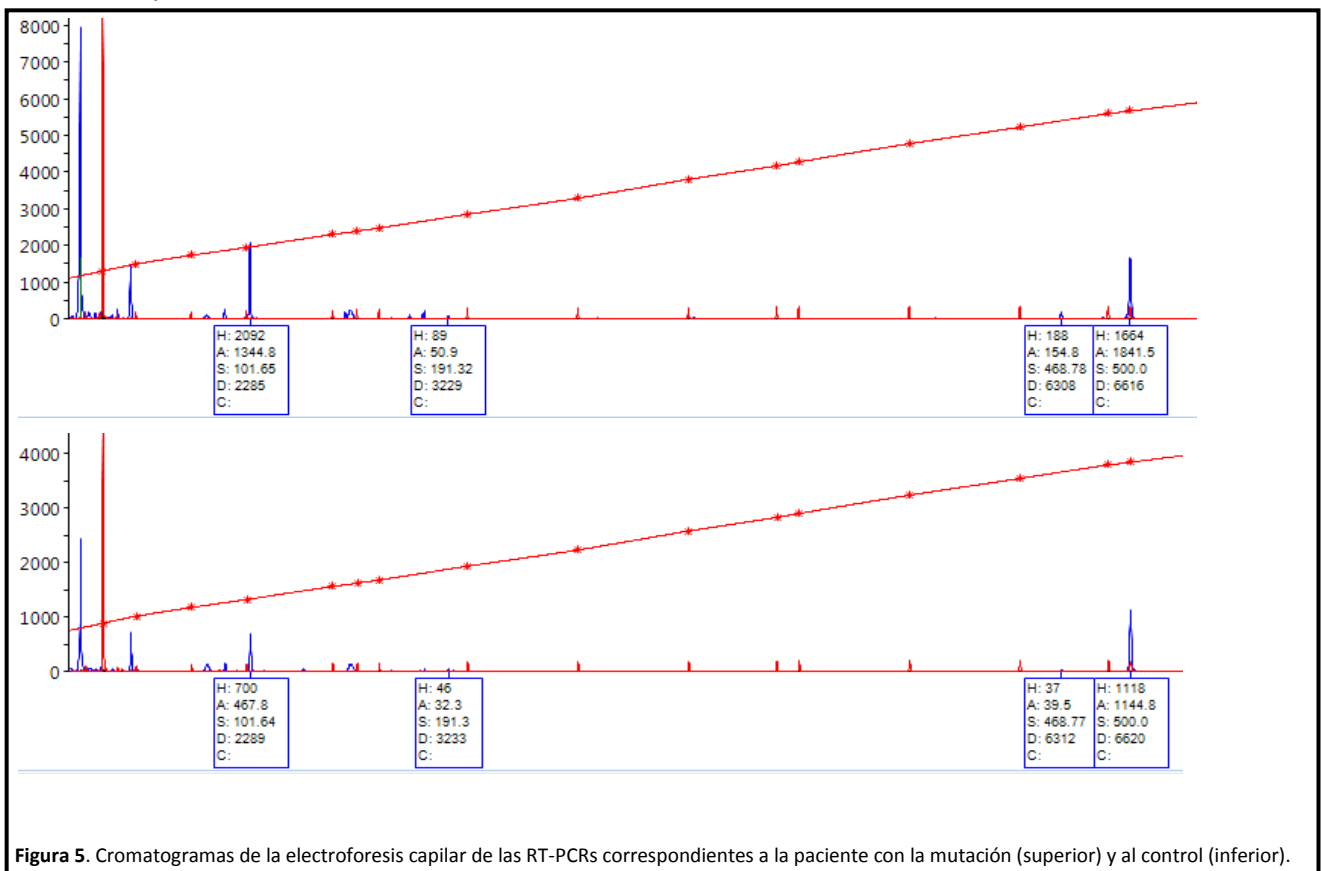


Figura 5. Cromatogramas de la electroforesis capilar de las RT-PCRs correspondientes a la paciente con la mutación (superior) y al control (inferior).

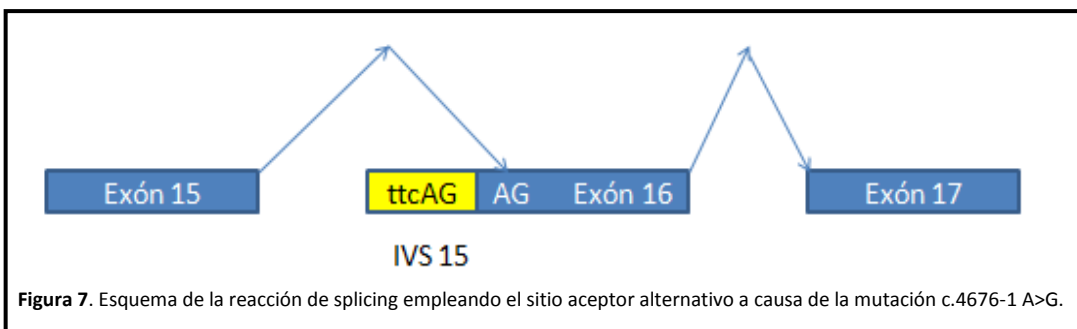
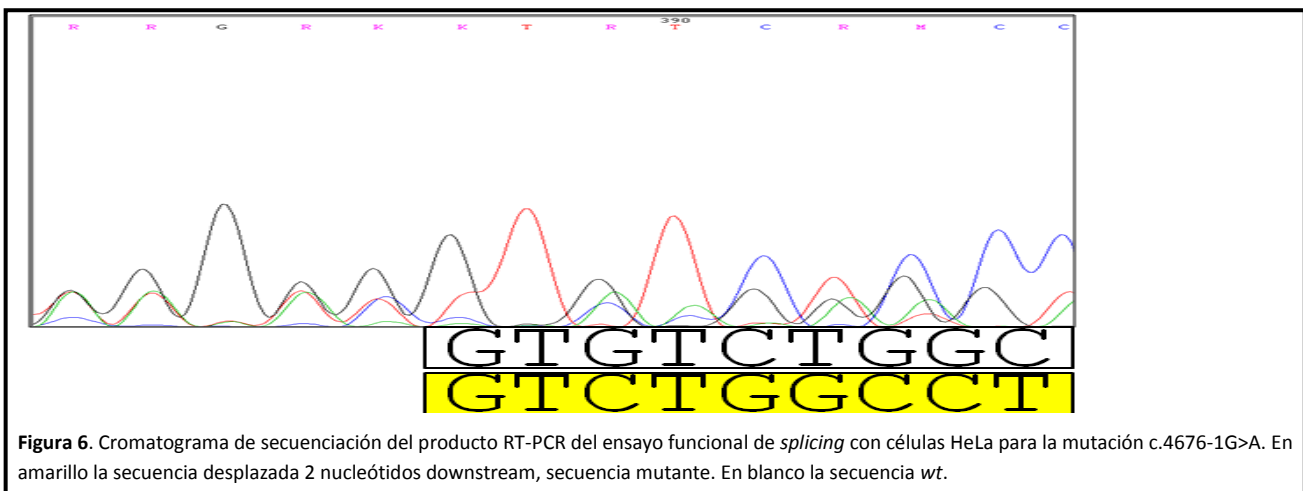
Las diferentes isoformas se corresponden con el alelo *wt* (502pb), una delección de 31 nt que podría corresponderse con el reconocimiento de un aceptor alternativo del exón 16 detectado por el algoritmo HSF

únicamente (con un score alto comparándolo con el sitio natural), la pérdida del exón 16 (191pb) y del exón 16+17 (101pb).

Esta mutación sinónima p.Q1604Q aparece clasificada como variante polimórfica en las bases de datos internacionales de mutaciones, pero de acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro laboratorio podríamos concluir que dicha mutación tiene un importante efecto en el splicing puesto que se observa en la paciente un enriquecimiento de las isoformas alternativas que codifican para los dominios AD2 y BRCT de BRCA1 esenciales para su funcionalidad. En este contexto, la variante c.4812A>G podría considerarse un alelo de baja penetrancia en el cáncer de mama hereditario aunque se necesitan estudios adicionales para confirmar esta hipótesis.

2.2 Mutación c.4676-1 A>G.

La mutación del sitio aceptor del exón 16 según el análisis bioinformático afecta a un nucleótido esencial del sitio aceptor y también crea un silenciador nuevo del tipo hnRNP, lo cual podría implicar que la maquinaria de splicing no reconociera el sitio canónico aceptor puesto que la secuencia mutante promovería la unión de un elemento en *cis* inhibidor del splicing. Mediante una electroforesis en gel vemos enriquecida una banda superior a la banda del minigén "wt". Mediante la secuenciación de la muestra RT-PCR pudimos comprobar que el efecto provocado es el reconocimiento de un sitio aceptor críptico que se encuentra 2 nt *upstream* del natural, que corresponde con los 2 primeros nucleótidos del exón. Como vemos en la siguiente figura, toda la secuencia se encuentra desplazada dos bases hacia la izquierda. La pérdida de estos 2 nt provoca un cambio en la pauta de lectura y por tanto, un codón stop prematuro dando lugar a una proteína truncada. Estos resultados sugieren que esta mutación está implicada en la etiopatogenia del CMOH.



2.3 Mutación c. 4987+3 G>C.

El cambio en la posición +3 del intrón 16, según el estudio bioinformático provoca la ruptura del sitio donador canónico y aumenta la fuerza de un sitio críptico. El efecto observado en el gel de agarosa es la presencia de una banda superior a la del wild type, lo que en la secuencia se corresponde con una retención de 65 nucleótidos del intrón 16. Nuevamente, la inserción de 65 nt causa un cambio en la pauta de lectura y una proteína truncada, por lo que esta variante podría ser clasificada como patogénica.

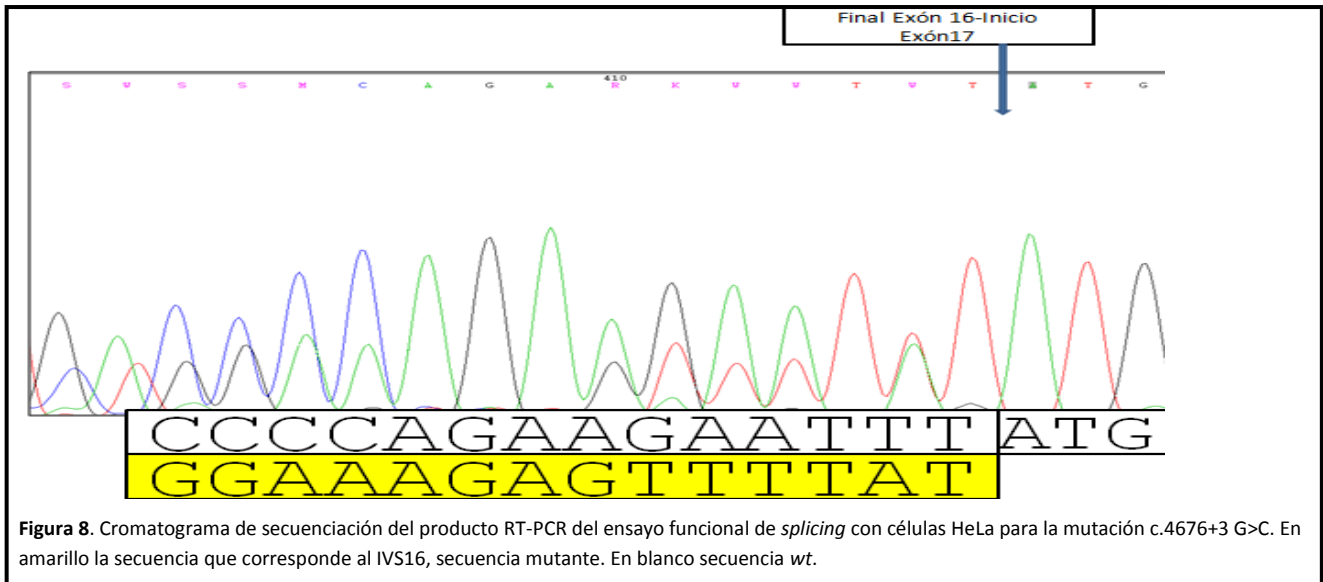


Figura 8. Cromatograma de secuenciación del producto RT-PCR del ensayo funcional de *splicing* con células HeLa para la mutación c.4676+3 G>C. En amarillo la secuencia que corresponde al IVS16, secuencia mutante. En blanco secuencia wt.

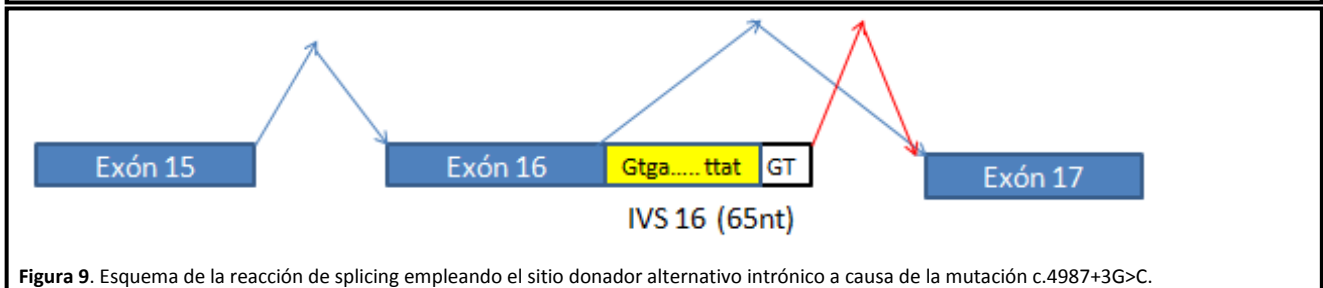


Figura 9. Esquema de la reacción de *splicing* empleando el sitio donador alternativo intrónico a causa de la mutación c.4987+3G>C.

2.4. Mutación 4987+1 G>A.

La mutación c.4987+1 G>A situada en el sitio donador del exón 16 de BRCA1, se trata de una mutación intrónica catalogada en el BIC como mutación de *splicing* y de importancia clínica demostrada. Según el análisis bioinformático, la mutación causaba la eliminación del sitio donador del exón 16 detectado por NNSplice, la ruptura de un elemento enhancer y la creación de un silenciador en la misma ubicación de la mutación. Se comprobó por medio de la secuenciación del producto de RT que dicha mutación inducía la retención de una parte del intrón 16, tomando como sitio donador alternativo el par GT del intrón 16 que sigue a la secuencia de 65nt retenida. Como en el caso de la mutación c.4987+3G>C, esta inserción provoca un cambio en la pauta de lectura que generará una proteína truncada. En consecuencia, c.4987+1G>A podría clasificarse como una variante deletérea.

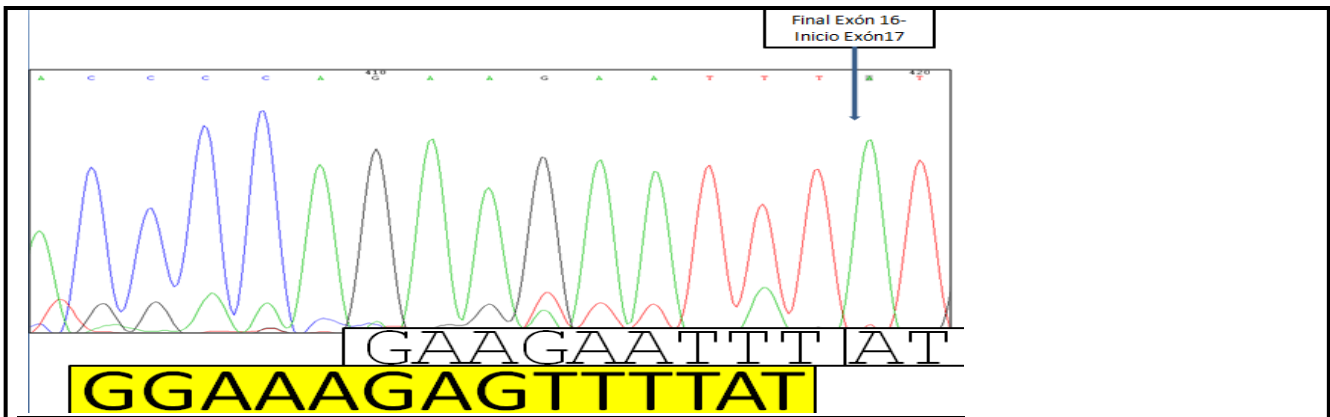


Figura 10. Cromatograma de secuenciación del producto RT-PCR del ensayo funcional de *splicing* con células HeLa para la mutación c.4987+1 G>A. En amarillo la secuencia que corresponde al IVS16, secuencia mutante. En blanco secuencia wt.

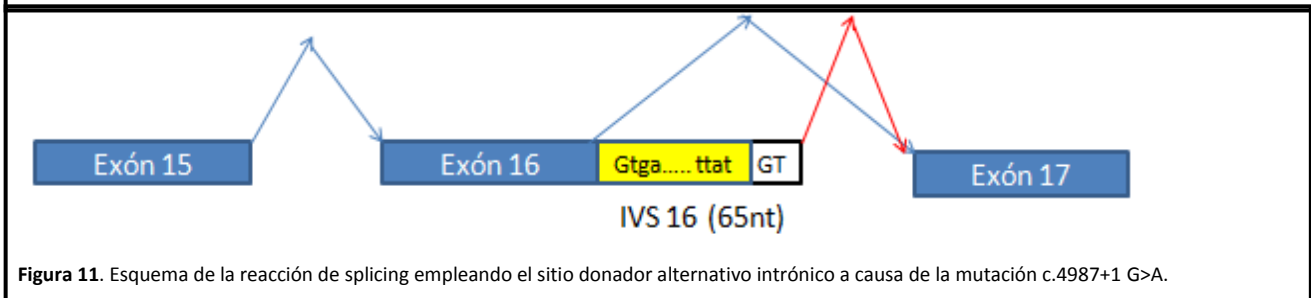


Figura 11. Esquema de la reacción de *splicing* empleando el sitio donador alternativo intrínico a causa de la mutación c.4987+1 G>A.

2.5 Mutaciones artificiales. Microdeleciones.

Con el fin de mapear posibles secuencias reguladoras de *splicing*, se realizaron 4 microdeleciones solapantes artificiales de 30 nucleótidos (2 al inicio del exón y 2 al final del mismo) con primers complementarios a los bordes de la deleción respetando los primeros 2 nt y los 3 últimos del exón dada su importancia para el reconocimiento de los sitios aceptor y donador, respectivamente. Con esto se pretende mapear elementos potenciadores o silenciadores del *splicing* que intervengan en *cis* reconociendo secuencias que se encuentren al inicio o al final del exón 16 y que sean claves para su inclusión en el ARN mensajero maduro. De este modo cabría esperar, que al mutar alguna de estas secuencias críticas, el factor de *splicing* no se uniría dando lugar a patrones de *splicing* aberrantes.

En nuestro caso tanto los resultados no mostraron ningún tipo de anomalía ya que en el gel de agarosa como en las secuencias mostraron sólo la deleción de los 30nt (por lo que se ven las bandas por debajo del control) pero sin ningún efecto adicional en el patrón de *splicing* (Anexo I, Figuras 2 y 3), sugiriendo que el reconocimiento del exón 16 por parte de la maquinaria de *splicing* no precisa de dichas secuencias reguladoras.

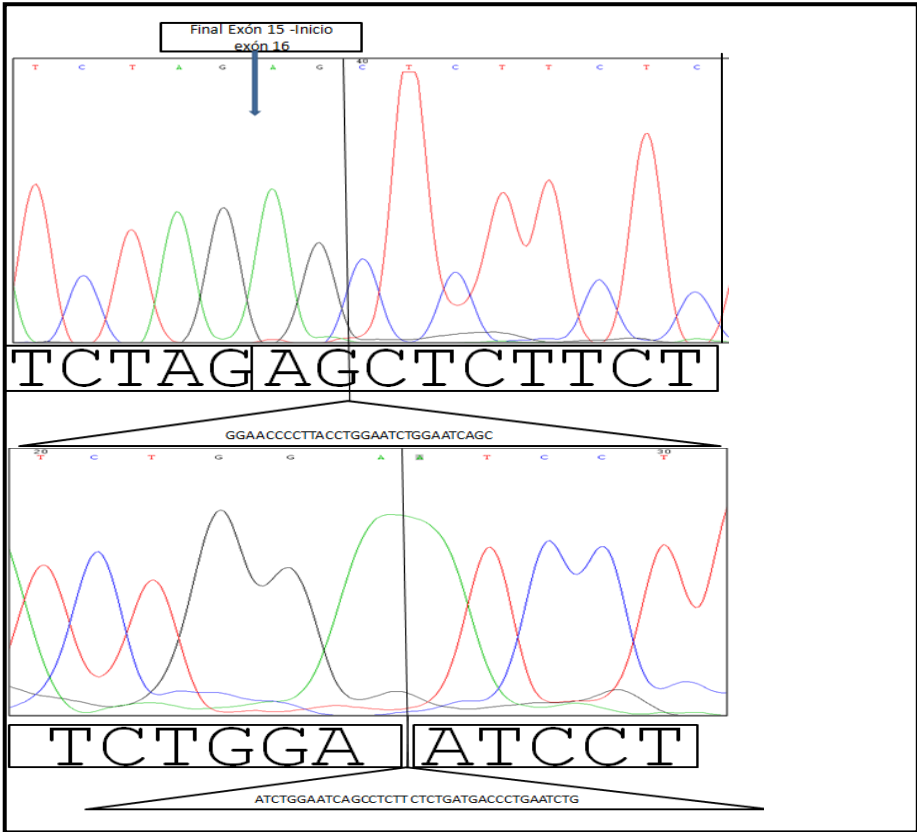
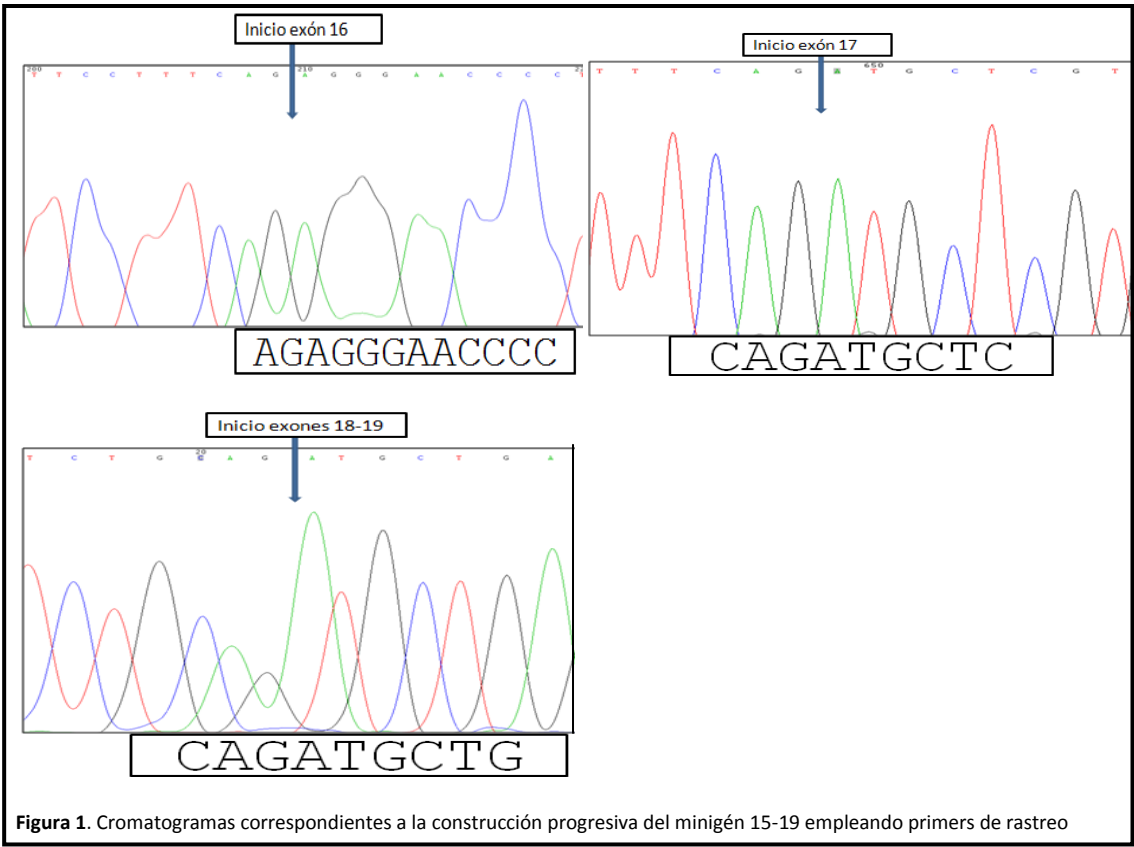
CONCLUSIONES.

- I. La variante sinónima c.4812A>G (p. Q1604Q) de la paciente CYL-1348 provoca una alteración parcial del procesamiento del exón 16 en linfocitos consistente en el incremento relativo de las isoformas con pérdida del exón 16, del exón 16+17 y el reconocimiento de un sitio aceptor alternativo 31nt downstream del natural. Por este motivo, podría constituir un alelo de bajo riesgo en cáncer de mama y ovario hereditario. La misma variante analizada en el sistema de minigenes híbridos causa una duplicación artefactual de 82 nucleótidos generada en el proceso de mutagénesis dirigida. Este resultado además indica que cualquier tipo de mutación, incluso las sinónimas o silenciosas clasificadas a priori como polimorfismos, pueden alterar el splicing, y pueden estar asociadas con el desarrollo de una enfermedad.
- II. El minigén con los exones 15, 16, 17, 18 y 19 y secuencias intrónicas flanqueantes construido en un vector de splicing derivado del pSPL3 funciona correctamente en células HeLa produciendo un ARNm del tamaño esperado (709 nucleótidos).
- III. Las variantes c.4676-1 A>G, c. 4987+3 G>C y c.4987+1 G>A del exón 16 del gen BRCA1 dan lugar a patrones de splicing aberrantes y con toda probabilidad pueden clasificarse como variantes patogénicas en cáncer de mama y ovario. La modificación de los patrones de splicing fisiológicos puede ser considerada como un mecanismo primario de patogenicidad en esta enfermedad.
- IV. Existen diferentes tipos de elementos reguladores implicados en las alteraciones de splicing. Aparte de las clásicas variantes de los sitios naturales aceptor (c.4676-1G>A) y donador (c.4987+1G>A y c.4987+3G>C), el análisis bioinformático ha detectado variantes candidatas que afectarían al punto de ramificación del exón 16 (c.4676-11A>G), y a la eliminación de enhancers (c.4823C>T) y creación de silenciadores (c.4952C>T y c.4954G>A) de splicing.
- V. El objetivo final de estos estudios es la mejora del estilo de vida de las pacientes y sus familias dado que pueden acogerse a nuevas medidas preventivas, de vigilancia o profilaxis; ventajas que se relacionan directamente con una mejor caracterización molecular de los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad de estudio.

ANEXOS

Tabla 1. Cebadores mutagénesis exón 16, MG_BR1_ex15-19.

Mutación	Cebador	Secuencia
c.4678_4707del	MDBR1_ex16_4797d e130-FW	TAAACTTCTCCCATTCCTTTTCAGAGCTCTTCTCTGATGACCCTGAATCTG
	MDBR1_ex16_4797d e130-RV	CAGATTCAGGGTCATCAGAGAAGAGCTCTGAAAGGAATGGGAGAAGTTTA
c.4703_4732del	MDBR1_ex16_4822d e130-FW	GGAACCCCTTACCTGGAATCTGGAAATCCTTCTGAAGACAGACCCCCAGA
	MDBR1_ex16_4822d e130-RV	TCTGGGGCTCTGTCTTCAGAAGGATTTCCAGATTCAGGTAAGGGGTTCC
c.4930_1959del	MDBR1_ex16_5049d e130-FW	GAAGCCAGAATTGACAGCTTCAACAGTGTCTGGCCTGACCCAGAGAAGAT
	MDBR1_ex16_5049d e130-RV	ATTCTTCTGGGGTCAGGCCAGACACTGTTGAAGCTGTCAATTCTGGCTTC
c.4955_4984del	MDBR1_ex16_5074d e130-FW	GAAAGGGTCAACAAAAGAATGTCCATTGTGAGTGTATCCATATGTATCTC
	MDBR1_ex16_5074d e130-RV	GAGATACATATGGATACACTCACAATGGACATTCTTTTGTGACCCTTTC
c.4676-1 G>A	MDBR1_c. 4676-1G >A-FW	CTTCTCCCATTCCTTTCAAAGGGAACCCCTTACC
	MDBR1_c. 4676-1G >A-RV	GGTAAGGGGTTCCCTTTGAAAGGAATGGGAGAAG
c.4676-2 A>G	MDBR1_c. 4676-2A >G-FW	ACTTCTCCCATTCCTTTTCGGAGGGAACCCCTTAC
	MDBR1_c. 4676-2A >G-RV	GTAAGGGGTTCCCTTCGAAAGGAATGGGAGAAGT
c.4676-11 A>G	MDBR1_c. 4856-11 A>G-FW	TAAATTAACCTTCTCCCGTTCTTTTCAGAGGGAA
	MDBR1_c. 4856-11 A>G-RV	TTCCCTCTGAAAGGAACGGGAGAAGTTTAATTTA
c.4986+1 G>A	MDBR1_c.4986+1G> A-FW	TGACCCAGAGAAGATTTATGAGTGTATCCATATG
	MDBR1_c.4986+1G> A-RV	CATATGGATACACTCATAAATTCCTTCTGGGGTCA
c.4986+3 G>C	MDBR1_c. 4986+3 G>C-FW	TGACCCAGAGAAGATTTGTGAGTGTATCCATATGTATC
	MDBR1_c. 4986+3 G>C-RV	GATACATATGGATACACTGACAAATTCCTTCTGGGGTCA
c.4812 A>G	MDBR1_c.4812A>G-FW	GCATTGAAAGTTCCCCAGTTGAAAGTGCAGAATC
	MDBR1_c.4812A>G-RV	GATTCTGCAACTTTCAACTGGGGAACCTTCAATGTC
c.4823 C>T	MDBR1_c.4823C>T-FW	TCCCAATTGAAAGTTGTAGAATCTGCCAGAGTCCAGCT
	MDBR1_c.4823C>T-RV	AGCTGGACTCTGGGCAGATTCTACAACCTTCAATTGGGGA
c.4837 A>G	MDBR1_c.4837A>G-FW	TTGCAGAATCTGCCAGGGTCCAGCTGCTGCTCAT
	MDBR1_c.4837A>G-RV	ATGAGCAGCAGCTGGACCCTGGGCAGATTCGCAA
c.4952 C>T	MDBR1_c.4952C>T-FW	GGTCAACAAAAGAATGTTTCATGGTGGTGTCTGGCCT
	MDBR1_c.4952C>T-RV	AGGCCAGACACCACCATGAACATTCCTTTTGTGACC
c.4956 G>A	MDBR1_c.4956G>A-FW	ACAAAAGAATGTCCATAGTGGTGTCTGGCCTGACC
	MDBR1_c.4956G>A-RV	GGTCAGGCCAGACACCACCTATGGACATTCCTTTTGT



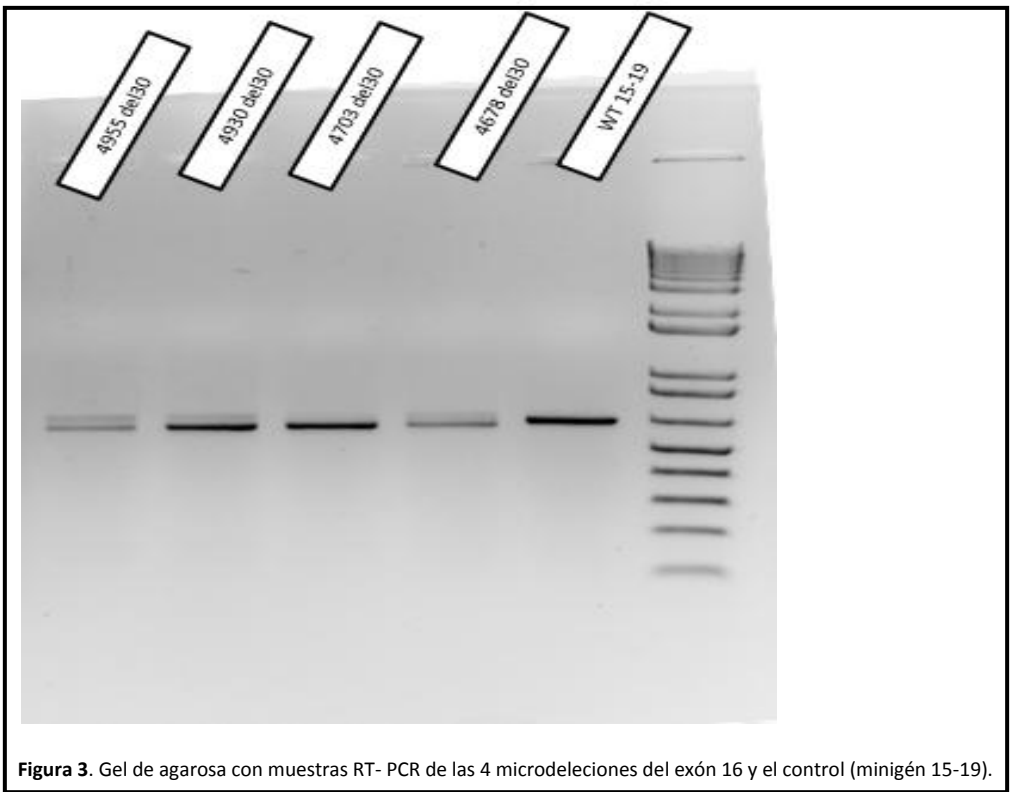
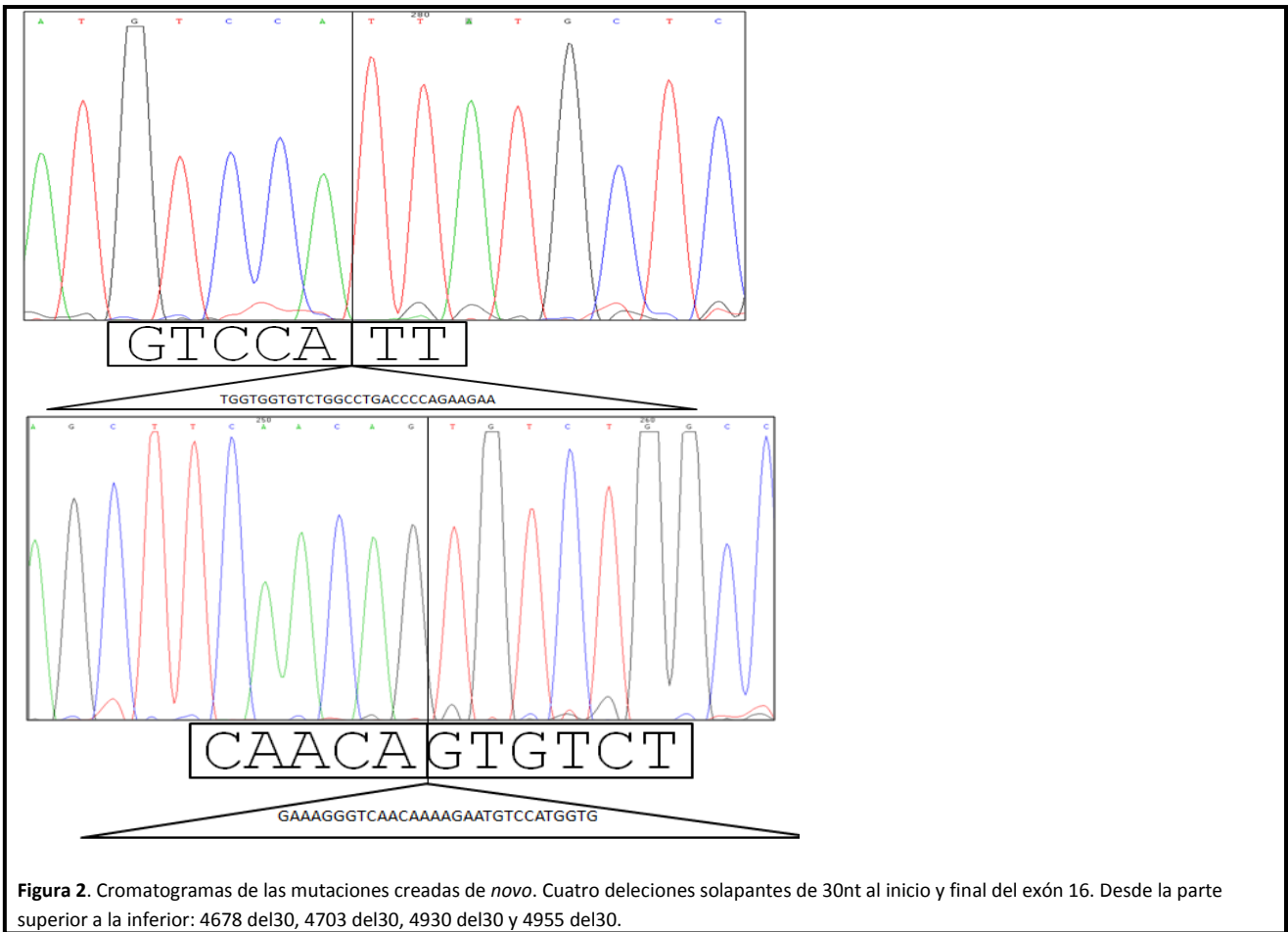


Tabla 2. Medidas de las áreas de las distintas isoformas de splicing de la muestra de la paciente con la mutación 4812 y del control. Porcentajes relativos de enriquecimiento de las distintas isoformas respecto del total.

	WT	EX16del31	Skipping EX16	Skipping EX16+EX17	TOTAL
4812a	5520	96	159,7	3962,3	9738
	56,69	0,99	1,64	40,69	
4812b	1388,1	121,4	50,8	1302	2862,3
	48,50	4,24	1,77	45,49	
4812c	956,4	82,3	34,6	853	1926,3
	49,65	4,27	1,80	44,28	
4812d	1841,5	154,8	50,9	1344,8	3392
	54,29	4,56	1,50	39,65	
MCF10Aa	3931	157,3	29,6	1308,2	5426,1
	72,45	2,90	0,55	24,11	
MCF10Ab	1144,8	39,5	32,3	467,8	1684,4
	67,96	2,35	1,92	27,77	
MCF10Ac	4645,1	160,4	127,9	2077,4	7010,8
	66,26	2,29	1,82	29,63	
MCF10Ad	3550	124,4	80,6	1160,1	4915,1
	72,23	2,53	1,64	23,60	
Media 4812	2426,50	113,63	74,00	1865,53	4479,65
Med. MCF10	3317,73	120,40	67,60	1253,38	
MEDIA % 4812	52,28	3,52	1,68	42,53	
MEDIA %MCF10	69,72	2,52	1,48	26,28	
4812 A>G	9706	454,5	296	7462,1	17918,6
MCF10A	13270,9	481,6	270,4	5013,5	19036,4
%Totales 4812	54,17	2,54	1,65	41,64	
%Totales MCF10A	69,713	2,5299	1,420436637	26,33638713	

BIBLIOGRAFÍA.

- Acedo A, Sanz DJ, Duran M, Infante M, Perez-Cabornero L, Miner C, Velasco EA (2012) Comprehensive splicing functional analysis of DNA variants of the BRCA2 gene by hybrid minigenes. *Breast Cancer Res* 14:R87
- Ast G (2004) How did alternative splicing evolve? *Nat Rev Genet* 5:773-782
- Black DL (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72:291-336
- David CJ, Manley JL (2010) Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes Dev* 24:2343-2364
- Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C (2009) Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 37:e67
- Duran M, Esteban-Cardenosa E, Velasco E, Infante M, Miner C (2003) Mutational analysis of BRCA2 in Spanish breast cancer patients from Castilla-Leon: identification of four novel truncating mutations. *Hum Mutat* 21:448
- Fairbrother WG, Yeh RF, Sharp PA, Burge CB (2002) Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* 297:1007-1013
- Goren A, Ram O, Amit M, Keren H, Lev-Maor G, Vig I, Pupko T, Ast G (2006) Comparative analysis identifies exonic splicing regulatory sequences--The complex definition of enhancers and silencers. *Mol Cell* 22:769-781
- Guo F, Cech TR (2002) In vivo selection of better self-splicing introns in *Escherichia coli*: the role of the P1 extension helix of the Tetrahymena intron. *RNA* 8:647-658
- Hertel KJ (2008) Combinatorial control of exon recognition. *J Biol Chem* 283:1211-1215
- Huen MS, Sy SM, Chen J (2010) BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:138-148
- Infante M, Duran M, Esteban-Cardenosa E, Miner C, Velasco E (2006) High proportion of novel mutations of BRCA1 and BRCA2 in breast/ovarian cancer patients from Castilla-Leon (central Spain). *J Hum Genet* 51:611-617
- Jones HW, Jr., McKusick VA, Harper PS, Wu KD (1971) George Otto Gey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. *Obstet Gynecol* 38:945-949
- Keren H, Lev-Maor G, Ast G (2010) Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nat Rev Genet* 11:345-355
- Krawczak M, Reiss J, Cooper DN (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 90:41-54
- Lopez-Bigas N, Audit B, Ouzounis C, Parra G, Guigo R (2005) Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? *FEBS Lett* 579:1900-1903
- Macville M, Schrock E, Padilla-Nash H, Keck C, Ghadimi BM, Zimonjic D, Popescu N, Ried T (1999) Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res* 59:141-150
- Menendez M, Castellsague J, Mirete M, Pros E, Feliubadalo L, Osorio A, Calaf M, Tornero E, Del VJ, Fernandez-Rodriguez J, Quiles F, Salinas M, Velasco A, Teule A, Brunet J, Blanco I, Capella G, Lazaro C (2011) Assessing the RNA effect of 26 DNA variants in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Breast Cancer Res Treat*
- Millevoi S, Bernat S, Telly D, Fouque F, Gladiéff L, Favre G, Vagner S, Toulas C (2010) The c.5242C>A BRCA1 missense variant induces exon skipping by increasing splicing repressors binding. *Breast Cancer Res Treat* 120:391-399
- Mordes D, Luo X, Kar A, Kuo D, Xu L, Fushimi K, Yu G, Sternberg P, Jr., Wu JY (2006) Pre-mRNA splicing and retinitis pigmentosa. *Mol Vis* 12:1259-1271
- Padgett RA (2012) New connections between splicing and human disease. *Trends Genet* 28:147-154
- Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D (1997) Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol* 4:311-323

- Sanz DJ, Acedo A, Infante M, Duran M, Perez-Cabornero L, Esteban-Cardenosa E, Lastra E, Pagani F, Miner C, Velasco EA (2010) A high proportion of DNA variants of BRCA1 and BRCA2 is associated with aberrant splicing in breast/ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 16:1957-1967
- Shuen AY, Foulkes WD (2011) Inherited mutations in breast cancer genes--risk and response. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16:3-15
- Tardiff DF, Lacadie SA, Rosbash M (2006) A genome-wide analysis indicates that yeast pre-mRNA splicing is predominantly posttranscriptional. *Mol Cell* 24:917-929
- Wahl MC, Will CL, Luhrmann R (2009) The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136:701-718
- Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, Kingsmore SF, Schroth GP, Burge CB (2008) Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 456:470-476
- Wang GS, Cooper TA (2007) Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet* 8:749-761
- Zhang XHF, Chasin LA (2004) Computational definition of sequence motifs governing constitutive exon splicing. *Genes & Development* 18:1241-1250