

Tesis



Sánchez-Mejías García

ANÁLISIS DE LA BASE GENÉTICA DE
DE HIRSCHSPRUNG Y LA DISPLASIA
NEURONAL TIPO B, DOS DESÓRDENES
NERVIOSO ENTÉRICO

Avencia Sánchez-Mejías G

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Memoria realizada en la Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción, y Medicina Fetal de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío bajo la dirección de Dña. Salud Borrego López, Doctora en Medicina y Cirugía, y la tutoría de Dña. Isabel López Calderón, Profesora Titular de Genética de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla, que presenta la Licenciada en Biología AVENCIA SÁNCHEZ-MEJÍAS GARCÍA para optar al grado de Doctor.

La Directora,

La Tutora,

Fdo. Salud Borrego López

Fdo. Isabel López Calderón

Doctora en Medicina y Cirugía

Profesora Titular de Genética

Hospitales Universitarios Virgen del Rocío

Universidad de Sevilla

Fdo. Aventura Sánchez-Mejías García

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**ANÁLISIS DE LA BASE GENÉTICA DE LA ENFERMEDAD
DE HIRSCHSPRUNG Y LA DISPLASIA NEURONAL
INTESTINAL TIPO B, DOS DESÓRDENES DEL SISTEMA
NERVIOSO ENTÉRICO**

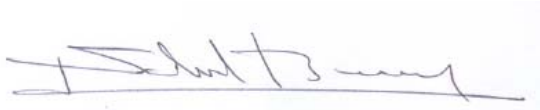
AVENCIA SÁNCHEZ-MEJÍAS GARCÍA

SEVILLA, 2010

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Memoria realizada en la Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción, y Medicina Fetal de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío bajo la dirección de Dña. Salud Borrego López, Doctora en Medicina y Cirugía, y la tutoría de Dña. Isabel López Calderón, Profesora Titular de Genética de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla, que presenta la Licenciada en Biología AVENCIA SÁNCHEZ-MEJÍAS GARCÍA para optar al grado de Doctor.

La Directora,




Fdo. Salud Borrego López

Doctora en Medicina y Cirugía

Hospitales Universitarios Virgen del Rocío

La Tutora,



Fdo. Isabel López Calderón

Profesora Titular de Genética

Universidad de Sevilla



Fdo. Aventura Sánchez-Mejías García

A la memoria de mi abuelo,

Dr. José-María Bravo-Ferrer

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los que me habéis ayudado a realizar esta Tesis Doctoral con vuestro trabajo, apoyo o cariño.

En primer lugar, gracias a mi directora de Tesis, la Dra. Salud Borrego, por la confianza que ha depositado en mí todos estos años y por darme la oportunidad de formar parte de su equipo. Gracias por obligarme a dar siempre lo mejor de mí misma y por ayudar desarrollarme profesionalmente. Gracias también al Dr. Guillermo Antiñolo, por su ejemplo infatigable de entrega al trabajo, por no dejar que se nos olvidara que en nuestro trabajo lo primero y lo último son los pacientes, por construir el proyecto de esta Unidad de Gestión Clínica e implicarnos en él.

A la Dra. Isabel López Calderón, tutora de esta tesis y profesora del Departamento de Genética, por tu ayuda y extrema eficiencia en todos los trámites finales. Gracias por todas las cosas que me has enseñado en las aulas de la Facultad de Biología y en el Departamento y que no olvidaré.

A la Dra. Raquel Fernández, por su participación en esta tesis y toda la ayuda prestada, por las horas de discusión de resultados y de artículos, por estar siempre disponible para escuchar (y rebatir) mis teorías y responder a todas mis dudas. Por enseñarme muchas más cosas de las que ella piensa, muchas, muchas más. Por confiar en mí más que yo misma y animarme a seguir. No me imagino este trabajo sin ti. A la Dra. Isabel Barragán, porque a ella le debo toda mi organización del trabajo diario, el aprovechamiento del tiempo y de los recursos. Gracias por todos los ratos de discusión científica que me sacan de mi mundo de enfermedades complejas y me enseñan que hay mucho más. Gracias por tu alegría y los momentos de risas, en el reducido espacio que hemos compartido estos años. Gracias a Raquel, a Isa y a María por su amistad más allá de la ciencia.

Gracias todos los demás miembros del grupo de investigación (Maca, Rocío, Manu, Ana y Berta) por su participación en este trabajo, por las horas invertidas y la ayuda prestada. Especialmente a Rocío por sus aportaciones estéticas y la magnífica portada. Gracias a Irene, por estar siempre disponible para solucionar todos los contratiempos que han surgido en el día a día del laboratorio con una diligencia que admiro y envidio. A Juancho, por ser mi compañero de fatigas desde el principio, gracias por los momentos de desahogos. Y a los demás miembros de la Unidad por el cariño mostrado.

Gracias a la Dra. Nadegè Bondurand y a su equipo por abrirme las puertas de su laboratorio en París, por todo lo que me enseñaron y por el tiempo que invirtieron en que los experimentos llegaran a buen puerto. Gracias también por sus aportaciones al manuscrito final.

Gracias a mis amigos, por escuchar con paciencia todas mis quejas, por aguantarme en los momentos de desesperación, por alegrarse por cada uno de mis logros y por quererme como soy. Espero que ellos sientan lo mismo que yo.

Quisiera agradecerles a mis padres todo lo que han hecho por mí, y especialmente el esfuerzo y dedicación que han puesto en mi educación y formación. Gracias por vuestro apoyo y por confiar siempre en mi criterio. A mi padre, que tras varios años ha entendido que Hirschsprung es una enfermedad que no afecta a la retina sino al colon; y a mi madre, por saberlo desde el principio. A mi hermana, por ayudarme a encontrar la friqui que hay en mí y ver que es algo bueno. Gracias por las risas y por las charlas.

Gracias a Adolfo, por tu cariño y apoyo incondicional. Gracias por el maravilloso Word que hiciste para esta Tesis, perfectamente maquetado con todas mis directrices. Gracias por tu paciencia y comprensión.

También me gustaría mostrar mi agradecimiento a los pacientes que han participado en el presente estudio y a sus familiares, por su colaboración. Este trabajo tampoco habría sido posible sin la financiación del Fondo de Investigación Sanitario (PI070080 y PI071315), de la Conserjería de Salud (PI0340-2007 y PI0249-2008) y de Innovación, Ciencia y Empresa (CTS-2590) de la Junta de Andalucía, así como del CIBERER (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras) que es una iniciativa del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

Por último, agradecer al Programa de Recursos Humanos del Fondo de Investigación Sanitario del ISCIII su apuesta en los últimos años por la formación de calidad en investigación y por la concesión de la Ayuda Predoctoral de Formación en Investigación (FI06-00033) que me ha permitido llevar a cabo este trabajo mientras cotizaba a nuestro sistema de Seguridad Social.

Gracias a todos los que seguís más allá de estos agradecimientos y continuáis leyendo el manuscrito completo, vosotros hacéis que mi esfuerzo haya merecido la pena.

Avencia

ABREVIATURAS

- ARTN: Artemina.
- BDNF: *Bone-Derived Neurotrophic Factor*, Factor Neurotrófico derivado de hueso.
- BMP: *Bone Morphogenic Factor*, Proteínas morfogénicas de hueso.
- CCHS: *Congenital Central Hypoventilation Syndrome*, Síndrome de hipoventilación central congénita.
- CNV: *Copy Number Variation*, Variación de número de copias.
- cSNP: *coding Single Nucleotide Polymorphism*, Polimorfismo de un único nucleótido en región codificante.
- dHPLC: *denaturing High Pressure Liquid Chromatography*, Cromatografía líquida de alta presión en condiciones desnaturalizantes.
- ECE1: Enzima convertidora de endotelinas 1.
- END3: Endotelina-3.
- ENDRB: Receptor β de las endotelinas.
- ERK: *Extracellular-signaling Regulated Kinase*, Kinasas reguladas por señales extracelulares.
- FMTC: *Familial Medullar Thyroid Carcinoma*, Cáncer medular de tiroides familiar.
- FRS2: *Fibroblast growth factor Receptor Sustrate 2*, Receptor sustrato 2 de FGF (Factor de crecimiento de fibroblasto).
- GDNF: *Glial-cell Derived Neurotrophic Factor*, Factor neurotrófico derivado de glía.
- GFRa1-4: *GDNF receptor alfa 1-4*, Co-receptor de GDNF de 1 al 4.
- GPI: Glicosil-fosfatidilinositol.
- HAND2: *Heart and neural crest derivatives expressed protein*, Proteína expresada en el corazón y en derivados de la cresta neural.
- HMG: *High mobility group*, Grupo de alta movilidad de unión al DNA
- HOX: Factor de transcripción con dominio Homeobox.
- HSCR: Hirschsprung/ Enfermedad de Hirschsprung.
- Ig: Inmunoglobulina.
- JNK: Kinasa c-jun N-terminal.
- LD: *Linkage disequilibrium*, Desequilibrio de ligamiento.
- MEN2: *Multiple Endocrine Neoplasia type 2*, Síndrome de neoplasia endocrina múltiple tipo 2.

- MITF: *Microphthalmia-associated transcription factor*, Factor de transcripción asociado con microftalmia
- MTC: *Medular Thyroid Carcinoma*, Cáncer medular de tiroides.
- NB: Neuroblastoma.
- NFkb: *Nuclear factor kappa B*, Factor nuclear kappa B.
- NGF: *Nerve Growth Factor*, Factor de crecimiento neuronal.
- NRTN: Neurturina.
- NTF3: Neurotrofina 3.
- NTRK/TRK: Receptor de neurotrofina con actividad tirosin-kinasa.
- P75: *Pan-neurptrophin receptor 75*, Receptor de neurotrofinas
- PAX3: *Paired-box 3*, Factor de transcripción con dominio Paired-Box 3.
- PCWH: *Peripheral demyelination, Central dysmyelinating leucodystrophy, Waardenburg síndrome and Hirschsprung disease*, Desmielinización periférica, leucodistrofia central desmielinizante, síndrome de Waardenburg, y enfermedad de Hirschsprung.
- PHOX2: Proteína HOX 2.
- PI3K: Fosfatidil-inositol-3-Kinasa
- PKC: Proteín-kinasa C.
- PLC: Fosfolipasa C- γ .
- PSPN: Persefina.
- PTB: *Phospho-Tirosine Binding*, Dominio fosfo-tirosina de acoplamiento.
- RET: *Rearranged during transfection*.
- SEMA: Semaforina/s
- SH2: *Src-homology-2 domain*, Dominio con homología a SRC 2.
- SNA: Sistema nervioso autónomo.
- SNC: Sistema nervioso central.
- SNE: Sistema nervioso entérico.
- SNP Sistema nervioso periférico/ *Single Nucleotide Polymorphism*, Polimorfismo de un único nucleótido.
- SOX10: *Sex determining region Y box 10*.
- SSCP: *Single-Strand Conformation Polymorphism*, Polimorfismo de conformación de cadena sencilla.
- TDT: *Transmission Disequilibrium Test*, Test de desequilibrio de transmisión
- VNTR: *Variable Number of Tandem Repeats*, Repetición en tandem de número variable.
- WS: *Waardenbugr Syndrome*, Síndrome de Waardenburg.
- ZFH1B: *Zinc Finger Homeobox 1B*, proteína con dominios homeobox y dedo de Zinc 1B.

Índice

A.	INTRODUCCION.....	15
A.1.	Sistema Nervioso Entérico	17
A.1.1.	Organización, Función y Desarrollo embrionario del Sistema nervioso entérico.	17
A.1.2.	Factores implicados en el desarrollo del SNE	21
A.1.3.	Función de las semaforinas. Su papel en el desarrollo del SNE.....	52
A.1.4.	Desórdenes del Sistema Nervioso Entérico.....	55
A.2.	Caracterización clínica y bases moleculares de la enfermedad de Hirschsprung	57
A.2.1.	Etiopatogenia y características clínicas de la enfermedad de Hirschsprung	57
A.2.2.	Epidemiología de la enfermedad de Hirschsprung	61
A.2.3.	Genética molecular de la enfermedad de Hirschsprung	65
A.2.4.	Factores de susceptibilidad genéticos para las formas esporádicas de la enfermedad de Hirschsprung.....	73
A.2.5.	Interacción entre vías de señalización y factores modificadores. Estudios de ligamiento y estudios de asociación a escala genómica	78
A.3.	Caracterización clínica y bases moleculares de la Displasia Neuronal Intestinal	81
A.3.1.	Características clínicas y clasificación de la Displasia Neuronal Intestinal.....	81
A.3.2.	Etiopatogenia y Epidemiología de la DNI B.....	83
A.3.3.	Genética molecular de la DNI B.....	84
B.	HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO	87
B.1.	HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	89
B.2.	OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	90
C.	MATERIALES Y MÉTODOS	93
C.1.	Pacientes y Controles.....	95
C.1.1.	Pacientes con la enfermedad de Hirschsprung	95
C.1.2.	Pacientes con Displasia neuronal intestinal B.....	96
C.1.3.	Individuos control	97
C.2.	Métodos.....	97
C.2.1.	Técnicas generales utilizadas para estudios de Ácidos nucleicos	97
C.2.2.	Técnicas generales utilizadas para estudios funcionales.	113

C.2.3.	Rastreo mutacional de los ligandos de RET (GDNF, NRTN, ARTN y PSPN) en las cohortes de pacientes DNI B y HSCR. Rastreo mutacional del proto-oncogén RET en la cohorte DNI B. Caracterización molecular de los cambios identificados	121
C.2.4.	Estudio funcional de las mutaciones de los ligandos de RET.....	125
C.2.5.	Análisis molecular de la variante c*587 T>C del gen RET en nuestra cohorte de pacientes HSCR.	128
C.2.6.	Análisis molecular de variantes de secuencia del gen RET en pacientes DNI B.....	129
C.2.7.	Rastreo mutacional del gen NTRK3 en la cohorte HSCR. Caracterización molecular de los cambios identificados.	130
C.2.8.	Estudio de la alteración del proceso de splicing por variantes intrónicas en NTRK3	132
C.2.9.	Análisis molecular de variantes de secuencia del gen NTRK3 en pacientes HSCR	133
C.2.10.	Rastreo mutacional de los genes EDNRB y EDN3 en la cohorte HSCR y DNI B. Caracterización molecular de los cambios identificados ..	134
C.2.11.	Análisis molecular de variantes de secuencia de los genes de EDNRB y EDN3 en pacientes DNI B y en pacientes HSCR.....	136
C.2.12.	Rastreo mutacional del gen SOX10 en la cohorte HSCR. Caracterización molecular de los cambios identificados	137
C.2.13.	Estudio funcional de las mutaciones en el gen SOX10.....	138
C.2.14.	Análisis molecular de variantes de secuencia del gen SOX10 en pacientes HSCR	141
C.2.15.	Rastreo mutacional de los genes SEMA3A y SEMA3D en la cohorte HSCR. Caracterización molecular de los cambios identificados	141
C.2.16.	Análisis molecular de variantes de secuencia de los genes SEMA3A y SEMA3D en pacientes HSCR	144
C.2.17.	Rastreo de deleciones/duplicaciones en los genes SOX10, EDNRB, Gfra1, NRTN y PHOX2B.....	145
D.	RESULTADOS	149
D.1.	Análisis molecular y funcional de los genes que codifican para los ligandos de RET (GDNF, NRTN, ARTN y PSPN) en pacientes HSCR.	151
D.1.1.	Ampliación del rastreo mutacional de la secuencia codificante de los genes GDNF, NRTN, ARTN y PSPN en pacientes HSCR.	151
D.1.2.	Estudio funcional de las mutaciones encontradas en nuestra serie de pacientes.	154
D.2.	Análisis molecular de la región 3' UTR en pacientes HSCR.	156

D.3.	Evaluación de los genes implicados en las rutas de señalización de GDNF-GFR α 1-RET como genes de susceptibilidad para DNI B.....	157
D.3.1.	Rastreo mutacional de la secuencia codificante de RET, GDNF, NRTN, ARTN y PSPN en pacientes DNI B.	157
D.3.2.	Evaluación de variantes de secuencia del gen RET como factores de susceptibilidad para DNI B.	159
D.4.	Evaluación de <i>NTRK3</i> como gen de susceptibilidad para HSCR. Implicación de <i>RET</i> y <i>NTRK3</i> en la aparición de HSCR en un caso familiar.	163
D.4.1.	Rastreo mutacional de la secuencia codificante de NTRK3 en pacientes HSCR	163
D.4.2.	Evaluación funcional de variantes intrónicas sobre la expresión de NTRK3.....	166
D.4.3.	Análisis de variantes de secuencia en NTRK3 como factores de susceptibilidad para HSCR esporádico	167
D.5.	Análisis molecular de los genes <i>EDN3</i> y <i>EDNRB</i> en nuestra cohorte de pacientes HSCR.....	169
D.5.1.	Rastreo mutacional de la secuencia codificante de EDNRB y EDN3 en pacientes HSCR	169
D.5.2.	Identificación de una variante en EDN3 como factor modificador del fenotipo en una familia HSCR múltiplex	174
D.5.3.	Evaluación de variantes de secuencia de los genes EDNRB y EDN3 como factores de susceptibilidad para HSCR esporádico.....	177
D.6.	Evaluación de los genes implicados en las rutas de señalización de GDNF-GFR α 1-RET como genes de susceptibilidad para DNI B.....	179
D.6.1.	Rastreo mutacional de la secuencia codificante de EDNRB y EDN3 en pacientes DNI B.....	179
D.6.2.	Evaluación de variantes de secuencia de los genes EDNRB y EDN3 como factores de susceptibilidad para DNI B.....	180
D.7.	Análisis molecular y funcional del gen SOX10 en pacientes HSCR	183
D.7.1.	Rastreo mutacional y de grandes deleciones de la secuencia codificante del gen SOX10 en pacientes HSCR.....	183
D.7.2.	Estudio funcional de las mutaciones encontradas en nuestra serie de pacientes.....	185
D.7.3.	Evaluación de variantes de secuencia del gen SOX10 como factores de susceptibilidad para HSCR esporádico	188
D.8.	Evaluación de los genes <i>SEMA3A</i> y <i>SEMA3D</i> como genes de susceptibilidad para HSCR	190

D.8.1.	Rastreo mutacional de la secuencia codificante de SEMA3A y SEMA3D en pacientes HSCR	190
D.8.2.	Evaluación de variantes de secuencia de los genes SEMA3A y SEMA3D como factores de susceptibilidad para HSCR esporádico .	194
D.9.	Rastreo de grandes deleciones en los genes <i>EDNRB</i> , <i>GFRA1</i> , <i>NRTN</i> y <i>PHOX2B</i> en pacientes HSCR	196
E.	DISCUSION	199
E.1.	Consecuencias funcionales de las alteraciones proteicas encontradas en los ligandos de RET en nuestra serie de pacientes HSCR	201
E.2.	Evaluación de la implicación en HSCR de la región 3'UTR del gen <i>RET</i>	203
E.3.	Evaluación de <i>NTRK3</i> como gen de susceptibilidad para HSCR	204
E.4.	Análisis molecular de los genes <i>EDN3</i> y <i>EDNRB</i> en nuestra cohorte de pacientes HSCR.....	207
E.5.	Contribución de <i>RET</i> , <i>NTRK3</i> y <i>EDN3</i> en la aparición del fenotipo HSCR en una familia múltiplex.	210
E.6.	Implicación de las rutas de señalización GDNF-Gfra1-RET y EDN3-EDNRB en la Displasia Neuronal Intestinal tipo B.	212
E.6.1.	Evaluación de los genes <i>RET</i> , <i>GDNF</i> , <i>NRTN</i> , <i>ARTN</i> , <i>PSPN</i> como genes de susceptibilidad para DNI B.	213
E.6.2.	Evaluación de los genes <i>EDNRB</i> y <i>EDN3</i> como genes de susceptibilidad para DNI B	216
E.7.	Asociación de una mutación en el gen <i>SOX10</i> con el fenotipo HSCR aislado.....	218
E.8.	Evaluación de los genes SEMA3A y SEMA3D como genes de susceptibilidad para HSCR	221
E.9.	Implicación en HSCR de una CNV en el gen <i>GFRA1</i> en un caso familiar de HSCR.....	224
F.	CONCLUSIONES	227
G.	BIBLIOGRAFIA.....	231

A. INTRODUCCION

A.1. Sistema Nervioso Entérico

A.1.1. Organización, Función y Desarrollo embrionario del Sistema nervioso entérico

El sistema nervioso autónomo (SNA) se divide en sistema nervioso entérico (SNE), simpático y parasimpático, siendo el SNE la división más extensa en número de células del SNA. El SNE pertenece anatómicamente a la rama del sistema nervioso periférico (SNP) y consiste en una red de neuronas y glía localizada en las paredes del tubo digestivo. Los numerosos ganglios del SNE se distribuyen de manera homogénea en dos dimensiones conectadas entre sí; el plexo mientérico, también llamado de Auerbach, entre las capas musculares circular y longitudinal, y el plexo submucoso o de Meissner, hacia el interior de la capa muscular circular (Figura A.1).

La función del SNE es controlar la motilidad refleja de la musculatura del intestino y tiene un papel muy importante en el control del transporte de agua y electrolitos a través del epitelio mucoso (Furness y Costa, 1987). Algunas de las neuronas del SNE reciben información desde el sistema nervioso central (SNC) o desde ganglios simpáticos y parasimpáticos (Trudung et al, 1994; Powley, 2000), pero existen regiones intestinales en las que el SNE muestra una gran autonomía funcional (Furness, 1995).

Los precursores neurales que formarán el SNE durante el desarrollo embrionario, derivan de las células de la cresta neural (Yntema y Hammond, 1954). Estas células se forman a lo largo de todo el eje neural a partir del ectodermo embrionario, pero sólo ciertas regiones bien definidas de la cresta neural darán lugar a las neuronas y células gliales que forman parte de los complejos circuitos neuronales necesarios para el correcto funcionamiento del SNE (Le Douarin y Kalcheim, 1999). De hecho, distintas regiones de la cresta neural se diferencian hacia distintos tipos celulares y tejidos, como melanocitos, médula adrenal, dentina, estructuras cráneo-faciales del esqueleto, el iris, las ramas simpática y parasimpática del SNP y las neuronas y glía del SNE (Bates, 2002). En este último caso dichas células derivan de las regiones vagal, troncal y sacra de la cresta neural, desde donde los precursores emergerán para invadir el intestino en desarrollo, siguiendo unas rutas de migración celular definidas, entre la séptima y la duodécima semana de gestación (Okamoto y Uneda, 1967). Las células de la cresta neural vagal y troncal entran en la región anterior del aparato digestivo del embrión migrando en dirección rostro-caudal

(Figura A.2). Sólo una pequeña porción del SNE procede de la región troncal de la cresta neural, limitándose exclusivamente a estructuras anteriores al duodeno. Sin embargo, la aportación de la región vagal es mucho más significativa, siendo estos precursores neurales los que migran hacia el resto del tracto gastrointestinal, colonizando las regiones más distales. Existe una segunda ola migratoria de las células derivadas de la cresta neural, en la que se ve implicada la región sacra. Las células derivadas de la cresta neural sacra colonizan primero los ganglios pélvicos autónomos, para migrar hacia el intestino distal en la dirección contraria (Kapur et al., 2000a; Figura A.2).

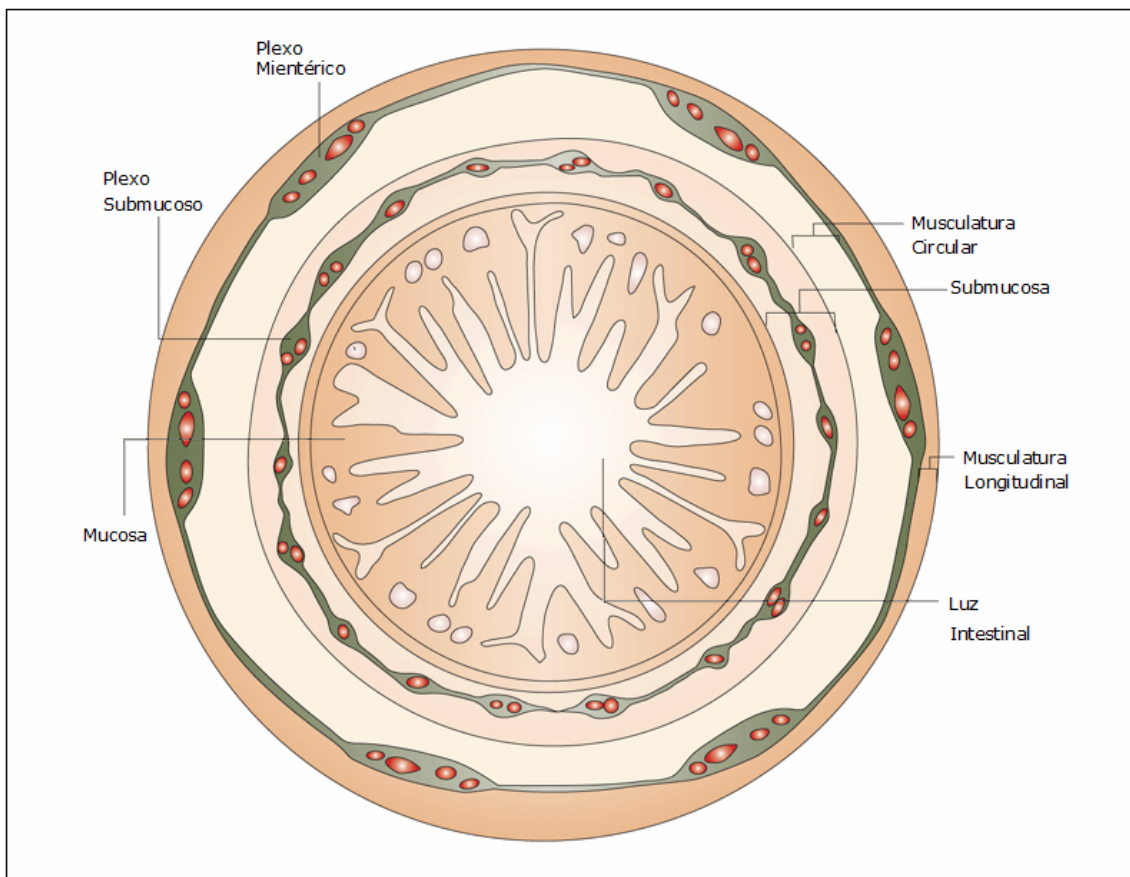


Figura A.1 Representación esquemática de un corte transversal del intestino.

El estudio del desarrollo embrionario del SNE es un tema de gran interés para muchos investigadores, no sólo por su implicación en distintas patologías humanas, sino porque además supone un modelo idóneo para el estudio de proliferación, migración y diferenciación de células precursoras durante el desarrollo. La migración de las células derivadas de la cresta neural a través del intestino en formación, se lleva a cabo en cadenas, en contacto unas con otras, lo

que favorece dicha migración (Gershon y Ratcliffe, 2006). Las células que colonizan el tracto digestivo constituyen una población heterogénea, que en su conjunto es pluripotente pero incluye células con distinto grado de compromiso o diferenciación. Algunas de estas células pluripotentes tienen además capacidad de auto-renovarse (Young et al., 2005). La proliferación de los precursores de la cresta neural en un determinado momento del desarrollo del SNE es crítica para que se alcance un número suficiente de precursores que aseguren su correcta formación. Cualquier fallo en este proceso proliferativo restringirá la fuente de precursores para las neuronas y la glía entérica (Binder et al., 2008). Dichos precursores tendrán que cambiar su fenotipo de manera progresiva según el estadio de desarrollo tanto durante su migración, como después de ella (Henion y Weston, 1997; Newgreen y Young, 2002a, 2002b). Para la formación del SNE, no sólo es importante que estos precursores neurales proliferen, sino que además migren hasta el órgano diana y se diferencien a distintos tipos de neuronas y glía a lo largo del intestino para dar lugar al repertorio celular, en número suficiente y correcta localización, para su funcionamiento. Este proceso implica que una subpoblación de precursores deberá separarse de la ruta migratoria longitudinal para alcanzar su localización definitiva en los plexos submucoso y mientérico. Además dichas neuronas diferenciadas deben establecer contactos sinápticos unas con otras de manera precisa.

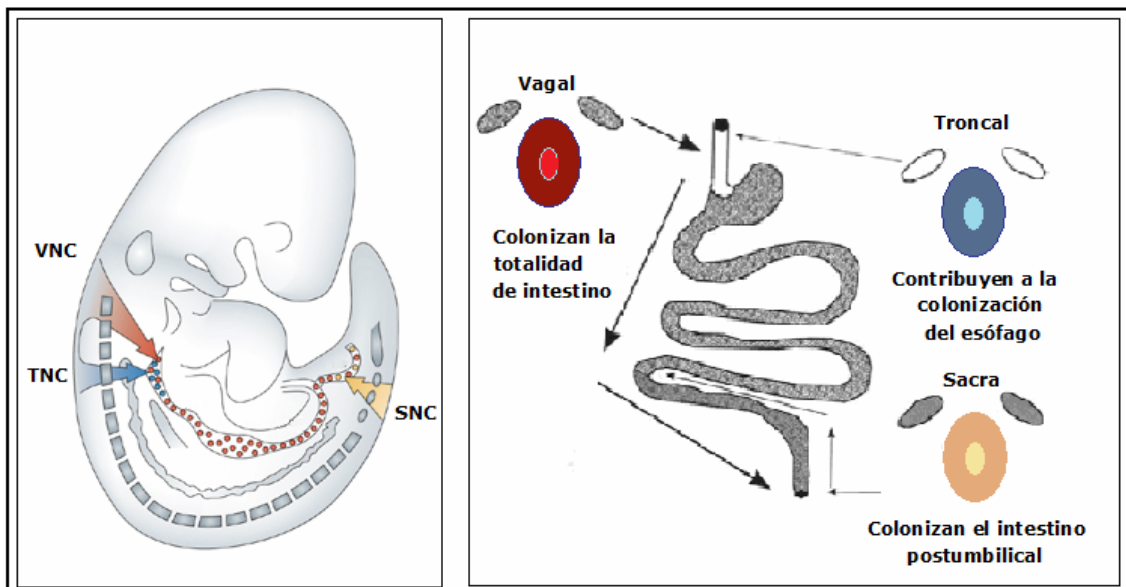


Figura A.2 El intestino es colonizado por los precursores procedentes de tres regiones distintas de la cresta neural. VNC: Cresta neural vagal; TNC: Cresta neural troncal; SNC: Cresta neural sacra.

Todo este complicado proceso está perfectamente orquestado por una gran cantidad de factores de señalización del microambiente o nicho entérico, que incluye factores de crecimiento y elementos de la matriz extracelular, que en algunos casos son conocidos y veremos con detalle más adelante.

Una de las primeras señales de diferenciación celular que se observa en los precursores una vez que han colonizado el intestino, es la expresión del receptor tirosín kinasa RET (Lo y Anderson, 1995) y después la pérdida de nestina de forma transitoria (Chalazonitis et al., 1998a; Figura A.3). Posteriormente estas células proseguirán hacia distintas rutas de diferenciación neuronal y glial (Figura A.3). Estas células durante su migración no expresan ningún marcador neuronal, lo que apoya la hipótesis de que las células una vez que alcanzan un determinado grado de diferenciación no son capaces de migrar a lo largo del intestino del embrión (Gershon y Ratcliffe, 2006). Los distintos estadios del desarrollo del SNE, así como las distintas etapas de diferenciación celular, se encuentran regulados por varias rutas de señalización que implican la secreción de moléculas por parte de las células del mesénquima intestinal que actúan sobre receptores expresados en los precursores de la cresta neural con la consiguiente activación y represión de la expresión genética de la célula (Le Douarin et al, 1992). Por tanto, la interacción entre los precursores derivados de la cresta neural y el entorno del tubo digestivo en formación parece crucial para el desarrollo del SNE. Podemos decir que la formación del SNE depende tanto de factores intrínsecos y extrínsecos a las células progenitoras derivadas de la cresta neural. Por ejemplo, estas células requieren de factores de crecimiento, como el factor neurotrófico derivado de glía (GDNF), para migrar a lo largo del intestino (Young et al., 2004), proliferar y sobrevivir (Chalazonitis et al., 1998a), pero éstas no responderán a GDNF a no ser que estén programadas para expresar su receptor de membrana RET (Trupp et al, 1996).

El desarrollo y maduración del SNE continúa incluso después del nacimiento del individuo, durante los primeros años de vida. Existen pocos datos sobre este proceso en humanos, pero en otros modelos animales como rata, hay evidencias de un incremento de óxido nítrico sintasa o péptido vasoactivo intestinal en las primeras semanas de vida, con respecto al momento de nacer (Matini et al., 1997).

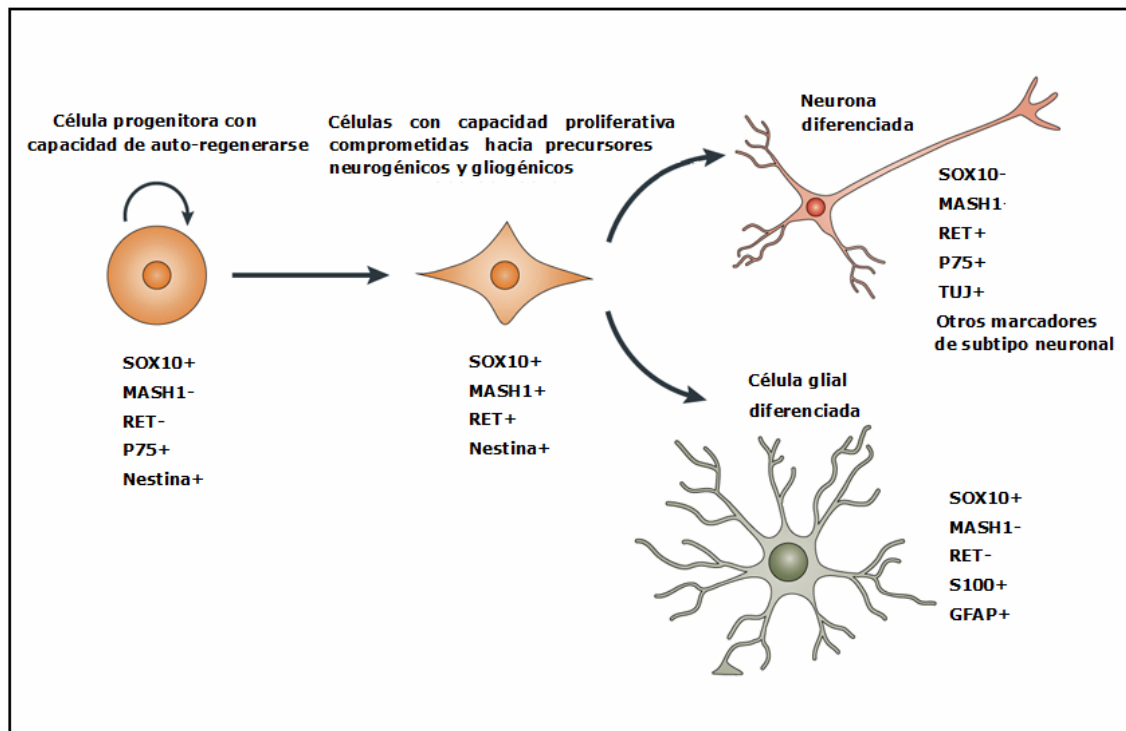


Figura A.3 Marcadores celulares de las distintas células que participan en el desarrollo del sistema nervioso entérico.

A.1.2. Factores implicados en el desarrollo del SNE

La conservación de los mecanismos del desarrollo embrionario existente entre distintas especies, el análisis de distintas poblaciones de células derivadas de la cresta neural obtenidas de intestino embrionario de ratón, rata y pollo, así como la obtención de modelos *knockout*, han permitido la identificación de diferentes genes que, al ser mutados o delecionados, pueden causar defectos en el desarrollo del SNE. Además, estos datos se correlacionan, en muchos casos, con el análisis molecular en desórdenes del SNE en humanos. Los genes que tienen un efecto más severo en este proceso, son aquellos que codifican proteínas implicadas en el sistema de señalización intercelular de GDNF, EDN3 o NTF3 (Figura A.4). Sin embargo, existen una gran variedad de genes que codifican proteínas pertenecientes a otras rutas de señalización diferentes, o que codifican distintos factores de transcripción que también alteran el proceso de formación del SNE cuando se mutan.

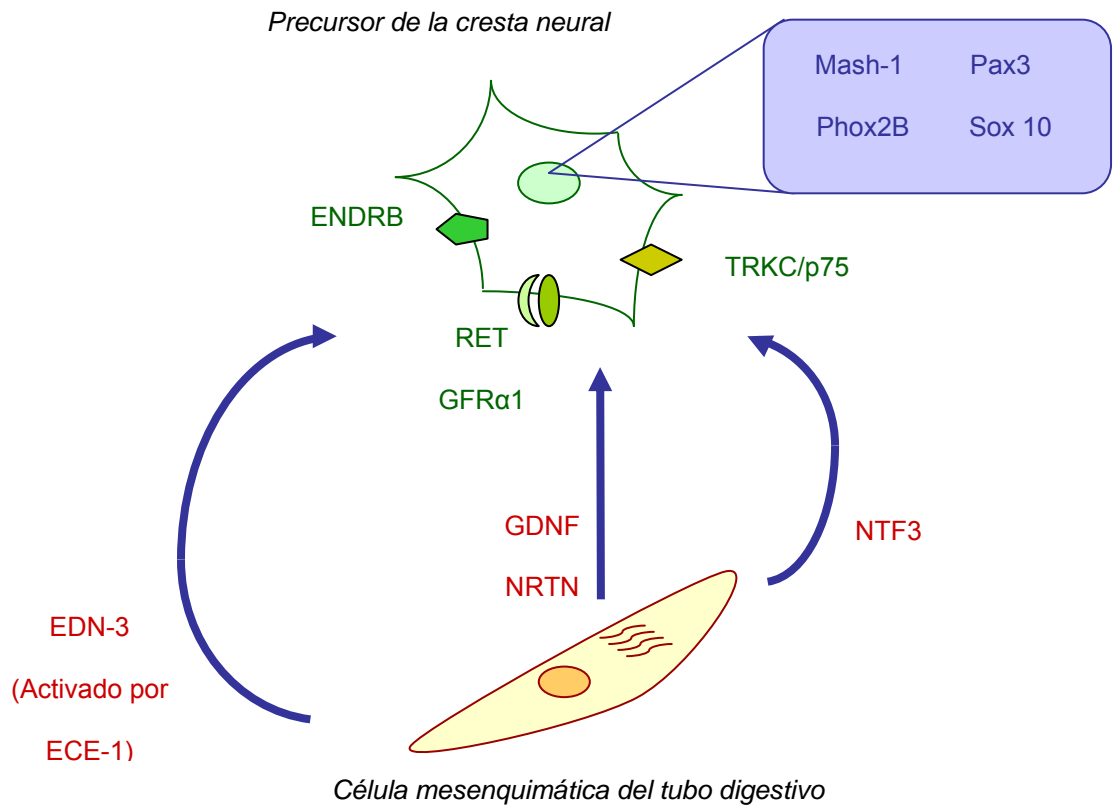


Figura A.4 Rutas de señalización y factores de transcripción implicados en el desarrollo del SNE.

A.1.2.1. Ruta de señalización de RET-GDNF-GFRA1

El proto-oncogén *RET* (*Rearranged during transfection*) codifica para un receptor transmembrana con actividad tirosín-kinasa implicado en la activación de cascadas de señalización intracelular que median la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Takahashi et al., 1988). *RET* se localiza en la región cromosómica 10q11.2 (Pasini et al, 1995a), y su estructura genómica consta de 21 exones distribuidos a lo largo de 60 kilobases. Alrededor del 40% de su secuencia corresponde a un inmenso intrón de 23 kb ubicado entre los exones 1 y 2 (Kwok et al., 1993; Ceccherini et al., 1993; Pasini et al., 1995a; Myers et al., 1995).

Su patrón de expresión está finamente regulado durante el desarrollo embrionario de vertebrados, apareciendo unas tasas de expresión superiores en los estadios iniciales. Se expresa principalmente en la cresta neural, SNC, SNP y sistema excretor (Pachnis et al., 1993; Avantaggiato et al., 1994; Schuchardt et al., 1994; Tsuzuki et al., 1995). En consonancia con su patrón de expresión, se ha visto que ratones *Ret knockout* (*Ret*^{-/-}) carecen de nervios entéricos y ganglios cervicales superiores y presentan agenesia o disgenesia renal (Schuchardt et al.,

1994; Durbec et al., 1996). También se ha detectado expresión de *RET* en tumores derivados de la cresta neural tales como neuroblastoma y feocromocitoma entre otros (Ikeda et al., 1990; Santoro et al., 1990; Takahashi, 1991; Nakamura et al., 1994). De la misma manera, *RET* está implicado en la aparición de numerosas patologías humanas, como cierta proporción de casos de carcinoma papilar de tiroides, cáncer medular de tiroides esporádico, síndromes de neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (MEN 2) o enfermedad de Hirschsprung (Pierotti et al., 1996; Shirahama et al., 1998; Mulligan et al., 1993; Ederly et al., 1994; Sánchez et al., 1998, 1999; Skinner et al., 2005, 2008).

El receptor tirosín-kinasa *RET* es una proteína de 124 KDa que contiene un dominio extracelular, un dominio transmembrana, y un dominio intracelular. El dominio extracelular incluye un péptido señal, así como una región con alta homología a la familia de moléculas de adhesión intercelular cadherinas, y una región rica en cisteínas (Takahashi et al., 1988, 1989). Dichos residuos cisteínicos están conservados entre especies, lo que sugiere que estos aminoácidos desempeñan un papel fundamental en la formación de enlaces disulfuro intramoleculares, y por tanto en determinar la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína (Takahashi et al., 1989; Schneider, 1992; Iwamoto et al., 1993). El dominio intracelular incluye al dominio con actividad tirosín-kinasa, donde reside la actividad catalítica del receptor, que se activa mediante la fosforilación de determinados residuos tirosínicos, desencadenando la activación de distintas rutas de señalización intracelular.

Existen tres isoformas proteicas de *RET* generadas por maduración alternativa del extremo carboxi-terminal y que difieren en el número de aminoácidos de su secuencia: *RET9* (1072 aa), *RET43* (1106 aa) y *RET51* (1114 aa) (Tahira et al., 1990; Myers et al., 1995) siendo la tirosina 1062, el último aminoácido común en todas ellas, uno de los principales sitios de unión para distintas moléculas adaptadoras (Takahashi, 2001; Couplier et al., 2002; Kurokawa et al., 2003). Como resultado, la secuencia del extremo carboxi-terminal es única para cada isoforma a partir de Y1062 y esto hace que presenten propiedades bioquímicas y funciones biológicas diferentes ya que la afinidad de unión de las distintas moléculas adaptadoras varía entre ellas (Asai et al., 1996; Arighi et al., 1997; Liu et al., 1996; Lorenzo et al., 1997, Tsui-Pierchala et al., 2002). *RET9* y *RET51* son las dos isoformas mayoritarias y parecen estar implicadas de forma diferente durante el desarrollo embrionario (Myers et al., 1995; Ivanchuk et al., 1997, 1998). Ratones que sólo expresan *RET51* carecen de ganglios entéricos en el colon y presentan displasia renal, mientras que ratones que sólo expresan *RET9*

tienen un desarrollo normal. Esto sugiere que RET9 es necesario y suficiente para el desarrollo del SNE y sistema excretor (de Graaff et al., 2001).

La activación de RET requiere la formación de un complejo multimérico, en el que participan un ligando soluble de la familia de factores neurotróficos derivados de la glía (*Glial Derived Neurotrophic Factors*, GDNF), y un co-receptor anclado a la membrana celular a través de un enlace glicosil-fosfatidilinositol (GPI) de la familia de receptores α de GDNF ($GFR\alpha$) (Treanor et al., 1996; Jing et al., 1996; Figura A.5). Los ligandos de RET son miembros de la superfamilia TGF- β (Lin et al., 1993) y se ha visto que todos ellos actúan como potentes factores de supervivencia neuronal (Baloh et al., 2000). Se han identificado 4 miembros pertenecientes a esta familia, que son GDNF, neurturina (NRTN), artemina (ARTN) y persefina (PSPN) (Lin et al., 1993; Kotzbauer et al., 1996; Baloh et al., 1998; Milbrandt et al., 1998). Todos ellos contienen un dominio rico en cisteínas constituido por siete residuos de cisteína conservados y espaciados de forma similar, y aproximadamente el 40% de su secuencia aminoacídica es idéntica. Estas moléculas son sintetizadas como precursores proteicos, y mediante rotura proteolítica se obtiene la proteína soluble homodimérica. Se ha observado que GDNF, NRTN y ARTN están implicados en la supervivencia de un amplio espectro de neuronas tanto periféricas como centrales, mientras que PSPN participa en la supervivencia de neuronas dopaminérgicas motoras y de la sustancia nigra tanto *in vivo* como *in vitro*, pero aún no existen evidencias de su implicación en la supervivencia de neuronas periféricas (Takahashi, 2001). También se han identificado 4 co-receptores $GFR\alpha$ ($GFR\alpha 1-4$). Los co-receptores $GFR\alpha 1-3$ poseen una alta homología de secuencia y una estructura proteica similar, con tres dominios cisteínicos, llamados GDNF/GAS1, en su molécula (Airaksinen et al., 1999). Sin embargo, el co-receptor $GFR\alpha 4$ de mamíferos presenta sólo un 40% de homología con el resto de co-receptores y carece del primer dominio cisteínico en el extremo N-terminal (Lindahl et al., 2000, 2001; Masure et al., 2000). Cada uno de los 4 ligandos de RET tiene una especial afinidad por un co-receptor $GFR\alpha$ concreto. Así, GDNF se une preferentemente a $GFR\alpha 1$, NRTN a $GFR\alpha 2$, ARTN a $GFR\alpha 3$ y PSPN a $GFR\alpha 4$, si bien NRTN y ARTN pueden unirse a $GFR\alpha 1$, y GDNF a $GFR\alpha 2$ y $GFR\alpha 3$, aunque con menor afinidad, y parece que únicamente *in vitro*. Por el contrario, se ha observado que PSPN sólo puede unirse a $GFR\alpha 4$ (Baloh et al., 1998; Enokido et al., 1998). Según el modelo propuesto originalmente, el ligando homodimérico se uniría a dos moléculas de $GFR\alpha$, y el complejo formado interaccionaría con el dominio extracelular de dos moléculas de RET, induciendo la dimerización y autofosforilación de los residuos tirosínicos del dominio intracelular (Airaksinen et al., 1999). Sin embargo, estudios realizados en mutantes GDNF deficientes en la unión a $GFR\alpha 1$ pero que pueden

activar RET, parecen indicar que $GFR\alpha 1$ podría pre-asociarse débilmente con RET en ausencia de ligando, y posteriormente se uniría GDNF potenciando la formación del complejo GDNF- $GFR\alpha 1$ -RET (Eketjäll et al., 1999).

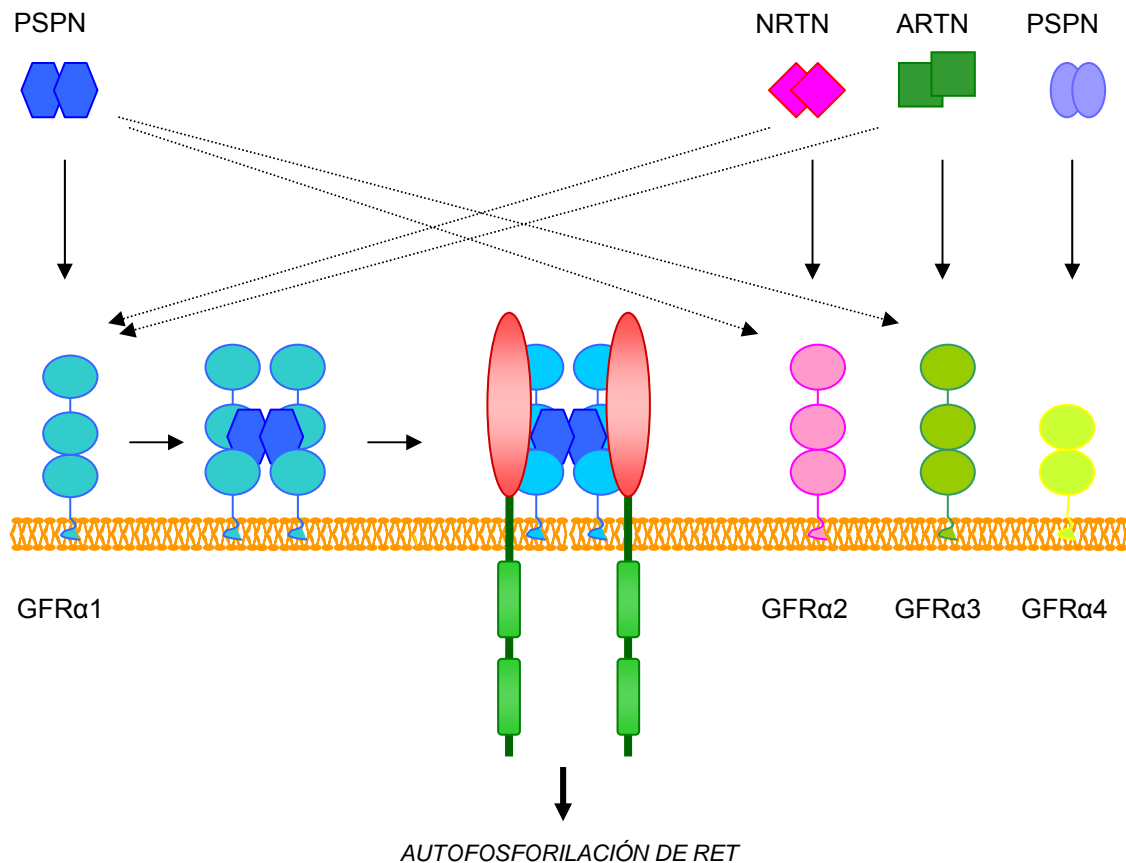


Figura A.5 Formación del complejo multimérico de activación de la proteína RET. Interacciones entre los distintos ligandos, co-receptores $GFR\alpha 1$ y RET.

RET ejerce sus funciones en la célula a través de una compleja serie de interacciones con varios tipos de moléculas (Figura A.6). La formación del complejo multimérico de RET induce cambios conformacionales en el dominio intracelular, teniendo como resultado la autofosforilación de residuos tirosínicos específicos y desencadenando la activación de la cascada de señalización (Takahashi, 2001; Kawamoto et al., 2004). Tras la activación del receptor se produce la interacción de moléculas adaptadoras que contienen dominios SH2 (*src-homology-2 domain*) o PTB (*phosphotyrosine-binding domain*), como GRB7 y GRB10 (*Growth factor Receptor-Bound protein 7 y 10*), c-Src, fosfolipasa C- γ (PLC- γ), SHC, SNT/FRS2 (*Fibroblast growth factor Receptor Substrate 2*), IRS1, 2 (*Insulin Receptor*

Substrate 1,2), DOK1, DOK4, DOK5 (*Docking protein 1, 4 y 5*), Enigma y GRB2 (*Growth factor Receptor-Bound protein 2*) (Borrello et al., 1994, 1996; Pandey et al., 1995; Asai et al., 1996; Arighi et al., 1997; Lorenzo et al., 1997; Durick et al., 1998; Alberti et al., 1998; Grimm et al., 2001; Kurokawa et al., 2001; Melillo et al., 2001a, 2001b; Murakami et al., 2002; Encinas et al., 2004). Como resultado de las interacciones de estas proteínas adaptadoras con las formas fosforiladas de RET, se activan varias rutas de señalización intracelular, siendo las mejor conocidas las rutas RAS-ERK, PI3K/ARK, JNK y PLC- γ .

Activación de la ruta RAS-ERK

Las proteínas adaptadoras SHC, SNT/FRS2, SNT/FRS3, IRS1, IRS2, GRB7/10 y/o GRB2 llevan a la activación de la proteína RAS, que a su vez activa a las MAP-kinasas ERK1 o ERK2. Las kinasas ERK1/2 sufren una translocación al núcleo, y allí pueden fosforilar a factores de transcripción que regulan la expresión de importantes proteínas del ciclo celular y de la diferenciación. Por tanto, la activación de esta ruta desencadena respuesta de supervivencia, crecimiento y proliferación celular, así como respuestas ante estrés (Borrello et al., 1996; Hansford y Mulligan, 2000).

Activación de la ruta PI3K/ARK

La segunda ruta importante de activación de RET es la ruta de la fosfoinositol-3-kinasa (PI-3K), mediada a través de la interacción de RET con c-Src o SHC (Murakami et al., 1999; Soler et al., 1999). La estimulación de esta ruta por parte de RET está asociada con la motilidad e interacciones celulares mediante la activación de RAC1/GEF (*Ras-related C3 Botulium Toxin Substrate 1/Guanine nucleotide Exchange Factor*), y puede conducir a la formación de lamelipodios (van Weering et al., 1998). RET también actúa a través de la PI3-K para estimular a la AKT-kinasa, que activa al factor de transcripción NF κ B, jugando un papel importante en la supervivencia y proliferación celular, pero también pudiendo participar en procesos neoplásicos (Murakami et al., 1999; Soler et al., 1999; Segouffin-Cariou et al., 2000).

Activación de la ruta JNK

También se ha mostrado que RET activa la cascada de la kinasa c-jun N-terminal (JNK). Esta kinasa activa varios factores de transcripción que modulan la apoptosis, y podría participar en la inducción de los procesos de reparación de DNA en respuesta a daño genotóxico. Esta ruta está implicada en procesos neoplásicos (Marshall et al., 1997), pero aún no se conoce muy bien como RET es capaz de

desencadenarla, si bien se piensa que podría enlazar con la ruta de la PI3 kinasa (Hansford y Mulligan, 2000). Estudios recientes sugieren que la molécula adaptadora DOK1 se une a la tirosina 1062 de RET, y a otra proteína adaptadora conocida como NCK, pudiendo esta asociación ser también responsable de la activación de JNK (Kurokawa et al., 2003).

Activación de la ruta PLC- γ

La interacción de RET con la fosfolipasa C- γ (PLC- γ) a través de la tirosina Y1015 desencadena la activación de esta ruta, que actúa regulando los niveles intracelulares de Ca_2^+ mediante el aumento de los niveles de inositol tri-fosfato (IP3) y diacylglycerol (DAG). Como resultado se activa la proteín-kinasa C (PKC), que enlaza con la ruta Ras/ERK al desencadenar la fosforilación de las kinasas ERK1/2 (Hansford y Mulligan, 2000).

Existe una clara asociación entre RET y la formación, no sólo del SNE sino también de otros tejidos y células derivadas de la cresta neural. La ruta de señalización RET/GFR α 1/GDNF ha demostrado, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, promover la supervivencia neuronal, la mitosis de células progenitoras, la diferenciación neuronal y la prolongación de neuritas en una subpoblación de neuronas y sus precursores de SNC y SNP (Lin et al., 1993; Henderson et al., 1994; Matheson et al., 1997; Eng, 1999; Rosenthal, 1999). Se sabe que los precursores derivados de la cresta neural expresan RET (Attie-Bitach et al., 1998). El principal estimulador de la proliferación, supervivencia y diferenciación de dichos precursores entéricos en los primeros estadios del desarrollo del SNE es GDNF, que se expresa en las células mesenquimáticas del tracto digestivo (Young et al., 2001), aunque también se ha visto implicación de NRTN en menor grado (Chalazonitis et al., 1998a; Taraviras et al., 1999). Además RET participa en el desarrollo temprano del riñón, tanto en ratones como en humanos (Moore et al., 1996; Pichel et al., 1996; Sanchez et al., 1996; Skinner et al., 2008).

La respuesta a GDNF de las células que migran desde la cresta neural hacia el intestino en formación, no comienza hasta poco después de la colonización del mismo y no antes (Young et al., 2001). Existen evidencias de la expresión de GDNF en las células mesenquimáticas de la región anterior del tracto digestivo, región que más tarde dará lugar al esófago, antes de la llegada de los precursores neurales (Natarajan et al., 2002). A partir de ese momento aumenta su expresión de forma secuencial en dirección cráneo-caudal (Young et al., 2001), adelantándose

a la ola de migración de las células derivadas de la cresta neural vagal. Por este motivo se ha propuesto que la presencia de GDNF en el mesénquima entérico promueve la migración de los precursores hacia el final del intestino. También se ha visto que las neuronas entéricas siguen expresando RET incluso después de haberse diferenciado, no siendo así en el caso de células gliales (Young et al., 1992), a pesar de que sus precursores en ambos casos expresan RET en las etapas iniciales del desarrollo. Estudios *in vitro* en células embrionarias de pollo, ratón y rata han demostrado que GDNF actúa como factor mitogénico sobre los precursores tempranos del SNE y promueve la diferenciación de neuronas y la formación y crecimiento de sus prolongaciones (Chalazonitis et al., 1998a; Heuckeroth et al., 1998; Taraviras et al., 1999; Wu et al., 1999). GDNF también es capaz de guiar, por atracción, la migración de los precursores del SNE (Young et al., 2001). Parece que la variedad de modalidades de respuesta a GDNF depende de factores que están bajo el control del receptor RET, como las proteínas intracelulares pertenecientes a las cadenas de transducción de señales. Dichos factores podrían estar regulados de manera diferencial en los distintos tipos celulares, para provocar una respuesta u otra de manera específica.

El efecto de GDNF sobre la proliferación de los precursores neurales disminuye a lo largo de la vida del individuo, mientras que su efecto sobre la diferenciación hacia neuronas persiste en el tiempo (Chalazonitis et al., 1998a; Worley et al., 2000). Esto, probablemente, se deba a que el efecto sobre la proliferación celular de GDNF está modulado por diversos factores, entre ellos a la acción de EDN3 que lo potencia, como veremos más adelante. También existen factores que contrarrestan el efecto de GDNF sobre proliferación, como las proteínas morfogénicas de hueso BMP-2 y BMP-4 (Chalazonitis et al., 2004).

Ratones *Ret*^{-/-}, *Gdnf*^{-/-} y *Gfra1*^{-/-} presentan un fenotipo muy similar (Schuchardt et al., 1994; Moore et al., 1996; Sánchez et al., 1996; Pichel et al., 1996; Enomoto et al., 1998) y se caracteriza por agenesia renal y ausencia de SNE, debido, probablemente, a fallos en la proliferación, migración y diferenciación de los precursores entéricos. Sin embargo, ratones *Nrtn*^{-/-} o *Gfra2*^{-/-} solamente presentan un descenso en la densidad de neuronas colinérgicas del SNE y no presentan anomalías renales (Heuckeroth et al., 1999; Rossi et al., 1999). Mutaciones en humanos de algunos de estos genes, como *RET*, *GDNF* o *NRTN* en heterocigosis se han asociado a la aparición de fallos en el SNE (Romeo et al., 1994; Edery et al., 1994), pero en raras ocasiones a agenesia renal (Lore et al., 2000). Por otra parte ratones *Ret*^{+/-} y *Gdnf*^{+/-} no presentan ninguna alteración entérica o renal tanto al nacer como en la etapa adulta, sin embargo los modelos animales *Gdnf*^{+/-} si que

presentan durante la fase adulta un descenso acelerado de la actividad motora espontánea con la edad (Boger et al., 2006), y una mayor susceptibilidad a degeneración neurotóxica de neuronas monoaminérgicas (Boger et al., 2007), debido al importante papel de GDNF en la protección de neuronas dopaminérgicas en ciertos núcleos del SNC (Lin et al., 1993). Recientemente se ha presentado un modelo animal que carece de GDNF de manera condicional durante la etapa adulta (Pascual et al., 2008), en el que se observó la muerte de neuronas catecolaminérgicas con la aparición de comportamientos motores alterados, lo que confirma que GDNF es necesario para el mantenimiento trófico de este tipo celular en el adulto. Aunque aún no se ha investigado, sería interesante determinar si estos ratones presentan durante la fase adulta alguna alteración en las neuronas de los ganglios entéricos.

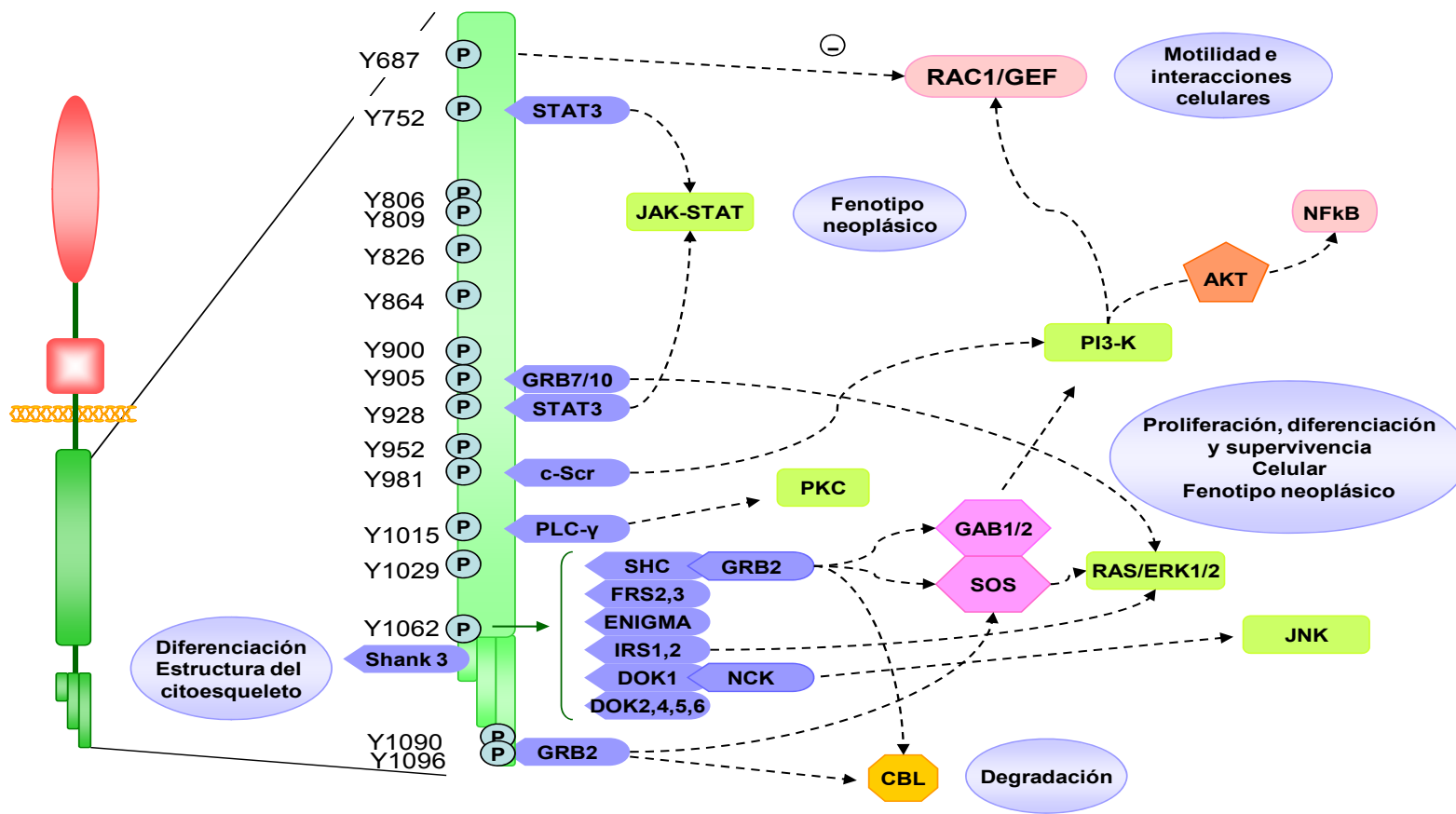


Figura A.6 Dominio tirosín-kinasa de RET: tirosinas susceptibles de fosforilación, unión de moléculas adaptadoras y rutas de señalización intracelular.

A.1.2.2. Ruta de señalización de las Endotelinas

Se ha demostrado que la señalización mediada por endotelina 3 (EDN3) y su receptor EDNRB (*Endothelin receptor type B*), es necesaria para el desarrollo de las células derivadas de la cresta neural destinadas a inervar el colon (Chakravarti, 1996; Martucciello et al., 2000). Existen en humanos 3 endotelinas distintas (EDN1, EDN2 y EDN3) codificadas por 3 genes independientes (Inoue et al., 1989). Estas proteínas son mensajeros intercelulares de acción local que actúan a través de receptores de membrana específicos EDNR α y EDNR β , ambos pertenecientes a la superfamilia de receptores unidos a proteína G. Estos receptores se clasifican por su afinidad a ligando; EDNR α tiene alta afinidad por EDN1 y EDN2, y baja afinidad por EDN3, mientras que EDNR β tiene afinidad similar por los tres ligandos (Sakurai et al., 1992). Este sistema de señalización en adultos es importante para la regulación de la presión sanguínea y el tono microvascular. También participa en la proliferación e hipertrofia de las células musculares del endotelio y los miocitos cardiacos, la broncoconstricción, liberación del péptido natriurético desde el atrio, inhibición de la liberación de renina por parte del glómerulo, liberación de aldosterona por las células adrenocorticales y la proliferación de astrocitos entre otras funciones (Davenport, 2002). Sin embargo, durante la embriogénesis participa en otros procesos como la regulación de la morfogénesis y en concreto de las estructuras derivadas de la cresta neural (Kurihara et al., 1995). En este sentido EDNR α está implicado en la formación de los septos cardiacos aórtico-pulmonar y cono-truncal a partir de las células derivadas de la cresta neural vagal, y en general del ectomesénquima que son las células mesenquimales derivadas de la cresta neural cefálica y vagal (Le Douarin y Kalcheim, 1999). Sin embargo, EDNRB está implicado en el desarrollo de los ganglios entéricos y los melanocitos a partir de las células derivadas de la cresta neural a nivel troncal, vagal y sacro (Pla y Laure, 2003).

El gen *EDNRB* se localiza en humanos en el cromosoma 13q22 (Puffenberger et al., 1994) y codifica para un receptor unido a proteína G con 7 dominios transmembrana (Figura A.7). Este gen se expande a lo largo de 24kb en el genoma y se estructura en 7 exones con unos tamaños comprendidos entre 109 y 2855pb (Arai et al., 1993). La especificidad de unión ligando/receptor viene determinada por la estructura del receptor, concretamente por los dominios transmembrana del IV al VI, mientras que los

dominios transmembrana del I al III y el VII están más implicados en la transmisión de la señal de unión del ligando hacia el interior de la célula (Masaki et al., 1999). Este receptor se expresa en la cresta neural y en varios linajes de células derivadas de la cresta neural. Su expresión es muy temprana antes de que comience la migración celular y se mantiene después de que dichas células hayan colonizado sus tejidos diana (Brand et al., 1998; Woodward et al., 2000). En los primeros estadios, *EDNRB* se expresa en todas las células de la cresta neural vagal y troncal, aunque más adelante sólo lo hace en aquellas que migran a lo largo de la ruta dorso-ventral y después en la mayor parte de los derivados a los que dan lugar, como células adrenomedulares y ganglios de SNP incluyendo a los del SNE (Nataf et al., 1996). Dentro del tracto gastro-intestinal, en vertebrados, *EDNRB* no sólo se expresa en las células derivadas de la cresta neural, sino también en las células del mesénquima (Parichy et al., 2000). La disrupción de la ruta de señalización EDN3/EDNR β provoca fallos en la diferenciación, migración, proliferación y supervivencia de los precursores de los melanocitos y de los ganglios entéricos. De hecho, mutaciones en ambos genes en humanos se han relacionado con patologías que comprometen la integridad de los melanocitos tanto de la piel como del oído interno y de las células de los ganglios entéricos, dando lugar a defectos pigmentarios, sordera y aganglioneosis colónica respectivamente (Edery et al., 1996; Puffenberger et al., 1994; Hofstra et al., 1996; Bidau et al., 1997).

Las endotelinas son proteínas secretadas que se producen como precursores de mayor tamaño inactivos (preproendotelinas). Dichos precursores han de ser cortados por proteasas en dos puntos distintos para generar una proteína de 21 aminoácidos con actividad biológica que se excreta al medio extracelular. La acción proteolítica de la metaloproteasa ECE1 (*Endothelin-Converting Enzyme 1*) es la responsable del procesamiento de las endotelinas, concretamente del segundo corte proteolítico. Antes la preproendotelina tendrá que ser cortada por la enzima furina que dará lugar a un precursor inactivo de la endotelina. A pesar de que EDNR β se puede unir a EDN1, 2 y 3, en el desarrollo del SNE el principal ligando para los precursores neurales es EDN3, la única endotelina que producen las células mesenquimáticas del tracto digestivo en cantidad suficiente (Brand et al., 1998; Nataf et al., 1998; Leibl et al., 1999). Tanto *EDN3* localizado en 20q13.2-13.3, como *ECE* en 1p36.1, se expresan en las células del mesénquima entérico.

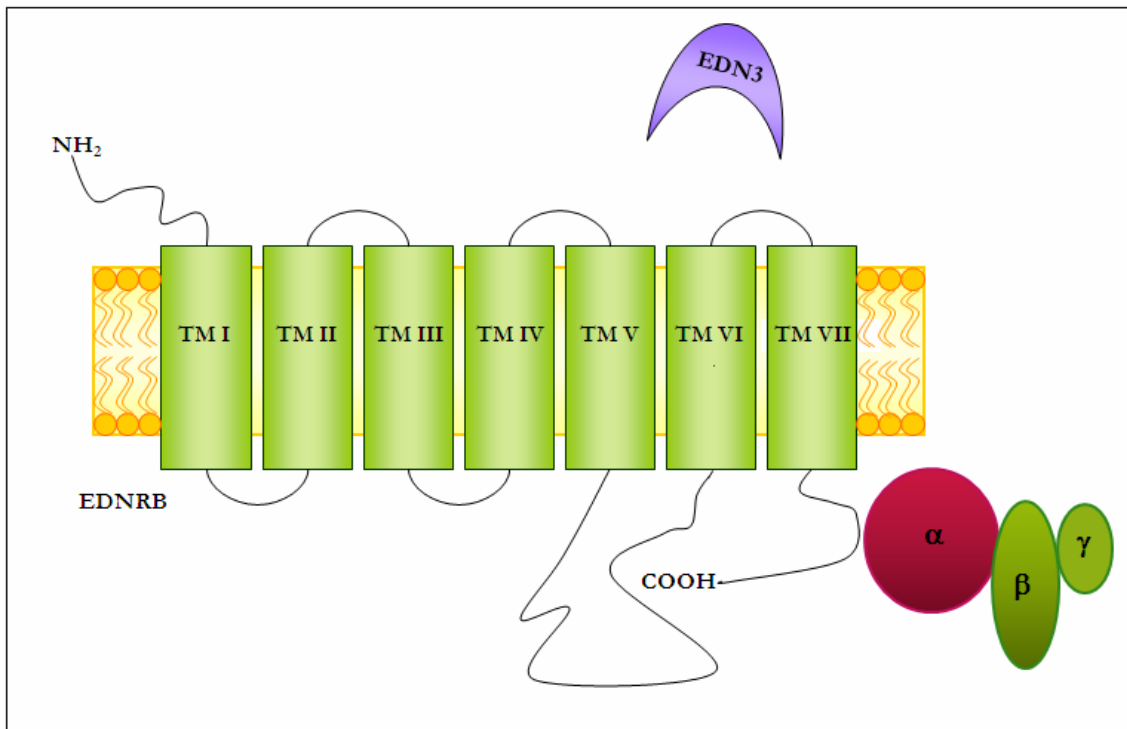


Figura A.7 Representación esquemática del receptor de membrana unido a proteína G EDNRB con sus 7 dominios trans-membrana. TM I-VII: Dominios tran-membrana; α , β , γ : Subunidades α , β y γ de la proteína G, respectivamente

Los receptores unidos a proteína G, conforman una numerosa familia de receptores que transducen distintas señales al interior celular. La unión del ligando a estos receptores promueve un cambio conformacional en ellos que hace que se reclute la proteína G, que en estado de reposo permanece unida a membrana celular. La proteína G consta de 3 subunidades α , β y γ y la unión al receptor promueve su activación. Este proceso iniciará una cascada de señalización intracelular determinada que depende del tipo de receptor y de proteína G (Figura A.8). En el caso de EDNR β , la transducción de señales implica la activación de PLC- β con el consecuente aumento de los niveles intracelulares de Ca_2^+ mediante el aumento de los niveles de IP3 y DAG, estando dicha respuesta mediada por la proteína Gq (Kloog y Sokolovsky, 1989; Simosons y Duna, 1990). Esta ruta de señalización es necesaria para la activación de la ruta ERK/MAPK (Cramer et al., 2001). Se ha demostrado que EDNR β es capaz de unirse a distintos tipos de proteína (Gq, G11, G13, Gs y Gi), y esto podría explicar cierta plasticidad funcional a la hora de transmitir distintos tipos de señales (Takigawa et al., 1995; Liu y Wu, 2003). Así, por ejemplo, la estimulación de EDNR β también puede disminuir los niveles de AMPc por medio de la regulación de la adenilato ciclasa mediante Gi (Takigawa et al., 1995; Masaki et al., 1999). Aunque todos los dominios intracelulares del

receptor participan en la unión de las distintas proteínas G, en algunos casos se conocen los sitios e incluso los residuos aminoacídicos críticos, para que tenga lugar dicha unión, como el tercer dominio intracelular para la unión de la subunidad α de la proteína Gi (Takagi et al., 1995), o los residuos M128, R129 y N130 para la unión a $G_{\alpha 13}$.

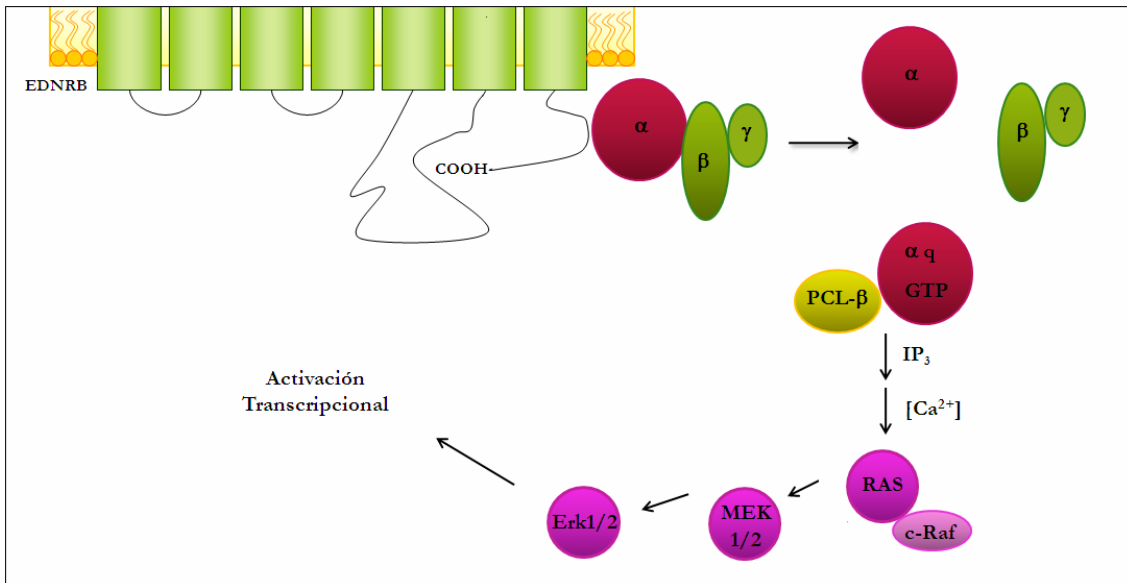


Figura A.8 Cascada de señalización intracelular activada por EDNRB.

El efecto de la EDN3 en el desarrollo del SNE es sutil. De hecho, la adición de EDN3 al medio de cultivo en el que crecen precursores de SNE tiene muy poco, o ningún, efecto sobre los mismos. Sin embargo, si se añade EDN3 en presencia de GDNF a este mismo cultivo, inhibe la diferenciación hacia neuronas mediada por GDNF (Hearn et al., 1998). Esto tiene una importancia fisiológica evidente cuando pensamos en el patrón de expresión de GDNF durante el proceso de formación del SNE. Los mayores niveles de expresión de GDNF se producen en el ciego (Natarajan et al., 2002), por lo que, si no intervinieran otros factores, los precursores neurales no podrían progresar hasta las regiones distales del colon, ya que los altos niveles de GDNF en el intestino ciego, mucho más elevados que en el resto del colon, los retendrían en a dicha región. Se ha propuesto la acción de la ruta de señalización EDN3/EDNRB para salvar este problema (Barlow et al., 2003), ya que EDN3 inhibe la quimioatracción que GDNF ejerce sobre los precursores entéricos (Kruger et al., 2003). Además, se ha descrito que el pico de expresión de la EDN3 durante el desarrollo del SNE está próximo, o justo por delante, del

frente de avance de los precursores en su movimiento migratorio (Barlow et al., 2003). Por otra parte, hay que tener en cuenta la población de células derivadas de la cresta neural sacra que colonizan la región distal del intestino sin atravesar el ciego, para tener una visión global del proceso de formación de SNE y cómo este está finamente regulado. Para la correcta formación del SNE en el colon es necesaria la presencia de neuronas y glía que proceden tanto de la cresta neural vagal como de la sacra (Kapur et al., 1992). El papel de EDN3 sobre las células derivadas de la cresta neural sacra durante el desarrollo del SNE, puede adivinarse en el modelo de ratón deficiente en EDN3 (Rothman et al., 1984; Payatte et al., 1987), en el que se han observado ganglios ectópicos en la región pélvica fuera del intestino. Este hallazgo puede deberse a una parada prematura de la migración de dichas células.

El efecto inhibitor o retardador de la diferenciación que ejerce EDN3 sobre los precursores neurales, no parece ser específico del proceso de diferenciación que inicia GDNF, sino que también se ha observado con otros factores neurotróficos (Newgreen y Young, 2002a). Tampoco es exclusivo del proceso de neurogénesis entérica, ya que es capaz de retrasar la diferenciación de células de la cresta neural hacia melanocitos (Lahav et al., 1996). El mantener las células indiferenciadas durante más tiempo tiene efectos sobre el número final de neuronas, ya que la tasa de mitosis de las células indiferenciadas es mayor que la de las células que están comprometidas. Se ha observado un mayor número tanto de melanocitos, como de células gliales de Schwann derivadas de cresta neural, cuando los precursores de las que proceden habían sido tratados con EDN3 (Maxwell et al., 1976; Brennan et al., 2000). En el caso concreto del SNE, *EDN3* se expresa en las células del mesénquima intestinal y activa a su receptor ($EDNR\beta$), presente en las células de la cresta neural que acaban de invadir el intestino en desarrollo, manteniéndose esta expresión durante su migración a lo largo del tubo digestivo (Baynash, 1994; Leibl et al., 1999; Wu et al., 1999). Se ha propuesto que la activación de esta ruta durante la fase de colonización del intestino en desarrollo parece crucial para la completa migración de los precursores entéricos hasta la parte distal del tubo digestivo (Wu et al., 1999), aunque se ha observado muy recientemente que la mayor parte de neuronas entéricas inmaduras muestran, al igual que sus precursores, comportamientos migratorios (Hao et al., 2009). En ausencia de esta vía de señalización la población de precursores neurales se diferencian completamente a neuronas de manera prematura antes de colonizar la región más distal del intestino (Hearn et al., 1998). Esto se ha demostrado utilizando antagonistas de EDN3 que

bloquean a su receptor en ratones, observándose aganglionosis en la región distal del colon (Woodward et al., 2000).

Aunque la actividad inhibidora de la diferenciación de EDN3 está probada, se ha detectado su presencia en regiones rostrales del intestino, en el ciego y en toda la extensión del colon. Además se ha observado que, al menos *in vitro*, EDN3 aumenta la capacidad de GDNF, de inducir proliferación de los precursores neurales, e impide la auto-renovación de las células madre derivadas de cresta neural (Barlow et al., 2003). Por todo ello, parece esencial que la interacción de EDNRB con RET esté regulada de forma precisa durante el desarrollo del SNE. Si la acción de EDNRB fuera opuesta a la quimioatracción de GDNF sobre las células derivadas de la cresta neural, en las regiones rostrales del tracto gastrointestinal el intestino nunca sería colonizado en toda su extensión. Este problema podría solucionarse con un aumento de la expresión de EDNRB regulada de forma espacio-temporal a medida que los precursores se aproximan al ciego. Esta fina regulación puede llevarla a cabo el factor de transcripción SOX10, entre otros (Zhu et al., 2004). Por lo tanto, parece que EDNR β y RET ejercen, en sinergia y según el estadio del desarrollo, el mismo efecto sobre la proliferación de los precursores derivados de cresta neural, y por otra parte efectos antagónicos sobre la migración celular (Heuckeroth, 2003). Probablemente existan otros factores que, añadidos a estas dos vías de señalización, expliquen este comportamiento. Por ejemplo, la diferenciación prematura de los precursores hacia neuronas entéricas, en ausencia de la ruta de señalización EDN3/EDNR β , se puede explicar con la presencia de otros mecanismos adicionales. Los precursores de músculo liso del colon también expresan EDNR β y su ausencia retrasa la diferenciación muscular (Rothman et al., 1996); este fenómeno provoca un incremento en la secreción de laminina-1, que promueve neurogénesis.

Ratones *Edn3*^{-/-}, *EdnrB*^{-/-}, ya sean mutantes espontáneos (*Lethal spotting* en *Edn3* y *Piebald letal* en *EdnrB*) o dirigidos, presentan un fenotipo similar, caracterizándose por la ausencia de neuronas entéricas en la porción distal de tubo digestivo (Hosoda et al., 1994; Baynash et al., 1994). No obstante, en el caso de la disrupción de *Edn3* el fenotipo entérico es menos severo (Baynash et al., 1994), y la región agangliónica más corta, lo que hace pensar en una posible compensación parcial por parte de otras endotelinas. El mutante *spotting lethal* en ratas, presenta un fenotipo similar debido a la inactivación del gen *EdnrB* (Garipey et al., 1998), y lo mismo ocurre en el caso del mutante natural en caballos (*lethal white foal syndrome*; LWFS) (Yang et

al., 1998; Santschi et al., 1998; Metallinos et al., 1998). Ya que ECE-1 es necesario para la activación de EDN3, no es sorprendente que la disrupción de este gen en modelos animales tenga las mismas consecuencias fenotípicas que los mutantes *End3^{-/-}* o *EdnrB^{-/-}* a nivel de SNE (Yanagisawa et al., 1998). Como ECE-1 también es necesario para la correcta activación de EDN1 y EDN2, estos ratones tienen de manera adicional defectos cardíacos y craneofaciales (Yanagisawa et al., 1998).

A.1.2.3. Ruta de señalización de las Neurotrofinas

Las neurotrofinas son miembros de una familia altamente conservada de factores neurotróficos que participan en la regulación de la proliferación, diferenciación, supervivencia y función de diferentes tipos celulares del SNC y SNP de mamíferos (Levi-Montalcini, 1987; Huang y Reichardt, 2001). Esta familia incluye al factor de crecimiento neuronal (*nerve growth factor*, NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (*brain derived neurotrophic factor*, BDNF), neurotrofina 3 (NTF3), neurotrofina 4/5 (NTF4/5), neurotrofina 6 (NTF6) y neurotrofina 7 (NTF7) (Barde, 1991; Huang y Reichardt, 2001). Sin embargo, NTF-6 y NTF-7 solamente han sido identificadas en peces y probablemente no se encuentren en mamíferos ni aves (Huang y Reichardt, 2001). Todos los miembros de la familia se sintetizan como precursores que, tras rotura enzimática, se convierten en la proteína madura homodimérica. Las neurotrofinas se unen a dos tipos distintos de receptores transmembrana para ejercer su acción en la célula: los receptores tirosín-kinasa NTRK (*neurotrophin tropomyosin receptor kinase*) y el receptor p75 (*pan-neurotrophin receptor*) (Barbacid, 1991, 1993, 1994; Meakin y Shooter, 1992; Chao, 1992; Chao, 1994; Figura A.9). Este sistema dual permite la transducción de señales muy diferentes, que puede llevar a rutas de señalización intracelular tan opuestas como la muerte celular a través de p75 o la supervivencia a través de los receptores TRK.

En mamíferos se han identificado tres receptores NTRK designados como NTRK1, NTRK2 y NTRK3 (también conocidos como TRKA, TRKB y TRKC). Estos receptores muestran patrones de expresión específicos en el sistema nervioso, lo que sugiere un papel en el desarrollo y función neuronal (Huang y Reichardt, 2003). Los receptores NTRK son glicoproteínas transmembrana de aproximadamente 140 KDa y presentan un dominio tirosín kinasa altamente conservado, mientras que el dominio extracelular es más divergente y participa

en la unión al ligando y la dimerización del receptor (Kaplan et al., 1991; Barbacid et al., 1991, 1993). El dominio extracelular de unión a ligando contiene tres motivos ricos en leucina (LRR1-3), dos motivos cisteínicos (C1 y C2), y dos dominios de homología a inmunoglobulinas (Ig1, Ig2) (Schneider y Schweiger, 1991). Es el dominio Ig2 el que determina la especificidad de unión receptor/ligando (Urfer et al., 1995, 1998). Cada receptor NTRK tiene preferencia por una neurotrofina: los receptores NTRK1 y NTRK3 se unen y responden *in vitro* preferentemente a NGF y NTF3 respectivamente (Kaplan et al., 1991; Lamballe et al., 1991), mientras que NTRK2 interacciona *in vitro* con BDNF y NTF4/5 (Ip et al., 1992).

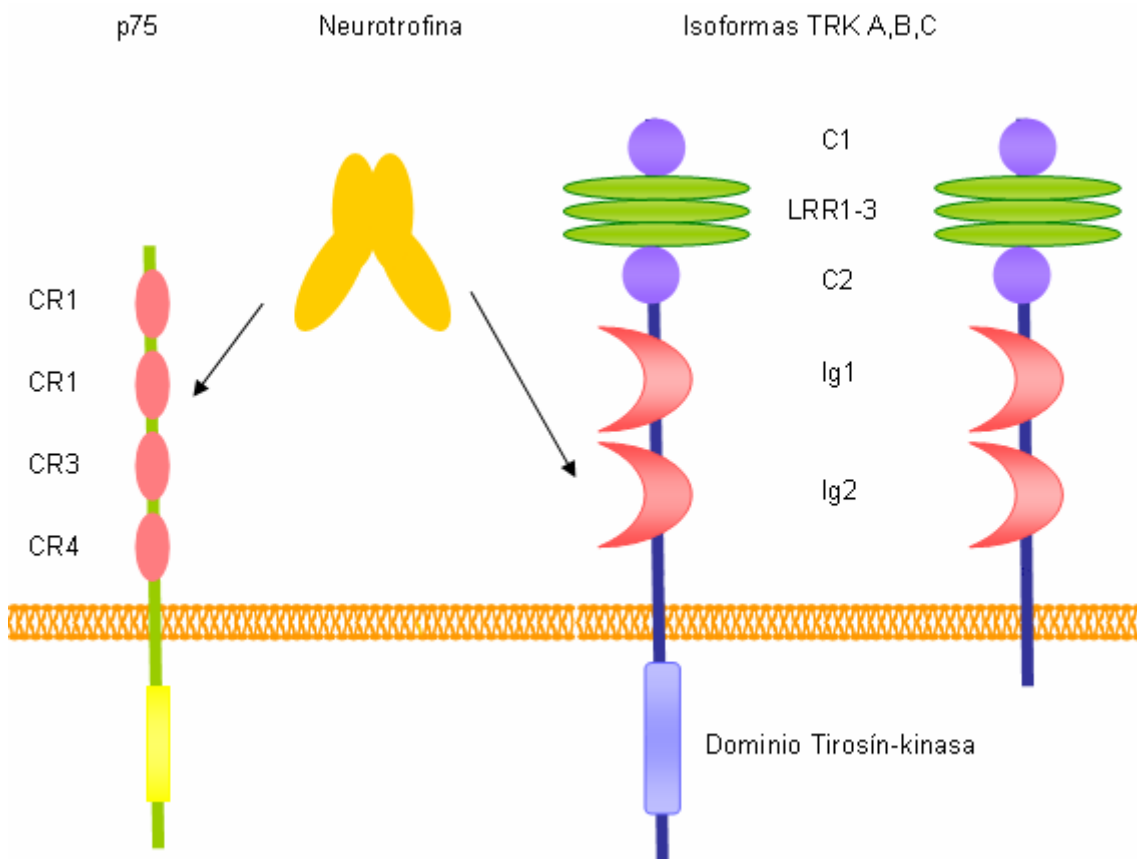


Figura A.9 Interacciones entre las neurotrofinas y sus receptores. LRR1-3: Motivos ricos en leucina para unión ligando/receptor; C1, C2: Motivos cisteínicos; Ig1, Ig2: Dominios con homología a inmunoglobulinas; CR1-4: Motivos ricos en cisteínas.

La cascada de señalización de las neurotrofinas se inicia con la unión al dominio extracelular de los receptores NTRK que lleva a la activación de estos mediante dimerización, y tiene como resultado la autofosforilación de los residuos tirosínicos del dominio tirosín-kinasa (Kaplan et al., 1991). Como otros

receptores tirosín-kinasa, la fosforilación de las tirosinas citoplasmáticas de los receptores TRK tras su unión a ligando regula la actividad kinasa y proporciona sitios de unión para proteínas adaptadoras que median el inicio de la señalización intracelular (Figura A.10). Los receptores NTRK contienen en su región citoplasmática 10 residuos tirosínicos altamente conservados. Tres de estos residuos se localizan en el denominado "bucle de activación" del dominio tirosín-kinasa (Cunningham y Greene, 1998) y su fosforilación conduce a un cambio conformacional en el receptor que tiene como resultado la fosforilación de otros residuos tirosínicos. Esto desencadena la activación de las distintas cascadas de señalización mediante la generación de sitios de unión para proteínas adaptadoras con dominios SH2 y PTB (Pawson y Nash, 2000). Distintos estudios han demostrado que existen dos residuos tirosínicos específicos fuera del "bucle de activación", uno localizado justo después del dominio transmembrana y otro en la región carboxi-terminal, que actúan como principales sitios de unión de proteínas adaptadoras. Así, SHC y FRS2 se unen a Y490, mientras que la PLC se une a Y785, activándose tres rutas principales de señalización intracelular: Ras/ERK, PI3K/AKT y PKC (Kaplan y Stephens, 1994; Stephens et al., 1994; Obermeier et al., 1994). Tal y como se ha descrito previamente, estas rutas de señalización desencadenan proliferación, diferenciación y supervivencia celular.

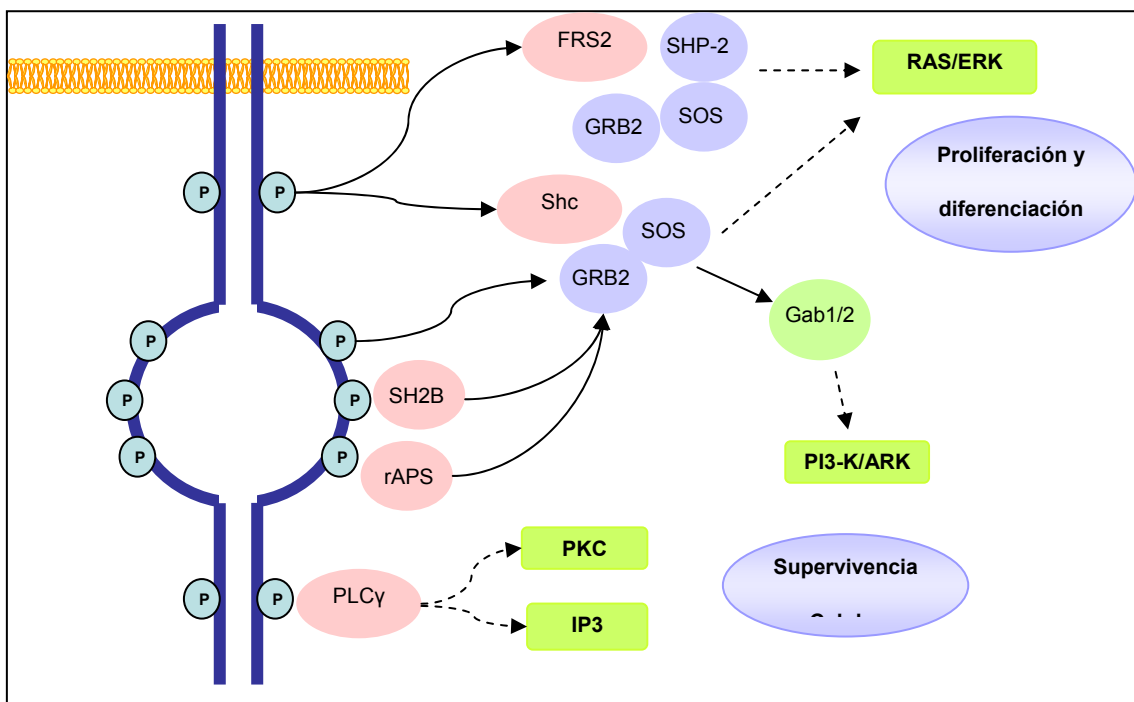


Figura A.10 Dominio tirosín-kinasa de los receptores TRK: tirosinas susceptibles de fosforilación, unión de moléculas adaptadoras y rutas de señalización intracelular.

Además de la familia de receptores NTRK, todas las neurotrofinas se unen con baja afinidad a la glicoproteína transmembrana p75, que no posee dominio tirosín-kinasa (Rodríguez-Tebar et al., 1991). La proteína p75 es miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) (Chao, 1994; Bothwell, 1995). El dominio extracelular consiste en 4 motivos ricos en cisteínas (C1-C4) que forman el dominio de unión a ligando. Se ha comprobado que tanto C2 como C3 estarían implicados en la unión de las distintas neurotrofinas (Bibel y Barde, 2000; Huang y Reichardt, 2003). El dominio citoplasmático de este receptor contiene un dominio de "muerte" similar estructuralmente a los otros miembros de esta familia de receptores (Liepinsch et al., 1997) y se ha demostrado que esta proteína transmite señales importantes para determinar qué neuronas sobreviven durante el desarrollo (Huang y Reichardt, 2001). Según el tipo celular, p75 puede activar tanto rutas de señalización que promueven supervivencia como rutas que inducen muerte celular mediante apoptosis (Frade y Barde, 1998; Friedman, 2000; Huang y Reichardt, 2003). La señal de supervivencia inducida por p75 esta mediada por la activación de NFκB (Hamanoue et al., 1999; Wooten et al., 2001; Roux et al., 2001), mientras que la activación de la apoptosis se realiza a través de JNK y la inhibición de las rutas Ras/ERK, PI3-K, PKC (Muller et al., 1998; Mukai et al., 2000; Salehi et al., 2000). Esta regulación de la apoptosis mediante p75 parece crucial en el desarrollo del SNP y SNC (Bamji et al., 1998; Casademunt et al., 1999). Se ha observado que el receptor p75 puede interactuar con los diferentes receptores NTRK, modulando de este modo la acción de las neurotrofinas (Friedman y Greene, 1999; Huang y Reichardt, 2003).

La NTF3 es necesaria para la diferenciación y supervivencia de una subpoblación de neuronas entéricas (Chalazonitis et al., 2001). Se ha demostrado, mediante estudios *in vitro*, la acción biológica de NTF3 sobre los precursores de las células nerviosas entéricas. En contraposición con lo que ocurre con otros factores neurotróficos como GDNF, NTF3 no estimula la proliferación y diferenciación de los precursores de la cresta neural en los primeros estadios del desarrollo, pero sí se ha visto que promueve la diferenciación de neuronas y glía en estadios posteriores a través de sus receptores NTRK3 y p75 (Chalazonitis et al., 1994, 1998a, 2001). También se ha observado que es capaz de promover el desarrollo y crecimiento de neuritas *in vitro* en precursores aislados del tracto intestinal en formación una vez que habían estado expuestos al microambiente del mesénquima intestinal, y habían perdido su capacidad proliferativa (Saffrey et al., 2000). Esto concuerda con estudios de expresión que indican la presencia de altos niveles de mRNA del

receptor NTRK3 en estadios tardíos del desarrollo del SNE en embriones de mamíferos (Tessarollo et al., 1993) y un aumento del número de precursores entéricos que expresan este receptor en respuesta a GDNF (Chalazonitis et al., 1998a). Por tanto, GDNF y NTF3 son componentes de dos rutas de señalización que actúan secuencialmente durante la embriogénesis para promover la neurogénesis del intestino de mamíferos. La ruta de señalización de las neurotrofinas, se considera un factor de actuación tardía dentro del programa de desarrollo del SNE. Esta puede ser la razón de que el plexo submucoso, que aparece con posterioridad, sea más dependiente de NTF3 que el mientérico (Chalazonitis et al., 2001).

Por otra parte, ratones *Ntf3*^{-/-} y *TrkC*^{-/-} simplemente presentan un número reducido de neuronas entéricas, posiblemente debido al efecto de estos genes sólo en un grupo reducido de precursores entéricos en los estadios finales del desarrollo del SNE (Chalazonitis et al., 2001). Estudios realizados en estos modelos animales han demostrado que hay una pérdida neuronal en los plexos mientérico y submucoso en aquellos ratones que carecían de la ruta de señalización *Ntf3/Ntrk3* y una hiperplasia selectiva en el plexo mientérico en ratones que sobreexpresaban *Ntf3* (Chalazonitis, 2004).

A.1.2.4. Factor de transcripción *SOX10*

SOX10 (*Sex determining region Y box 10*) es uno de los miembros de una gran familia proteica que se define por la presencia de un dominio común HMG (*Hight mobility group*), fundamental para la unión a DNA. La familia SOX incluye a más de 20 proteínas que tienen un papel fundamental en el desarrollo de distintos procesos embrionarios, como la determinación del sexo, diferenciación condrogénica o la hematopoyesis (Wegner, 1999). Concretamente, *SOX10* se identificó por primera vez por su papel en el desarrollo de testículos tanto en humanos como en ratones (Gubbay et al., 1990), y junto a *SOX8* y *SOX9*, conforman la subfamilia proteica SOXE. Estudios de expresión en ratones mostraron que *SOX10* está presente en los precursores entéricos tanto de neuronas como de glía y parece estar implicado en la supervivencia de éstos (Southard-Smith, 1998). También se ha detectado su expresión en cresta neural craneal y en melanoblastos derivados de cresta neural en distintas especies (Cheng et al., 2000; Dutton et al., 2001; Aoki et al., 2003). En humanos se ha confirmado que *SOX10* se expresa tanto en las

células de la cresta neural en migración y sus derivados, como en los ganglios craneales y espinales (Bondurand et al., 1998).

El gen *SOX10* codifica para un factor de transcripción de 466 aminoácidos y 50 kDa aproximadamente (Figura A.11). El dominio de unión a DNA de SOX10 es el dominio HMG, consistente en tres regiones α -hélice que conforman el motivo de unión a DNA de giro en L (*Twisted L shape*). Este dominio se une al surco menor del DNA a través de un núcleo hidrofóbico altamente conservado, que además es responsable del mantenimiento de la estructura terciaria de la proteína (Hong y Saint-Jeannet., 2005). La conservación de este dominio a lo largo de toda la familia proteica SOX hace que todos los miembros de dicha familia reconozcan y se unan a un motivo muy similar de DNA cuya secuencia consenso es la siguiente (A/T)(A/T)CAA(A/T)G (Harvey et al., 1994). Justo antes del dominio HMG encontramos un dominio de dimerización, fundamental para la dimerización de SOX10 en los casos en los que actúa como homodímero (Bowles et al., 2000). Existen dos señales de localización nuclear independientes en la proteína, que están localizadas en ambos extremos del dominio de unión al DNA. Estas secuencias señal son fundamentales para la correcta translocación de SOX10 al núcleo de la célula donde debe ejercer su función. La proteína SOX10 también contiene un dominio de transactivación, una secuencia de 113 residuos aminoacídicos en la región carboxi-terminal que es necesaria para la activación transcripcional que ejerce esta proteína (Kuhlbrodt et al., 1998a).

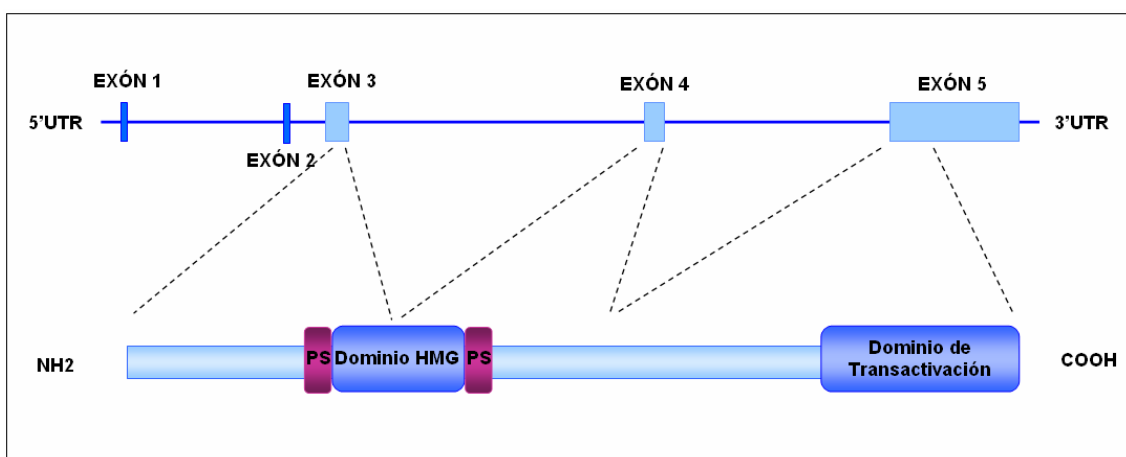


Figura A.11 Representación esquemática de la estructura genómica del gen *SOX10* y de la proteína que codifica. Se muestran los dominios funcionales de la proteína. PS: Péptido señal.

SOX10 ejerce su función uniéndose, solo o en combinación con otros factores de transcripción, a la región promotora de sus genes diana para promover su expresión (Kuhlbrodt et al., 1998b; Kamachi et al., 1999; Figura A.12). La unión de SOX10 a los ácidos nucleicos favorece en éstos un cambio conformacional, responsable del aumento de su expresión (Pontiaggia et al., 1994). Se ha propuesto que una de las funciones de SOX10 es la de mantener la estructura de la cromatina, favoreciendo la unión de otros factores de transcripción que actúa en combinación con SOX10 para modular la expresión genética de la célula (Werner y Burley, 1997). Por lo tanto, la unión de SOX10 puede reclutar la unión de otras proteínas que por sí solas no serían capaces de unirse al DNA, no sólo por el cambio de topología en el DNA sino también por interacción directa proteína-proteína (Wegner et al., 1999; Lang y Epstein, 2003; Figura A.12). Se conocen numerosos genes que son diana de la regulación de SOX10, algunos de los cuales son genes centrales en el desarrollo del SNE y de otras estructuras derivadas de la cresta neural, como *RET* y *EDNRB* (Lang y Epstein, 2003; Zhu et al., 2004). Así, por ejemplo, en el caso de *EDNRB*, se ha demostrado que SOX10 interacciona con el factor de transcripción SP1 para controlar su expresión (Yokohama et al., 2006). La interacción de SOX10 con distintos factores de transcripción para regular la expresión genética de la célula es un mecanismo bastante común. De hecho se ha demostrado que existe una interacción entre PAX3 y SOX10 para activar la transcripción de *RET* y *MITF* (Lang et al., 2000; Bondurand et al., 2001), siendo este último un gen fundamental para el desarrollo de melanocitos. Ambos factores de transcripción actúan de manera sinérgica para promover expresión en ambos casos, aunque de manera distinta. Para la activación de *RET* no es necesario que SOX10 se una de manera directa a la región promotora de este gen, sino que la unión de SOX10 a PAX3 aumenta la actividad transcripcional de *RET* con respecto a la unión de PAX3 únicamente al promotor de *RET* (Lang y Epstein, 2003), aunque el nivel de activación no será el mismo que cuando SOX10 se une de manera directa a la región promotora de *RET*. Existen otros muchos genes cuya expresión se ve modulada por SOX10, como *TYR*, *TRP2*, *MPZ*, *MPB*, o *GJB1*, (Kuhlbrodt et al., 1998; Peirano y Wegner, 2000; Bondurand et al., 2001; Scolt et al., 2002; Lang y Epstein, 2003; Ludwig et al., 2004; Murisier et al., 2007). Para controlar la expresión diferencial de toda esta batería de genes, SOX10 interacciona con otros factores de transcripción que serán distintos de un tipo celular a otro y de una fase del desarrollo a la otra, además se han identificado elementos reguladores específicos en el propio gen que modulan dicha expresión diferencial (Betancur et al., 2010).

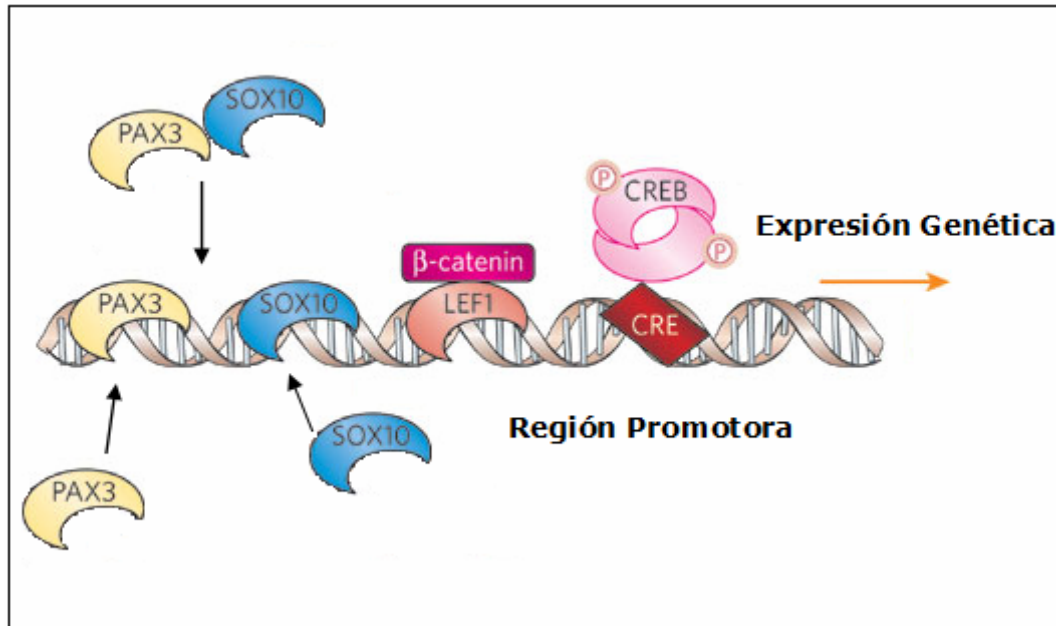


Figura A.12 Interacción de SOX10 con otros factores de transcripción para promover la expresión de sus genes diana.

SOX10 se expresa en los precursores neurales derivados de la cresta neural que darán lugar al SNE (Bondurand et al., 1998), sin embargo, durante el desarrollo de las neuronas entéricas se pierde la expresión de SOX10, que persiste en las células gliales (Young et al., 2003) y es muy importante para el proceso de gliogénesis (Paratore et al., 2001). La pérdida de expresión de SOX10 por parte de las células derivadas de cresta neural parece ser una señal de su transición desde precursor neural no comprometido, hacia precursor con cierto grado de compromiso para diferenciarse en neurona. Por otra parte el papel de SOX10 en la diferenciación de los precursores entéricos hacia glía se pone de manifiesto al sobre-expresar SOX10 en progenitores entéricos, ya que como consecuencia se disminuye la neurogénesis en estas células (Bondurand et al., 2006; Stanchina et al., 2006). La expresión de SOX10 en adulto se restringe a las zonas del SNC ricas en fibras mielinizadas por la presencia de células gliales, ganglios y fibras nerviosas del SNP y algunos tejidos glandulares como la glándula submandibular (Kuhlbrodt et al., 1998b). Todo esto indica que SOX10 modula la expresión de las células pluripotentes derivadas de la cresta neural que migran desde el tubo neural a lo largo de todo el embrión a través de varias rutas migratorias durante la embriogénesis, para dar lugar no sólo al SNE sino a una gran variedad de tejidos (Le Douarin y Kalcheim, 1999).

Se ha observado en ratones, que Sox10 actúa regulando la expresión espacio-temporal tanto de *Ret* como la de *Endrb* en las células de la cresta

neural (Bondurand et al., 2006). Parece que Sox10 tendría un efecto antagonista en las células de la cresta neural, promoviendo la expresión tanto de receptores que inducen diferenciación como de receptores que inducen el mantenimiento de las células en un estado indiferenciado. Una mutación que ocurre de manera natural en uno de los alelos del gen *Sox10* en ratones provoca el fenotipo llamado megacolon dominante (*Dom*, *Dominant megacolon*) y causa aganglionosis en el colon, defectos de pigmentación, así como pérdida de neuronas y glía en el SNP (Herbarth et al., 1998; Southard-Smith et al., 1999). Estos ratones sirven como modelo de síndrome de Waardenburg tipo4 (WS4; OMIM 277580) en humanos. De hecho se conocen numerosas mutaciones en este gen en pacientes con WS4 (Pingault et al., 1998) y síndrome de Waardenburg tipo2 (WS2; OMIM 193510) (Bondurand et al., 2007; Iso et al., 2008). Ambos síndromes consisten en alteraciones congénitas de las células pigmentarias derivadas de la cresta neural, presentes en la piel y el oído, dando como resultado sordera y anomalías pigmentarias, que en el caso de WS4 se combina con la enfermedad de Hirschsprung. La presencia de estructuras embrionarias derivadas de cresta neural en estos ratones mutantes sugiere que probablemente Sox10 no es necesario durante las primeras especificaciones de la cresta neural (Herbarth et al., 1998; Southard-Smith et al., 1998; Britsch et al., 2001; Paratore et al., 2002). Sin embargo, las células derivadas de la cresta neural una vez que llegan al órgano diana pueden migrar a lo largo del mismo en ausencia de actividad Sox10, pero sufren apoptosis antes de poder diferenciarse (Southard-Smith et al., 1998; Kapur et al., 1999). Esto sugiere que Sox10 podría actuar como factor de supervivencia en estas células. Estudios *in vivo* con células de la cresta neural de rata, indican que Sox10 es importante para mantener la pluripotencia de dichas células (Kim et al., 2003).

Por lo tanto, parece que SOX10 durante la embriogénesis es un factor muy importante para decidir el fenotipo celular con el que se comprometerá un precursor. Más adelante su expresión en los tejidos adultos indica que actúa como factor de supervivencia y mantenimiento de dicho fenotipo. Los datos sobre modelos animales carentes de Sox10, así como estudios mutacionales en distintas series de pacientes, señalan que la ausencia de SOX10 no sólo tiene consecuencias a nivel entérico, ya que es un factor necesario en la diferenciación de melanocitos y de células gliales a nivel de SNC. Por lo tanto la falta de células gliales debida a la pérdida de SOX10 puede generar en el individuo degeneración severa de las motoneuronas sensoriales y patologías

nerviosas que comprometen las fibras de mielina en el SNC y SNP (Britsch et al., 2001).

A.1.2.5. Otros factores de transcripción

Por otra parte, la expresión de otros factores de transcripción, además de *SOX10*, también parece crucial para el desarrollo del SNE (Bates, 2002; Newgreen y Young, 2002a). Entre esos factores de transcripción se encuentran *PAX3*, *MASH1*, *PHOX2B* y *HOX11L1*.

PAX3 (*Paired-box-containing*) se expresa en distintos tipos celulares derivados de la cresta neural, incluyendo neuronas entéricas (Lang et al., 2000). Ratones *Pax3*^{-/-} mueren durante el período de gestación debido a defectos cardíacos y en el tubo neural, y presentan ausencia de neuronas en el SNE (Lang et al., 2000). Parece que *PAX3* es esencial para iniciar la expresión de *RET* en los precursores entéricos. Se ha visto que en el desarrollo del SNE, *PAX3* coopera con *SOX10* para activar la transcripción de *RET* (Lang et al., 2000; Bondurand et al., 2000; Lang y Epstein, 2003).

MASH1 (*Mammalian achaete-scute homologue 1*) está implicado en la neurogénesis tanto del SNC como del SNP, y se ha visto que durante el desarrollo embrionario se expresa en diferentes células derivadas de la cresta neural, incluidas aquellas que van a colonizar el tubo digestivo (Lo et al., 1991). Se considera un factor de actuación tardía en el desarrollo del SNE y su carencia da lugar a lesiones muy localizadas (Blaugrund et al., 1996). Ratones *Mash1*^{-/-} carecen de neuronas entéricas en el esófago y se ha visto que las células de la cresta neural son capaces de migrar hasta su correcta localización, pero fallan al diferenciarse en ciertos tipos neuronales (Guillemot et al., 1993). Por tanto, parece que *MASH1* es necesario para la diferenciación de los precursores neuronales hacia neuronas de tipo serotoninérgicas, pero no para la migración de las células de la cresta neural (Pham et al., 1991; Blaugrund et al., 1996).

PHOX2B (*Paired-like Homeobox 2B*) codifica para otro factor de transcripción que se expresa en el SNC y SNP durante el desarrollo embrionario y en los ganglios entéricos en fase adulta, y que regula la expresión tanto de *MASH1* como de *RET* (Leon et al., 2009). *PHOX2B* junto con *PHOX2A* entre otros conforman un extenso grupo de proteínas llamadas en su conjunto *HOX*.

Estas proteínas juegan un papel muy importante en el control del modelado de distintos órganos en el embrión, incluyendo al sistema gastro-intestinal (Kapur et al., 2004). Los precursores entéricos que derivan de la cresta neural vagal y sacra, expresan este factor de transcripción (Pattyn et al., 1999) y parece que juega un papel fundamental en el desarrollo de estos precursores. Se ha observado que los ratones *Phox2b*^{-/-} carecen de sistema nervioso autónomo, incluyendo el SNE que está ausente a lo largo de todo el tracto gastrointestinal (Pattyn et al., 1999). En estos ratones las células de la cresta neural llegan a la parte anterior del intestino, pero no son capaces de migrar más allá, probablemente como consecuencia de la falta de expresión de *Ret* (Pattyn et al., 1999).

HOX11L.1 (*Homeobox transcription factor*) se expresa en neuronas del SNE tanto en la etapa de desarrollo como durante la etapa adulta, además de neuronas no entéricas derivadas de cresta neural. Ratones *Hox11L.1*^{-/-} nacen sin ningún defecto morfológico aparente pero desarrollan megacolon a las pocas semanas de vida, observándose anomalías en el tamaño y distribución de ganglios y neuronas entéricas (Hatano et al., 1997; Shirasawa et al., 1997). Esto sugiere que HOX11L.1 es necesario para el mantenimiento y el funcionamiento correcto de SNE, jugando un papel importante en la regulación postnatal de la apoptosis.

ZFHX1B (*Zinc Finger Homeobox 1B*, también conocido como *ZEB2* o *SIP1*) es un factor de transcripción importante en la especificación neural (Nitta et al., 2007). Esta proteína se expresa en los precursores entéricos vagales hasta el momento de la colonización del digestivo, y más tarde en el desarrollo en todo el SNE (Van de Putte et al., 2007). Ratones *Zfhx1B*^{-/-} muestran aganglionosis intestinal en el momento del nacimiento, entre otras malformaciones (Van de Putte et al., 2003). Recientemente se ha demostrado que *Zfhx1B* y *Sox10* interaccionan para la correcta formación del SNE (Stanchina et al., 2010), poniendo de manifiesto la importancia de dicha proteína en el desarrollo del SNE.

HAND2 (*Heart and neural crest derivatives expressed protein*) es esencial para la diferenciación tanto de estructuras extra-embriónicas como embriónicas, incluyendo al intestino y a otros tejidos derivados de la cresta neural (Wu et al., 2002; D'Autreaux et al., 2004). Se conoce muy poco sobre el mecanismo de acción de esta proteína que forma parte de una red de factores de transcripción que se regulan de manera cruzada, incluyendo además de *HAND2* a *MASH1*, *PHOX2A* y *PHOX2B* entre otros (Gershon y Ratcliffe, 2006).

Ratones *Hand2^{-/-}* contienen precursores neurales en todo el intestino, pero éstos no llegan a diferenciarse de manera correcta (D'Autreaux et al., 2004). Los precursores aislados del intestino en formación de estos ratones mutantes no son capaces de diferenciarse a neuronas ni a glía *in vitro* (D'Autreaux et al., 2004). Así pues, parece que HAND2 es necesaria para la neurogénesis durante la formación del SNE y para el mantenimiento de las células gliales entéricas.

A.1.2.6. Otros factores implicados en la formación del SNE

Como hemos visto, en los últimos años se ha avanzado mucho en la identificación de genes y moléculas que son críticas para el desarrollo del SNE (Young et al., 2008; Burzynski et al., 2009). Sin embargo, aún sigue siendo un misterio cómo las señales procedentes del mesénquima y los factores intrínsecos de las células derivadas de la cresta neural se integran espacial y temporalmente para dar lugar a la colonización uniforme del intestino por parte de las células derivadas de la cresta neural y configurar los ganglios entéricos para establecer los circuitos neuronales indispensables en el correcto funcionamiento del SNE. En este sentido se han identificado un número creciente de factores que participan en este proceso.

Proteínas Morfogenéticas Óseas

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs, *Bone Morphogenetic Proteins*) comprenden un subgrupo de la familia TGF- β de moléculas señalizadoras secretadas. La unión de los BMPs a sus receptores promueve la cascada de señalización dependiente de SMAD (Zwijsen et al., 2003). Se ha demostrado que la señalización mediada por BMP-2 y BMP-4 es fundamental en las interacciones tempranas entre el epitelio y el mesénquima que tienen lugar durante la morfogénesis del intestino (Roberts et al., 1995, 1998). Dicha señalización sigue siendo importante durante la etapa adulta, en la que las BMPs se expresan en la lámina propia y son importantes para la formación de las células epiteliales del colon (Hardwick et al., 2004).

Se ha observado que BMP-2 y BMP-4 son capaces de promover diferenciación neuronal sobre células derivadas de la cresta neural *in vitro*, de manera dosis dependiente, en unos límites de concentración muy estrictos

(Chalazonitis et al., 2004). Se ha propuesto que esta acción de los BMPs de estimular neurogénesis se lleva a cabo a través del aumento de la expresión de *HAND2* (Wu et al., 2002). Además las BMPs interactúan con GDNF para promover diferenciación neuronal y por lo tanto, inhiben la acción de GDNF sobre la proliferación de los precursores derivados de la cresta neural (Wu et al., 2002). Esto hace que se reduzca el número final de neuronas en el SNE. También se ha demostrado que BMP modula la respuesta migratoria de los precursores derivados de cresta neural a la presencia de GDNF (Goldstein et al., 2005). De hecho, la falta de señalización mediada por *Bmp4* en embriones de pollo retrasa la migración de los precursores, aunque no provoca aganglionosis distal del colon sino hipoganglionosis y reducción del tamaño de dichos ganglios (Goldstein et al., 2005), demostrando así el papel fisiológico de las BMPs para la determinación del número final de neuronas en el SNE y la formación de los ganglios entéricos.

Proteínas Hedgehog

Las proteínas secretadas hedgehog son vitales para distintas etapas del desarrollo embrionario, incluyendo el desarrollo del SNE, en el que participan *Ihh* (Indian hedgehog) y *Shh* (Sonic Hedgehog) (Newgreen y Young, 2002a). *Ihh* y *Shh* se expresan en el endodermo intestinal y la señalización medida por estas proteínas promueve la expresión de *Bmp-4* en el mesénquima intestinal (Roberts et al., 1998).

Ratones *Ihh*^{-/-} o *Shh*^{-/-} mueren durante los primeros estadios embrionarios, pero los modelos animales con mutaciones en heterocigosis sobreviven hasta después del nacimiento mostrando alteraciones entéricas. Concretamente *Ihh*^{+/-} muestra aganglionosis en distintas regiones a lo largo del intestino delgado y el colon (Ramalho-Santos et al, 2000). Por el contrario, los mutantes *Shh*^{+/-} poseen neuronas entéricas en todo el tracto gastrointestinal, observándose la presencia de neuronas ectópicas en la mucosa, por debajo del epitelio endodérmico y en la lámina propia (Ramalho-Santos et al, 2000). No se conocen con exactitud los mecanismos por los que estas proteínas modulan el desarrollo del SNE, pero se ha propuesto que *Shh* podría promover proliferación y de esta manera inhibir la diferenciación de las células derivadas del SNE inducida por GDNF (Fu et al., 2004).

Netrinas

Las netrinas son una familia de proteínas implicadas en la quimiotaxis de células y axones durante el desarrollo (Moore et al., 2007). Recientemente se ha demostrado que las netrinas, como factores quimiotrópicos, también son capaces de atraer distintos tipos celulares (Liu et al., 2004), promover supervivencia neuronal (Mehlen y Mazelin, 2003), y actuar como moléculas de adhesión en la lámina basal (Shekarabi et al., 2005).

Las netrinas son capaces de unirse a distintas moléculas que actúan como receptores para la transducción de señales al citoplasma de la célula. Entre ellas encontramos a DCC (Deleted in colorectal cancer) (Stein et al., 2001) e integrinas (Nikolopoulos y Giancotti, 2005). Tanto netrinas como DCC se expresan en el tracto gastrointestinal en formación de embriones de pollo (Jiang et al., 2003), apoyando la posible implicación de estas moléculas en la formación del SNE. Además, se ha observado que células derivadas de la cresta neural migran *in vitro* hacia focos de netrina, que *in vivo* se acumula en la lámina propia de la mucosa basal del intestino (Ming et al., 1997). La importancia de las netrinas en el desarrollo del SNE se ve reforzado por la carencia de ganglios en el plexo submucoso en ratones *Dcc^{-/-}* (Fazeli et al., 1997). Todos estos datos parecen indicar que las netrinas son necesarias para la migración perpendicular de las células derivadas de la cresta neural. Las netrinas, ejerciendo su función a través de DCC, hacen que una subpoblación de precursores neurales abandone la migración rostro/caudal a lo largo del intestino en formación para dar lugar a las neuronas del plexo submucoso (Le Douarin y Kalcheim, 1999).

Lamininas y Proteoglicanos

La laminina-1 constituye un sustrato favorable para la adhesión de los precursores derivados de la cresta neural (Lallier et al., 1994). Además, promueve la migración de estas células fuera de la cresta neural hacia los distintos órganos diana, tanto *in vitro* como *in vivo* (Bronner-Fraser, 1986; Bilozur y Hay, 1988). Parece que este fenómeno depende de la unión de laminina-1 a proteoglicanos de tipo heparán-sulfato, mientras que la unión a proteoglicanos de tipo condroitín-sulfato repele a las células derivadas de la cresta neural (Negreen y Tan, 1993).

Otra evidencia de la importancia de la laminina-1 sobre el desarrollo del SNE, es que su expresión está regulada negativamente por EDN3, ya que un exceso de laminina-1 provocada por la falta de EDN3 podría impedir la migración de los precursores (Gershon y Ratcliffe, 2006). Sin embargo, no hay estudios para determinar cómo se comportan las células una vez que llegan al intestino en formación y comienzan a migrar y diferenciarse bajo la acción de las distintas señales del microambiente en el que se encuentran. La respuesta a laminina-1 podría ser distinta a la observada en los precursores que salen de la cresta neural antes de llegar al intestino. Parece que la laminina-1, junto a otros factores, está implicada en la señalización de parada de las células durante su migración, favoreciendo la correcta localización y diferenciación de los ganglios entéricos (Gershon y Ratcliffe, 2006). Concretamente, la laminina-1 previene que las células derivadas de la cresta neural alcancen la mucosa intestinal cuando son atraídas por las netrinas, y permanezcan en la capa submucosa (Höpker et al., 1999).

Serotonina

La serotonina, además de ser un potente neurotransmisor durante la etapa adulta, actúa como factor de crecimiento durante diversas etapas del desarrollo embrionario (Fucomoto et al., 2005). Uno de estos procesos es el desarrollo del SNE, en el cual las neuronas serotoninérgicas son las primeras en aparecer, junto con las colinérgicas (Pham et al., 1991). El receptor de serotonina más importante durante el desarrollo del SNE es el 5-HT_{2B} y su estimulación promueve neurogénesis *in vitro* (Fiorica-Howells et al., 2000).

Modelos animales de ratón 5-Ht_{2B}^{-/-}, además de tener anomalías cardíacas, no presentan neuronas serotoninérgicas en el SNE (Nebigil et al., 2000), poniendo de manifiesto la importancia de este neurotransmisor durante el desarrollo de cierta subpoblación de neuronas entéricas.

Citoquinas Neuropoiéticas

Estas moléculas parecen estar implicadas en la diferenciación a neuronas y glía de las células derivadas de la cresta neural en la formación del SNE (Chalazonitis et al., 1998b). Sin embargo, no promueven proliferación de los precursores entéricos *in vitro*, ni son necesarias para el mantenimiento de las

células nerviosas ya diferenciadas (Chalazonitis et al., 1998b). Su forma de actuación no está completamente esclarecida, pero se ha propuesto su unión al complejo receptor CNTF, que se expresa en intestino en formación, para la transducción de señales al interior celular (Ip et al., 1993). Desafortunadamente, todavía está por determinar el papel de estas citoquinas in vivo, ya que modelos animales que carecen de ellas no muestran ningún fenotipo entérico.

A.1.3. Función de las semaforinas. Su papel en el desarrollo del SNE

Las semaforinas conforman una gran familia de proteínas que controlan la migración celular y el guiado del cono de crecimiento axonal. Se trata de proteínas bi-funcionales capaces de repeler varias poblaciones de axones y de promover crecimiento y atracción axonal. Las semaforinas se expresan en un amplio abanico de organismos, desde la mosca hasta en humano y existe un alto nivel de conservación entre distintas especies y entre distintas semaforinas. Hasta la fecha se han definido 8 clases de semaforinas, siendo las clases 1 y 2 exclusivas de invertebrados y las clases de la 3 a la 7 de vertebrados, mientras que la clase 8 incluye a semaforinas sintetizadas por virus. Las semaforinas pueden ser proteínas secretadas al medio (clases 2 y 3) o proteínas transmembrana (clases 1, 4, 5 y 6), mientras que los miembros de la clase 7 son proteínas unidas a GPI (Roth et al., 2009).

Las semaforinas ejercen su función en la célula uniéndose a un complejo receptor en la membrana celular que puede estar formado por distintos componentes. La diversidad de complejo receptor es indicativa de la diversidad de funciones que pueden ejercer las semaforinas. Las neuropilinas son uno de los componentes del complejo receptor, constituyendo la subunidad que se une al ligando en el caso de las semaforinas solubles (Fujisawa, 2004; Figura A.13). También, pueden formar parte de este complejo algunos miembros de la familia de las plexinas (Tamagnone et al., 1999; Figura A.13), el receptor VEGFR1 y 2 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*) (Bagnard et al., 2001a; Soker et al., 2002), o las moléculas de adhesión L1CAM y NrCAM (Castellani et al., 2000; Falk et al., 2005). Si tenemos en cuenta la gran variedad de semaforinas, y la amplia gama de respuestas a las que dan lugar los distintos tipos de semaforinas, podemos entender la complejidad de la señalización de

estas moléculas. Además, las semaforinas pueden actuar solas o en combinación, promoviendo distintas respuestas en la célula.

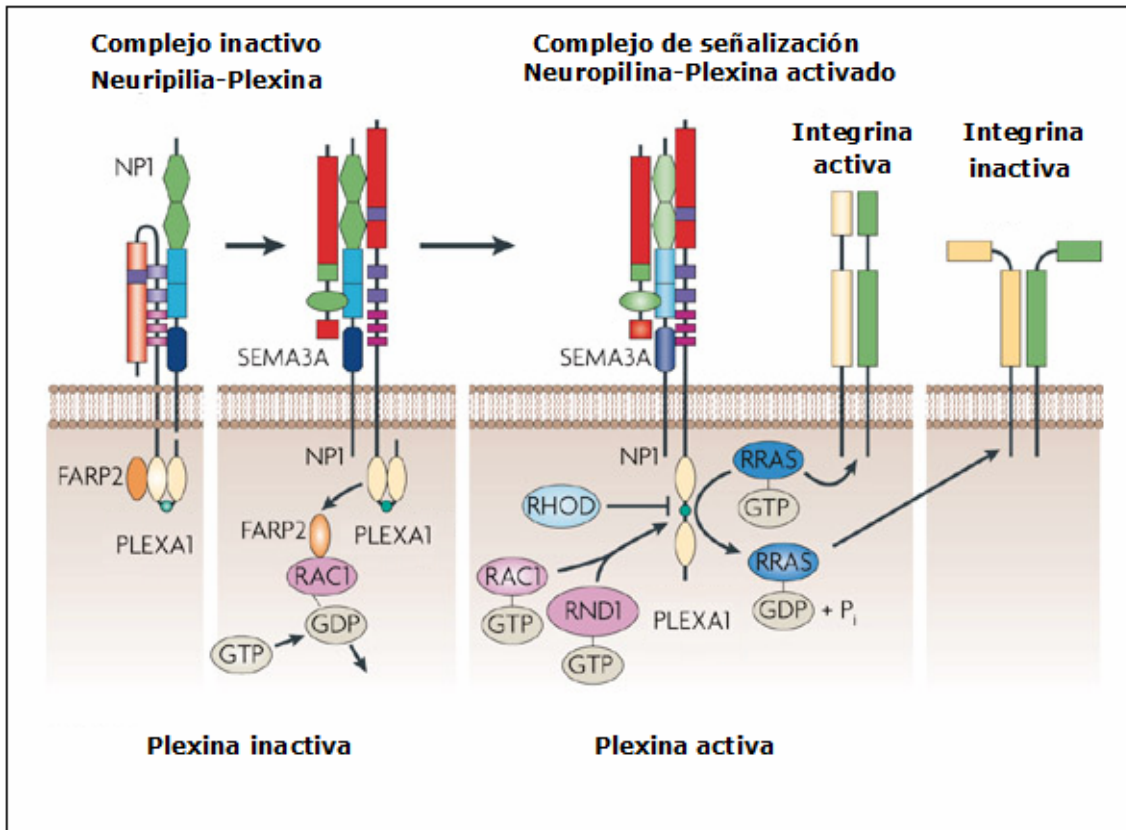


Figura A.13 Unión de SEMA3A a su complejo receptor y activación del mismo. Rutas intracelulares activadas por la unión de SEMA3A.

Estas moléculas participan en la formación de estructuras importantes en el SNC como la corteza cerebral (Polleux et al., 2000), el hipocampo (Pozas et al., 2001; Skutella y Nitch, 2001), el bulbo olfativo (Castro et al., 1999), el sistema visual, el cerebelo (Ding et al., 2007) y el cordón espinal (De Winter et al., 2002), y en la correcta formación de las redes nerviosas mediante el guiado de nervios periféricos (Wright et al., 1995). También se ha demostrado la participación de las semaforinas en otros sistemas distintos al sistema nervioso. En este sentido, al menos 4 clases de semaforinas han demostrado jugar un papel esencial en el funcionamiento del sistema inmunológico, apoyando la idea de que las semaforinas constituyen una nueva familia de moléculas inmunoregulatoras (Holmes et al., 2002; Czopik et al., 2006; Lepelletier et al., 2006; Suzuki et al., 2007). El sistema circulatorio también utiliza las semaforinas como moléculas de señalización para motilidad de las células endoteliales (Wang et al., 2005) o la repulsión/formación de vasos sanguíneos (Soker et al., 1998).

Las semaforinas además de participar en el desarrollo de estructuras nerviosas, durante la organogénesis también participan en la formación de otras estructuras, como el corazón y los pulmones, entre otros. Los modelos de ratón *Sema3A*^{-/-}, además de defectos en el sistema nervioso, muestran malformaciones cardíacas tales como hipertrofia del ventrículo derecho y dilatación en la aurícula derecha (Behar et al., 1996). Por otra parte, mientras *Sema3A* inhibe la ramificación durante la morfogénesis del pulmón, *Sema3C* y *Sema3F* estimulan la formación de dichas ramas *in vitro* (Kagoshima e Ito, 2001). La expresión de estas moléculas es prácticamente ubicua, como se puede suponer si tenemos en cuenta la gran diversidad de funciones que tienen en el desarrollo de distintos tejidos y órganos.

La implicación de las semaforinas en distintas patologías humanas es un campo en constante expansión. Muchas de las enfermedades estudiadas en las que las semaforinas juegan un papel importante, o pueden constituir un avance para terapias avanzadas o la generación de modelos de enfermedad, afectan al sistema nervioso, como la isquemia, la esclerosis múltiple, la epilepsia o la enfermedad de Alzheimer entre otras (Hirsch et al., 1999; Holtmaat et al., 2003; Barnes et al., 2003; Good et al., 2004; Chen et al., 2005). Sin embargo, las semaforinas pueden participar en otros procesos patológicos, como el cáncer, actuando tanto como supresor de tumores (*Sema3B*, *Sema3F*), como promotores de tumores (*Sema3C*, *Sema3A*, *Sema4*) (Christensen et al., 1999; Tomizawa et al., 2001).

El papel de la *Sema3A* en la correcta formación de la red nerviosa periférica se ha puesto de manifiesto con modelos murinos en los que no se expresaba dicha proteína. En estos ratones se observó desfasciculación en muchas proyecciones de nervios periféricos (Taniguchi et al., 1997; Bagnard et al., 2001b). Además de un claro efecto sobre el guiado axonal, las semaforinas y concretamente *Sema3A*, ha demostrado tener un papel muy importante sobre la migración celular. Las neuronas del sistema simpático normalmente se originan a partir de las células derivadas de la cresta neural. En modelos animales carentes de *Sema3A* o de neuropilina-1, estas neuronas no se encuentran en sus disposiciones definitivas, lo que sugiere que *Sema3A* actúa como señal de parada de la migración para permitir la correcta posición y formación de redes neuronales (Kawasaki et al., 2002).

Debido al importante papel de las semaforinas en el guiado axonal de un amplio número de axones en el SNC y SNP, se ha propuesto que estas moléculas también podrían estar jugando un papel importante en la formación

de las redes nerviosas del SNE. De hecho, aunque esta teoría no ha sido claramente demostrada hasta la fecha, existen algunas evidencias que muestran la implicación de las semaforinas en la formación del SNE, sobretodo en el establecimiento de la red axonal, pero también en la determinación de las rutas migratorias de los precursores neurales entéricos. Sema3A se ha encontrado en el mesénquima de la región intestinal distal en embriones de pollo, mientras que su receptor neuropilina-1 se expresa en axones intrínsecos al SNE (Shepherd y Raper, 1999). De manera interesante se ha comprobado que Sema3A actúa como señal repulsiva para las neuronas del ganglio de Remak, que sólo entra en las porciones periféricas de la pared intestinal del recto cuando la expresión de Sema3A se retrae hacia las capas submucosa y mucosa (Shepherd y Raper, 1999). Además, Sema3A, que se expresa en las regiones más distales del intestino de ratón, previene la entrada prematura de los precursores sacrales y los axones extrínsecos en el intestino distal (Anderson et al., 2007). Aunque los precursores de SNE que derivan de células de la cresta neural sacra expresan neuropilina-1 (Anderson et al., 2007), aún no se ha demostrado si la acción de Sema3A sobre la migración es debida al efecto directo sobre las células que migran, o a un efecto indirecto sobre los axones extrínsecos que acompañan a estas células cuando colonizan el colón y son repelidas si Sema3A está presente en los segmentos más externos del mesénquima intestinal (Anderson et al., 2007). Por otra parte, Sema3D ha mostrado promover la proliferación de la migración de los precursores derivados de células de la cresta neural que dan lugar a distintos tejidos como el corazón o el cerebro (Berndt y Halloran, 2006; Sato et al., 2006), aunque su papel en el desarrollo del SNE todavía está por determinar. Teniendo en cuenta el hecho de que el receptor de Sema3D, neuropilina-1 se ha encontrado en células derivadas de la cresta neural que dan lugar a ganglios entéricos (Anderson et al., 2007), parece plausible que *SEMA3D* pueda tener un papel funcional de el desarrollo del SNE.

A.1.4. Desórdenes del Sistema Nervioso Entérico

Debido al papel crítico que tiene el SNE en la motilidad intestinal, la absorción y la secreción, éste es esencial en todas las etapas de la vida post-natal. Modelos animales de ratón carentes de SNE en todo el tracto gastrointestinal (Southard-Smith et al, 1998; Pattyn et al., 1999), así como en regiones más localizadas del mismo, ya sea en el esófago (Guillemot et al.,

1993) o en el intestino (Schuchart et al., 1994), suelen morir a los pocos días de nacer. Por el contrario, y debido a que el SNE no es crítico en las distintas fases embrionarias antes de nacimiento, las anomalías que afectan al desarrollo de dicho sistema no contribuyen a la morbilidad y mortalidad prenatal, aunque tienen efectos patentes después del nacimiento que se reflejan en distintas patologías humanas. Los desórdenes primarios del SNE se pueden agrupar en dos: los que se caracterizan por un número anormal de neuronas y que en general reciben el nombre de disganglionosis (hiperganglionosis, hipoganglionosis y aganglionosis), y los que se deben a una diferenciación anormal de neuronas por causas físicas o bioquímicas. En estos casos la presentación clínica puede ser muy parecida, con una predominancia de los síntomas obstructivos (Kapur, 2000b). El diagnóstico preciso resulta complicado, ya que no existen criterios definidos y el estudio histopatológico puede no ser concluyente. También existen desórdenes secundarios que pueden comprometer la integridad de las neuronas entéricas, pudiendo deberse estos a defectos metabólicos constitutivos o daño isquémico.

De los desórdenes primarios del SNE, el que tiene un mayor impacto en la práctica clínica es la aganglionosis intestinal o enfermedad de Hirschsprung, que se caracteriza por la ausencia de células ganglionares en los plexos submucoso y mientérico, provocando una obstrucción intestinal funcional. Veremos con más detalles las características clínicas y las causas de esta patología en el siguiente apartado.

En otras ocasiones se ha asociado la dismotilidad intestinal a un aumento del número de células ganglionares en los plexos entéricos o incluso de manera ectópica en la lámina propia. Existen dos tipos de hiperganglionosis: en el primero de ellos se observa un aumento de la densidad de ganglios submucosos y un mayor número de las células por ganglio, conociéndose este desorden como displasia neuronal intestinal, y también se describe con detalle más adelante. El segundo tipo es una patología llamada ganglioneuroma y se caracteriza por una proliferación nodular de las células ganglionares y las fibras nerviosas asociadas a la glía, que se ha descrito como lesión aislada o difusa (Shekitka y Sobin, 1994).

Por otra parte, la hipoganglionosis también puede ser responsable de pseudo-obstrucción intestinal. Se puede observar un número reducido de células nerviosas en la zona de transición entre intestino gangliónico y agangliónico presente en pacientes Hirschsprung, y que muchos autores relacionan con la persistencia de los síntomas en pacientes en los que se llevó a

cabo una resección incompleta de la región del colon afectada. También existen formas aisladas de hipoganglionosis, que se han relacionado con alteraciones de la función intestinal. En estos casos se especula con la posibilidad de que se trate de formas frustradas de enfermedad de Hirschsprung, ya que se ha observado en familiares de pacientes afectados con las mismas mutaciones que ellos.

Es posible que algunos desórdenes intestinales no se asocien a cambios anatómicos drásticos en el SNE, sino que estén provocados por cambios más sutiles en las propiedades, abundancia relativa o conectividad de ciertos tipos de neuronas entéricas (Hao y Young, 2009). En este sentido, los síntomas observados en los pacientes Hirschsprung que se atribuyen a la presencia de un segmento agangliónico, podrían deberse también al mal funcionamiento de los ganglios presentes en la región normogangliónica de estos pacientes.

A.2. Caracterización clínica y bases moleculares de la enfermedad de Hirschsprung

A.2.1. Etiopatogenia y características clínicas de la enfermedad de Hirschsprung

La enfermedad de Hirschsprung o megacolon agangliónico (HSCR, OMIM 142623), fue descrita por el médico Harald Hirschsprung en 1886 (Hirschsprung et al., 1888). Estos pacientes presentan una obstrucción intestinal con los siguientes signos: dificultad en expulsar el meconio durante las primeras 48 horas de vida, distensión abdominal que se alivia con la estimulación rectal o con la administración de enemas, vómitos, y enterocolitis neonatal que sin tratamiento puede llegar a ser fatal. En la mayoría de los casos el diagnóstico de HSCR se realiza en el período neonatal, aunque en ocasiones se puede diagnosticar más tarde en la infancia o en la etapa adulta con estreñimiento severo, distensión abdominal crónica, vómitos y retraso de crecimiento (Parc et al., 1984). Es una patología congénita caracterizada por la ausencia de los ganglios de los plexos mientérico y submucoso en una porción variable del intestino grueso, dando como resultado una obstrucción intestinal funcional (Figura A.14). La hipótesis más aceptada acerca de la etiopatogenia de la enfermedad se basa en un fallo en la migración, proliferación, diferenciación y/o supervivencia de las células de la cresta neural durante el desarrollo del SNE

(Okamoto y Ueda, 1967). Alteraciones en estos procesos tendrían como consecuencia que los precursores neurales responsables de dar lugar a las neuronas y células de la glía entérica no serían capaces de llegar a su localización final en número suficiente, o bien no se diferenciarían de manera correcta. La ausencia de un número suficiente de neuronas entéricas, así como de glía, imposibilitaría la formación de ganglios entéricos. Como consecuencia, la musculatura del colon perdería su inervación y por lo tanto su capacidad contráctil, por lo que la materia fecal se acumula en la región anterior a esta estenosis funcional, provocando el megacolon observado en los pacientes. Se engloban bajo el nombre de neurocristopatía aquellas enfermedades, síndromes y neoplasias que afectan a tejidos derivados de la cresta neural. Por lo tanto, HSCR al igual que otros desórdenes en el desarrollo del SNE, se consideran neurocristopatías, al proceder éste de células derivadas de la cresta neural.

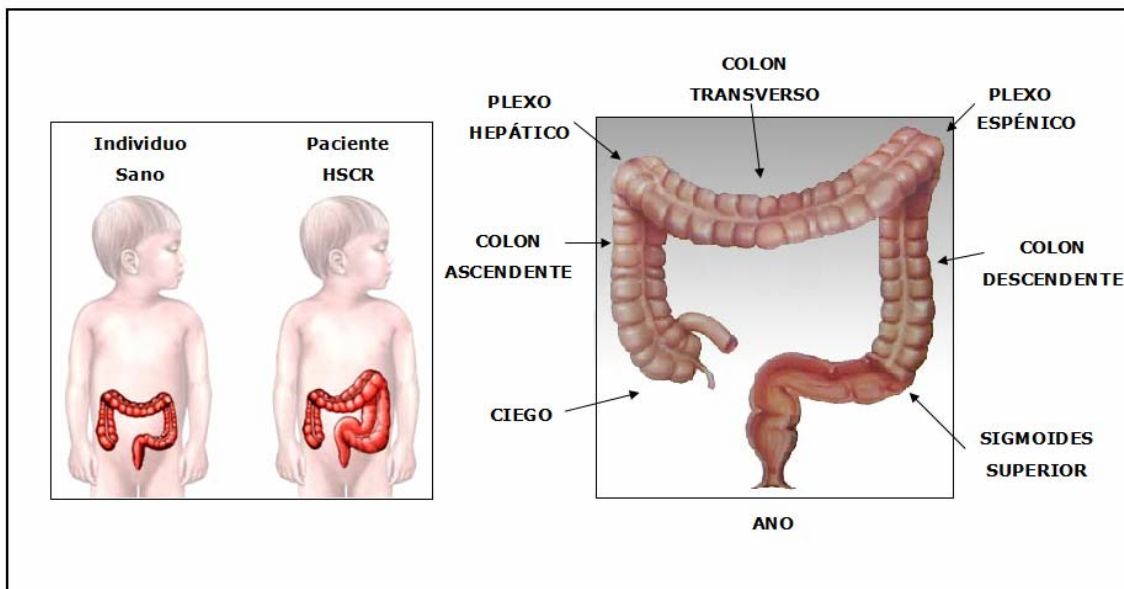


Figura A.14 Representación esquemática del intestino grueso. Diferencias entre individuo normal e individuo HSCR en el que se observa megacolon (derecha). Distintas regiones del intestino grueso.

Se puede presentar bajo dos formas fenotípicas diferentes: HSCR de segmento corto (S-HSCR: 67-82% de casos), en la que se ve afectada una región por debajo del sigmoides superior, y HSCR de segmento largo (L-HSCR: 15-25% de casos) en la que la aganglionosis se extiende por encima del plexo esplénico (Figura A.14). El criterio para catalogar a los pacientes con aganglionosis hasta el colon descendente es variable, pudiéndose considerar como una tercera forma fenotípica, HSCR de segmento colónico. La forma

menos común y más severa de HSCR es la aganglionosis total del colon (ATC: 3-8% de los casos), en la que la totalidad del colon se ve afectada (Chakravarti y Lyonnet, 2002). Las distintas formas clínicas en las que se presenta esta enfermedad, podrían considerarse como el resultado de interrupciones del proceso migratorio en distintos períodos gestacionales (Martucciello et al., 2000).

Las principales técnicas diagnósticas incluyen el radiodiagnóstico mediante enema opaco, manometría ano-rectal y biopsia de la pared rectal. El diagnóstico de HSCR se establece cuando se observa la ausencia de células ganglionares submucosas en la biopsia rectal, y esto se correlaciona con ausencia de células ganglionares mientéricas (Figura A.15). La ausencia de ganglios submucosos en las biopsias de pacientes HSCR es compatible con la presencia de fibras nerviosas hipertróficas que proceden de fibras autonómicas y sensoriales extrínsecas incrementadas en número y tamaño en estos pacientes (Kapur, 2009). El tratamiento de esta patología pasa por una o varias intervenciones quirúrgicas, tras un preoperatorio meticuloso, en las que se resecionará la región agangliónica situando el intestino normogangliónico en el ano. Éste es un procedimiento necesario pero no suficiente en algunos pacientes, ya que, aunque los síntomas pueden desaparecer tras la operación, existe una proporción de pacientes significativa en los que persisten problemas postoperatorios, como estreñimiento, diarrea o enterocolitis (Prato et al., 2008; Kapur, 2009; Thapar, 2009). Existen factores de riesgo preoperatorios que pueden ser indicativos de los resultados que se podrán conseguir en el paciente con la terapia quirúrgica. Por ejemplo, la longitud del segmento agangliónico tiene un gran impacto en la respuesta a la cirugía, mientras que el sexo del paciente así como la edad de operación no parecen ejercer ningún efecto sobre las complicaciones postoperatorias (Prato et al., 2008). La zona de transición entre intestino gangliónico y agangliónico observada en estos pacientes puede ser responsable de algunos casos de malos resultados terapéuticos. Esta zona puede ser hiper/hipogangliónica o parcialmente agangliónica y su incorporación en la anastomosis anorrectal durante la operación de estos pacientes puede hacer que la función gantrointestinal no se recupere correctamente tras la misma (Langer, 2004). Esta es la razón de que las piezas resecionadas durante la operación sean analizadas, no sólo para confirmar el diagnóstico de HSCR, sino también para localizar la zona de transición.

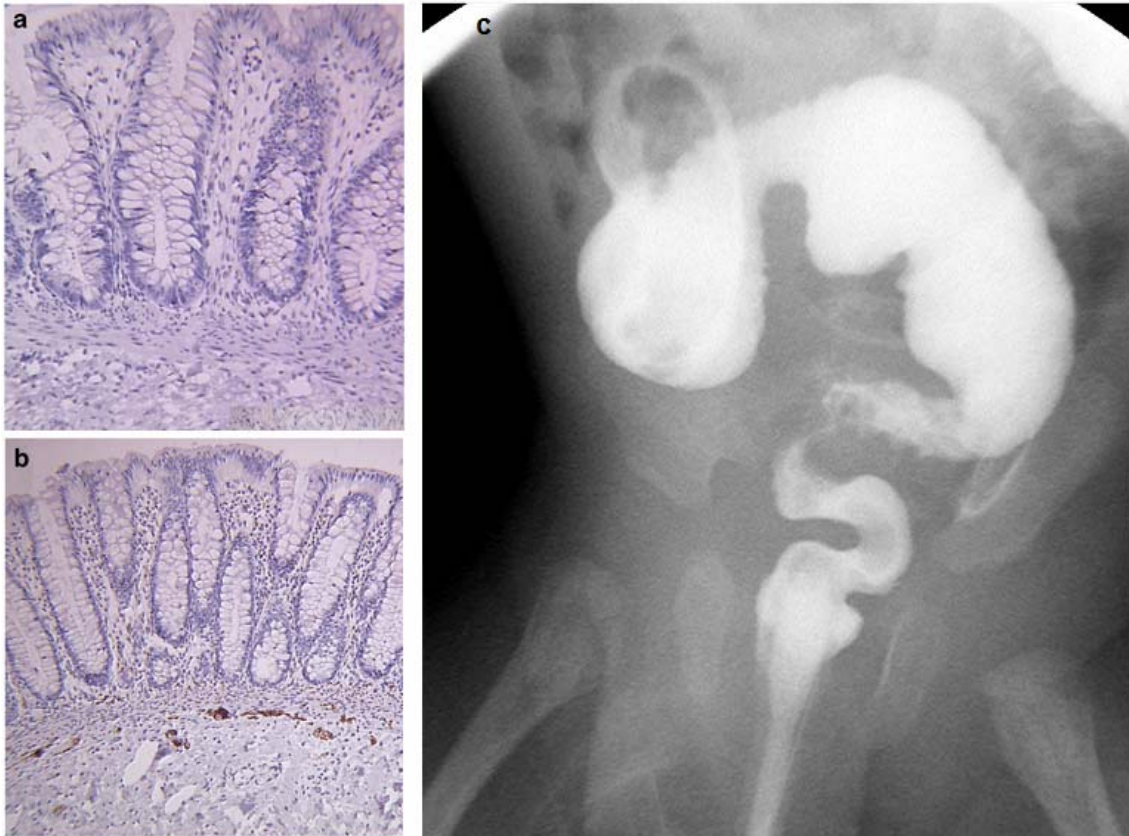


Figura A.15 Pruebas diagnóstica para HSCR. Tinción inmunohistoquímica (calretinina) de una biopsia por succión rectal, en la que se observa la ausencia de ganglios entéricos en la lámina submucosa (a), frente a su presencia en un individuo no afecto (b). Enema de bario que confirma la presencia de megacolon en un paciente con sospecha de HSCR (c).

En los últimos años se ha especulado con la posibilidad de aplicar terapia celular a pacientes HSCR, y hay un gran entusiasmo en este campo (Heanue y Pachnis, 2007; Theocharatos et al., 2008). La posibilidad de usar esta tecnología se basa en la hipótesis de que células pluripotenciales neurales de origen autólogo o heterólogo podrían restablecer los ganglios entéricos en la región agangliónica del colon de estos pacientes. Todavía está por demostrar la viabilidad de trasplantes de células pluripotentes aisladas, en el microambiente del colon agangliónico ya maduro y si éstas serían capaces de migrar hacia las zonas agangliónicas del individuo y de diferenciarse, estableciendo las conexiones necesarias para restablecer cierta funcionalidad, y corrigiendo la pseudo-obstrucción observada en los pacientes HSCR. Se han conseguido aislar células pluripotentes derivadas de cresta neural, mediante la generación de neuroesferas, a partir de intestino postnatal tanto de ratones (Bondurand et al., 2003; Schafer et al., 2003) como de humanos (Rauch et al., 2006). Este aislamiento se ha podido reproducir en nuestro laboratorio tanto en humanos como en ratón. Además las células precursoras aisladas de intestino

postnatal se han podido amplificar en cultivo (Almond et al., 2007), un paso fundamental si se pretende la terapia celular. Estas células expandidas en cultivo, si se transplantan *in vitro* a intestinos explantados de ratón durante la fase embrionaria, son capaces no sólo de diferenciarse a neuronas y glía (Bondurand et al., 2003), sino que además pueden migrar hacia las regiones agangliónicas de dichos segmentos intestinales produciéndose la diferenciación en esta región (Almond et al., 2007). Esto abre un campo muy prometedor de investigación para los próximos años.

A.2.2. Epidemiología de la enfermedad de Hirschsprung

Se estima que la incidencia de HSCR es de 1 por cada 5,000 nacidos vivos en población caucásica (Bodian y Carter, 1963; Amiel y Lyonnet, 2001; Amiel et al., 2008). Normalmente, HSCR aparece como caso aislado, sin historia familiar previa (HSCR esporádico) aunque también hay casos familiares en los que se observan patrones de herencia autosómicos dominantes y recesivos, con penetrancia parcial y expresión variable (Passarge, 1967). Existe una clara predominancia de varones afectados, siendo el ratio hombres:mujeres de 4:1 (Badner et al., 1990). Curiosamente este ratio varones:mujeres es significativamente más alto para S-HSCR que para la forma más severa L-HSCR (Badner et al., 1990).

Aproximadamente el 70% de los pacientes HSCR no tienen otras manifestaciones clínicas adicionales (HSCR aislado), mientras que en el 30% de los casos este fenotipo se presenta como formas sindrómicas, asociado a otras malformaciones congénitas o a otros desordenes genéticos adicionales, siendo especialmente frecuentes aquellas que afectan a estructuras derivadas de la cresta neural (Amiel et al., 2008; Tabla A.1). Estas alteraciones de tejidos derivados de la cresta neural distintos del SNE, que pueden aparecer asociados a HSCR o de manera aislada, se denominan neurocristopatías. Un ejemplo es la neoplasia endocrina múltiple tipo 2, un síndrome canceroso mendeliano autosómico dominante, que incluiría los siguientes cuadros clínicamente diferenciados: neoplasia endocrina múltiple 2A y 2B (MEN 2A y MEN 2B) y cáncer medular de tiroides familiar (FMTC). El síndrome MEN 2A se presenta con la clásica tríada de MTC, feocromocitoma en aproximadamente el 50% de los casos, e hiperparatiroidismo o adenoma paratiroideo en un 15-30% de los casos (Schimke, 1984; Eng, 1999). Es la forma más común de MEN 2,

abarcando aproximadamente el 90% de todos los casos. El síndrome MEN 2B abarca un 5% de los casos MEN 2, y la clínica es similar a la de MEN 2A con la diferencia de que la edad de manifestación del tumor es una media de 10 años más temprana. Además, no cursa con hiperparatiroidismo, pero va acompañado de anomalías del desarrollo como hábito marfanoide, ganglioneuromatosis, neuromas mucosos y engrosamiento de fibras nerviosas de la córnea (Gorlin et al., 1968; Eng, 1999). Finalmente, el FMTC tiene como único fenotipo el cáncer medular de tiroides (Farndon et al., 1986; Eng, 1999). Aunque de manera infrecuente, en algunas familias se ha descrito la co-segregación de MEN 2 y HSCR (Mulligan et al., 1994; Borrego et al., 1998; Pasini et al., 2002).

Otro ejemplo de neoplasia de las células que derivan de la cresta neural son los neuroblastomas (NB), tumores sólidos que aparecen en el sistema parasimpático o la médula adrenal. En algunas familias la predisposición a sufrir estos tumores, los tumores sólidos más frecuentes en niños, segrega a lo largo de distintas generaciones con penetrancia incompleta (Chatten y Voorhess, 1967). NB se ha visto asociado a HSCR en algunos pacientes, y la aparición de este fenotipo combinado se ha asociado a mutaciones en *PHOX2B* en heterocigosis (Crochet et al., 2004; Mosse et al., 2004). Sin embargo mutaciones en este gen son infrecuentes en pacientes con NB aislado (Perri et al., 2005).

El síndrome de hipoventilación central congénita (CCHS), también conocido como enfermedad de Ondine, es una enfermedad rara que se engloba dentro de las neurocristopatías. En esta patología se ven comprometidas, no sólo el SNP, sino también el SNC en el control de la respiración autónoma (Gozal, 1998). Estos pacientes suelen presentar otros síntomas debidos a defectos en el SNA y también presentan una susceptibilidad aumentada a sufrir NB, u otros tumores de tejidos derivados de la cresta neural (ganglioblastomas o ganglioneuromas) (Weese-Mayer, 1993). El 20% de los casos CCHS se presentan con HSCR asociado, dentro de un cuadro conocido como síndrome de Haddad (Haddad et al., 1978). El gen responsable de CCHS es *PHOX2B*, apareciendo mutaciones *de novo* en este *locus*, que en su mayoría se corresponden con expansiones en las regiones de polialaninas de esta proteína (Amiel et al., 2003; Weese-Mayer et al., 2003; Matera et al., 2004).

El síndrome de Waardenburg (WS) es una patología hereditaria, clínica y genéticamente heterogénea, que afecta al desarrollo de los melanocitos a partir de la cresta neural tanto en piel como en la estría vascular de la cóclea, por lo que se presenta con alteraciones pigmentarias y sordera en el mismo paciente

(Waardenburg, 1951). La asociación de WS con HSCR es bastante frecuente y se conoce como WS4. Este fenotipo se ha asociado a mutaciones en homocigosis en los genes *EDN3* y *EDNRB* (Puffenberger et al., 1994; Hofstra et al., 1994; Ederly et al., 1994), y en heterocigosis en *SOX10* (Pingault et al., 1998). Existen otros síndromes más severos que combinan las características propias del WS con HSCR, y alteraciones neurológicas tanto del SNP como del SNC, y que también se han asociado a mutaciones en *SOX10* (Verheij et al., 2006; Bondurand et al., 2007).

Por otra parte, algunos pacientes HSCR aparecen con otras anomalías congénitas asociadas de manera minoritaria, tales como malformaciones gastrointestinales, fisura palatina, polidactilia, defectos en el septo cardíaco y anomalías cráneo-faciales entre otras (Spouge y Baird, 1985; Brooks et al., 1998; Amiel et al., 2008). Algunas de estas anomalías forman parte de síndromes claramente definidos que cursan con HSCR, entre los que se encuentran, además de los síndromes CCHS y WS4 descritos con anterioridad, la enfermedad de Goldberg-Shprintzen, el síndrome de Mowat-Wilson o síndrome de Bardet-Biedl, entre otros (Tabla A.1).

Por otra parte, HSCR aparece asociado a alguna anomalía cromosómica en un 12% de los casos, siendo la trisomía 21 la más frecuente (>90%) (Chakravarti y Lyonnet, 2002). La trisomía del cromosoma 21 es responsable del Síndrome de Down (OMIM 190685), que se observa en un 2-10% de los casos HSCR, siendo 40 veces más frecuente en estos pacientes que en la población general. Sin embargo, la presencia de una copia adicional del cromosoma 21 parece aumentar la susceptibilidad de sufrir HSCR, pero no parece ser responsable *per se* de la aparición del mismo, sino que es necesaria la presencia de otros factores genéticos que no se encuentran localizados en el cromosoma 21 (Arnold et al., 2009a).

Tabla A.1 Síndromes asociados con HSCR (Amiel et al., 2008).

Síndromes	OMIM	Rasgos clave
<i>Neurocristopatías</i>		
WS4 (Shah-Waardenburg)	277580	Anomalías en la pigmentación (mechón blanco, iris bicolor, hipopigmentación irregular), y sordera
Yemenite deaf-blind hipopigmentación	601706	Pérdida de audición, anomalías oculares (microcórnea, coloboma, nistagmo), anomalías en la pigmentación.
BADS	227010	Pérdida de audición, hipopigmentación de la piel y retina
Piebaldismo	172800	Hipopigmentación irregular de la piel
Haddad o enfermedad de Ondine (CCHS)	209880	Hipoventilación central congénita
MEN 2A	171400	Carcinoma medular de tiroides, feocromocitoma, hiperparatiroidismo
Riley-Day	223900	Anomalías del sistema nervioso autónomo

HSCR siempre asociado

Goldberg-Shprintzen	235730	Fisura palatina, hipotonía, microcefalia, retraso mental, rasgos faciales dismórficos
HSCR con anomalías límbicas	235740	Polidactilia, agenesia renal unilateral, hipertelorismo, sordera
	235750	Polidactilia postaxial, defecto en el septo ventricular
	235760	Hipoplasia de las falanges distales y uñas, rasgos dismórficos
	604211	Polidactilia preaxial, defecto cardíaco, anomalías laríngeas
	306980	Braquidactilia tipo D
BRESHEK		Anormalidades cerebrales, retraso, displasia ectodérmica, malformaciones esqueléticas, anomalías de ojo y oído, displasia renal
Diaplasia mesomélica Werner		Mesomelia, polidactilia

HSCR ocasionalmente asociado

Bardet-Biedl	209900	Retinopatía pigmentaria, obesidad, hipogenitalismo, leve retraso mental, polidactilia postaxial
Kauffman-McKusick	236700	Hidrometrocolpo, polidactilia postaxial, defecto cardíaco congénito
Smith-Lemli-Opitz	270400	Retraso en el crecimiento, microcefalia, retraso mental, hipospadia, sindactilia de 2-3 dedos de los pies, rasgos dismórficos
Hipoplasia de cartílago y cabello	250250	Enanismo, displasia metafisaria, inmunodeficiencia

HSCR rara vez asociado

Distrofia muscular congénita de Fukuyama	253800	Distrofia muscular, polimicrogiria, hidrocefalia, apoplajía
Clayton-Smith	258840	Rasgos dismórficos, dedos y uñas hipoplásicas, ictiosis
Kaplan	304100	Agénesia del cuerpo calloso, pulgares cortos, ptosis, debilidad muscular
Okamoto	308840	Hidrocefalia, fisura palatina, agénesia del cuerpo calloso

Asociaciones misceláneas

Pallister-Hall (CAVE)	140510
Fryns	229850
Aarskog	100050
Jeune	208500
Displasia frontonasal	136760
Osteopetrosis	
Goldenhar	164210
Lesch-Nyhan	308000
Rubinstein-Taybi	180849
Toriello-Carey	217980
SEMDJL	271640

A.2.3. Genética molecular de la enfermedad de Hirschsprung

El consejo genético en el caso de enfermedades de herencia mendeliana, en las que el riesgo de recurrencia para familiares de individuos afectos depende del grado de parentesco y del patrón de herencia de la enfermedad, es un proceso relativamente sencillo y pragmático. Sin embargo, la mayor parte de enfermedades humanas tienen un patrón de herencia complejo y multifactorial, en los que la expresión de la enfermedad depende de la concurrencia de pequeñas diferencias alélicas en más de un gen que actúan de manera aditiva (Carter, 1969). En estos casos, el riesgo de recurrencia no es una propiedad de ningún gen en particular sino que se trata de una propiedad emergente del fondo genético del individuo y particularmente del genotipo de varios *loci*, haciendo muy complicado el consejo genético. HSCR se puede comportar como enfermedad mendeliana en los casos sindrómicos en los que la participación de un número reducido de genes ha sido demostrada, como es el caso de WS4 o CCHS. Sin embargo, los casos esporádicos responden a un patrón de herencia no mendeliano con baja penetrancia que además es dependiente de sexo, y presenta expresión variable, lo que pone de manifiesto el carácter poligénico de esta enfermedad (Amiel et al., 2008; Tam et al., 2009). Además de la transmisión familiar de esta enfermedad, el mayor riesgo de recurrencia en familiares de individuos afectos (aproximadamente 200 veces más que la población general) y la prevalencia de hombres afectos, hay otros factores que indican el importante papel que tiene la genética en esta enfermedad, como la asociación de HSCR con otras enfermedades genéticas, o la existencia de modelos animales para aganglionosis que muestran patrones de herencia mendeliana específicos.

Teniendo en cuenta el complicado proceso que tiene lugar para controlar la formación del SNE, podemos asumir que alteraciones en cualquiera de los genes que codifican las moléculas señalizadoras implicadas en este proceso podrían interferir con el proceso de migración o diferenciación de los precursores neurales del SNE y suponer una causa potencial de aganglionosis. Por lo tanto, el fenotipo HSCR puede aparecer por una mutación patogénica severa en uno de los genes que codifique moléculas cruciales para la formación del SNE, o bien por la suma de una serie de variaciones menos severas en uno o varios genes, o por la combinación de ambos fenómenos. El análisis molecular de pacientes HSCR ha permitido identificar diferentes genes asociados a la

aparición de este fenotipo. Hasta la fecha se han identificado mutaciones en al menos 13 genes en pacientes HSCR: *RET*, *GDNF*, *NRTN*, *EDNRB*, *EDN3*, *ECE1*, *NTF3*, *SOX10*, *PHOX2B*, *SIP1*, *L1CAM*, *KIAA1279* y *TCF4*. La mayor parte de estos genes codifican para elementos de las vías de señalización más importantes en la formación del SNE.

A.2.3.1. Mutaciones asociadas a HSCR en los componentes de la cascada de señalización de *RET*

Hoy día se sabe que el proto-oncogén *RET* es el principal gen de susceptibilidad para HSCR. Fue el primer *locus* de susceptibilidad que se identificó tras el análisis de familias multigeneracionales, en las que HSCR presentaba una forma de herencia autosómica dominante con penetrancia parcial (Lyonnet et al., 1993; Angrist et al., 1993). Además, este gen era también responsable de los síndromes MEN2 y se consideró un buen candidato debido a la concurrencia de MEN2A y HSCR en algunas familias (Borrego et al., 1998), ya que se expresa en células derivadas de la cresta neural. El rastreo molecular de *RET* en distintas series de pacientes HSCR ha permitido identificar más de 100 mutaciones asociadas a este fenotipo (Figura A.16). Estas mutaciones están distribuidas por todo el gen e incluyen grandes deleciones, microdeleciones, inserciones y mutaciones puntuales de sentido equivocado (*missense mutations*), sin sentido (*nonsense mutations*) o que afectan al proceso de corte y empalme de mRNA (*splicing mutations*) (Edery et al., 1994; Romeo et al., 1994; Yin et al., 1994; Attie et al., 1995a; Angrist et al., 1995; Seri et al., 1997; Svensson et al., 1998; Fitze et al., 2002a; García-Barceló et al., 2004; Pelet et al., 2005; Human Gene Mutation Database del Institute of Medical Genetics in Cardiff, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>).

El análisis *in vitro* de algunas de estas mutaciones ha mostrado que en la mayor parte de los casos provocan pérdida de función, aunque los efectos son variables, siendo el mecanismo más probable la haploinsuficiencia (Pasini et al., 1995b; Carlomagno et al., 1996; Pelet et al., 1998). De este modo, las mutaciones de *RET* asociadas a HSCR se pueden clasificar en cuatro grupos distintos (Kashuk et al., 2005): mutaciones que afectan al dominio extracelular de *RET* y tienen como resultado un fallo en el plegamiento y transporte de la proteína hasta la membrana plasmática (I); mutaciones en el dominio rico en cisteínas responsables de la dimerización de *RET*, que reducen su localización en la membrana plasmática (II); mutaciones en el dominio tirosín-kinasa de

RET que causan la pérdida de la actividad catalítica del receptor (III); mutaciones localizadas en la región C-terminal que alteran sitios de unión de proteínas adaptadoras y, por tanto, afectan a la señalización mediada por RET (IV).

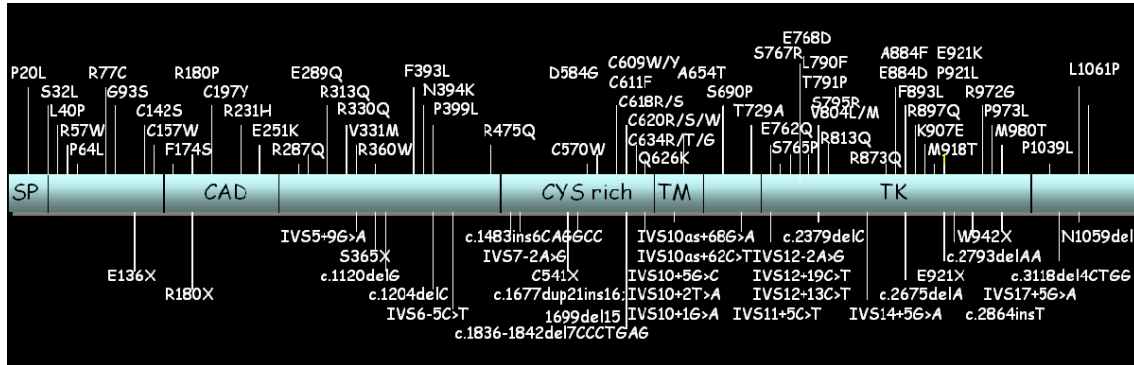


Figura A.16 Representación del proto-oncogén *RET* en el que se han señalado algunas de las mutaciones identificadas en asociación con HSCR. No existen puntos calientes de mutaciones en este gen responsables de alteraciones entéricas. SP: Péptido señal; CAD: Dominios con homología a cadherinas; CYS rich: Dominio rico en cisteínas; TM: Dominio transmembrana; TK: Dominio con actividad Tirosin-Kinasa. (Chakravarti y Lyonnet, 2002)

Sin embargo, aunque *RET* es el principal *locus* de susceptibilidad para HSCR, sólo se han identificado mutaciones asociadas a la enfermedad en su secuencia codificante en un 50% de los casos familiares y en un 3-35% de los casos aislados (Tam y García-Barceló, 2009), por lo que es evidente la existencia de otros factores implicados en su patogénesis. El papel de RET en la enfermedad de Hirschsprung convierte a los genes que codifican para las proteínas de su complejo de activación (*GDNF*, *NRTN*, *ARTN*, *PSPN*, *GFRA1*, *GFRA2*, *GFRA3* y *GFRA4*) en potenciales candidatos para el desarrollo de la enfermedad. En este sentido, se han encontrado un reducido número de mutaciones en *GDNF* asociadas a HSCR. Sin embargo, dichas mutaciones parecen no ser suficientes para originar el fenotipo, dado que la mayoría de esos pacientes presentaban alteraciones genéticas adicionales como mutaciones en *RET* o trisomía 21 (Salomon et al., 1996; Angrist et al., 1996; Ivanchuk et al., 1996; Martucciello et al., 2000). También se han identificado mutaciones asociadas a HSCR en los genes *NRTN* y *PSPN* (Doray et al., 1998, Ruiz-Ferrer, 2007). El análisis de variantes de *GFRA1* en pacientes HSCR permitió a nuestro grupo identificar una gran deleción en este gen (Borrego et al., 2003a). Este fue el primer estudio en que se reportó una mutación en un gen que codifica para uno de los co-receptores de RET en un paciente HSCR, si bien su

patogenicidad no está suficientemente aclarada. Por el contrario, otros trabajos no han identificado mutaciones en *GFRA1*, *GFRA2*, *GFRA3* o *GFRA4* asociadas a HSCR (Angrist et al., 1998; Myers et al., 1999; Onochie et al., 2000; Vanhorne et al., 2001; Borrego et al., 2003a).

A.2.3.2. Mutaciones asociadas a HSCR en los componentes de la cascada de señalización dependiente de EDNRB

Después de la identificación de *RET* como gen de susceptibilidad para HSCR, se propuso la presencia de un *locus* de susceptibilidad para esta enfermedad en 13q22 debido a los resultados de estudios de asociación realizados en población Menonita (Puffenberger et al., 1994) y a la presencia de deleciones intersticiales de 13q22 en varios pacientes HSCR (Shanske et al., 2001). Además existía sintenia entre la región 13q22 en humanos y el locus del modelo de ratón para aganglionosis *piebald-lethal*. La candidatura de *EDNRB* para esta región fue confirmada con la identificación de la mutación W276C en un paciente HSCR (Puffenberger et al., 1994), aunque la penetrancia de esta mutación no era completa y parecía estar influida por el sexo. Más tarde el rastreo de *EDNRB* en familias consanguíneas WS4, reveló la presencia de mutaciones en homocigosis en una fracción de las mismas (Attie et al., 1995b). El rastreo mutacional de *EDNRB* en series de pacientes HSCR esporádicos, ha mostrado que este gen es el segundo gen de susceptibilidad más importante en esta enfermedad, encontrándose mutaciones en aproximadamente un 5-7% de los pacientes HSCR (Amiel et al., 1996; Auricchio et al., 1996; Chakravarti, 1996; Kusafuka et al., 1996).

Sin embargo, el número de mutaciones en *EDN3* responsables del fenotipo HSCR es minoritario (Bidaud et al., 1997), siendo más prevalentes en los casos sindrómicos que en los aislados (Hofstra et al., 1996; Bolk et al., 1996; Edery et al., 1996; Pingault et al., 2001). Cabe mencionar que en esos pacientes la penetrancia de mutaciones en heterocigosis de *EDN3* y *EDNRB* es incompleta, no se identificaron mutaciones *de novo*, y el fenotipo predominante al que dan lugar es S-HSCR. Además, generalmente mientras que las mutaciones en heterocigosis dan lugar a HSCR aislado, las mutaciones en homocigosis en estos genes se han asociado con WS4 (Attie et al., 1995b; Edery et al., 1996; Hofstra et al., 1996; Verheij et al., 2002). El análisis funcional para determinar la relevancia patogénica de diferentes mutaciones en

EDNRB, ha revelado que éstas generan una pérdida de función del receptor (Abe et al., 2000).

Por último, también se ha podido identificar una mutación en heterocigosis en el gen *ECE1* en un paciente HSCR con defectos cráneo-faciales y cardíacos (Hofstra et al., 1999), ya que esta proteína participa en la maduración postraduccional no sólo de EDN3 sino también de EDN1 y EDN2.

A.2.3.3. *Mutaciones asociadas a HSCR en genes que codifican para factores de transcripción y otros elementos celulares*

En el gen *SOX10* se han descrito numerosas mutaciones tanto en formas familiares como esporádicas de WS4, pero también en pacientes WS2 (sin alteraciones gastrointestinales), y en pacientes que además de alteraciones propias de WS4 presentan desórdenes neurológicos debidos a desmielinización central y periférica conocidas como PCWH (*Peripheral demyelination, Central dysmyelinating leucodystrophy, Waardenburg síndrome and Hirschsprung disease*) (Pingault et al., 1998, 2002; Inoue et al., 1999; Southard-Smith et al., 1999; Touraine et al., 2000; Sham et al., 2001; Verheij et al., 2006; Shimotake et al., 2007; Bondurand et al., 2007). El análisis de estas mutaciones junto con el fenotipo al que estaban asociadas mostró que existía una correlación entre la localización específica de la mutación dentro de la secuencia de *SOX10* y la longitud del segmento agangliónico. Así, mutaciones que afectan al dominio de unión a DNA, conducen a una hipoganglionosis o a S-HSCR, mientras que mutaciones en el dominio de transactivación llevan a una aganglionosis total del colon o a L-HSCR (Sham et al., 2001). De este modo, mutaciones en *SOX10* parecen conducir a una reducción del número de precursores que colonizan el intestino en desarrollo. Hasta el momento, sin embargo, no se habían encontrado mutaciones en *SOX10* asociadas a formas no sindrómicas de HSCR (Bondurand et al., 2007).

El rastreo mutacional de *PHOX2B* en una serie de pacientes con CCHS ha permitido identificar mutaciones que alteran la pauta de lectura (*frameshift mutations*), así como expansiones de las regiones polialaninas (Amiel et al., 2003; Sasaki et al., 2003). Sin embargo, el análisis de la secuencia del gen en una amplia cohorte de casos HSCR no sindrómicos en población China no ha revelado la presencia de ninguna mutación causante de este fenotipo, aunque sí

la existencia de una variante sobre-representada en este grupo de pacientes al comparar con un grupo control (García-Barceló et al., 2003a).

También se han encontrado mutaciones en el gen *SIP1* (Smad Interacting Protein-1), también conocido como *ZFH1B* (Zinc Finger Homeo box 1B), en pacientes con síndrome de Mowat-Wilson, caracterizado por retraso mental, malformaciones, y otras anomalías congénitas, que con frecuencia incluyen HSCR (Cacheux et al., 2001; Wakamatsu et al., 2001; Amiel et al., 2001; Mowat et al., 2003). *SIP1* es un factor de la transcripción implicado en el desarrollo del SNE, que media en la señalización de BMP-4 y BMP-2, y participa en la expresión de *EDNRB*. Se piensa que estos fenotipos son el resultado de la haploinsuficiencia de *SIP1* generada por mutaciones en uno de los alelos.

Por otra parte, se han descrito mutaciones en homocigosis en el gen *KIAA1279* en dos familias independientes que presentan el síndrome de Goldberg-Shprintzen (Brooks et al., 2005). Este síndrome se caracteriza por la aparición de microcefalia, retraso mental, rasgos dismórficos y HSCR. La función de la proteína codificada por este gen aún no se conoce, pero el análisis de los distintos motivos proteicos predice que podría estar implicada en la regulación del ciclo celular, control transcripcional, neurogénesis y plegamiento de proteínas (Brooks et al., 2005). Por otra parte, se ha visto expresión en distintas partes del SNC. Así, la identificación de mutaciones en este gen asociadas a HSCR, hace pensar que podría jugar un papel importante en el desarrollo del SNP y SNC.

Se han reportado diversas mutaciones en el gen *L1CAM* en pacientes con hidrocefalia y HSCR (Okamoto et al., 2004). A pesar de que *L1CAM* se expresa durante el desarrollo del SNE (Heanue y Pachnis, 2007), hasta hoy no se ha demostrado de manera significativa si este gen es un factor modificador de HSCR o no (Hosftra et al., 2002; Parisi et al., 2002).

Recientemente también se han detectado mutaciones *de novo* en el gen *TCF4* en pacientes con síndrome de Pitt-Hopkins, caracterizado por retraso mental, malformaciones faciales, hiperventilación intermitente y HSCR (Amiel et al., 2007; Zeweire et al., 2007). *TCF4* codifica para un factor de transcripción implicado en la ruta PHOX-RET durante el desarrollo del SNE, por lo que la falta de función de éste podría ser la responsable de la aparición de HSCR en estos pacientes.

A.2.3.4. Nuevos genes candidatos por función para HSCR

Como se ha visto antes, la mayor parte de los genes que presentan mutaciones asociadas a HSCR están implicados en el desarrollo del SNE. En este sentido, siguen existiendo todavía genes implicados en el desarrollo del SNE, cuya candidatura como genes asociados a HSCR no ha sido evaluada. Resulta por tanto interesante el estudio de dichos genes cuyo análisis podría contribuir a profundizar en el conocimiento de la patogénesis de esta enfermedad poligénica, como por ejemplo el gen *NTRK3*. Nuestro grupo ya ha detectado una mutación en heterocigosis en su ligando NTF3 en un paciente HSCR esporádico (Ruiz-Ferrer et al., 2008). Además, se ha investigado la localización de las neurotrofinas y sus receptores en intestino normal y en intestino procedente de pacientes con aganglionsis colónica, tanto en su etapa de formación como postnatal, observándose una ausencia de NTF3 en el colon agangliónico y una reducción en la zona de transición del intestino. También se observó una ausencia de Ntrk3 en las fibras nerviosas hipertróficas de los segmentos agangliónicos de pacientes HSCR, cuando sí aparecía tanto en intestino normal como en intestino proximal gangliónico en casos HSCR (Hoehner et al., 1996). Asimismo, se ha descrito un descenso en los niveles de expresión de *NTRK3* en pacientes HSCR y pacientes con constipación idiopática por tránsito lento (Facer et al., 2001).

También se ha propuesto la implicación de las semaforinas en la formación del SNE, tal y como se ha expuesto con anterioridad. Existen evidencias de que dichos señalizadores moleculares intervienen en el guiado, no sólo de axones del SNE, sino también de los precursores de los ganglios entéricos en distintos modelos animales (Sheperd y Raper, 1999; Anderson et al., 2007). Además, los mediadores de la ruta de señalización dependiente de semaforinas ya han sido previamente propuestos como genes candidatos para HSCR en base al resultado obtenido en un análisis de los perfiles de expresión durante el desarrollo del SNE (Heanue y Pachnis, 2006). Datos preliminares de estudios de asociación a escala genómica muestran un grupo de SNPs asociados a HSCR en la región cromosómica 7q21.11, en la que se localizan *SEMA3A* y *SEMA3D* (Arnold et al., 2009b; Figura A.17), lo que los convierte en genes candidatos para la enfermedad de HSCR. Sin embargo, no se han descrito mutaciones en ninguno de los genes que participan en la ruta de señalización de las semaforinas hasta hoy.

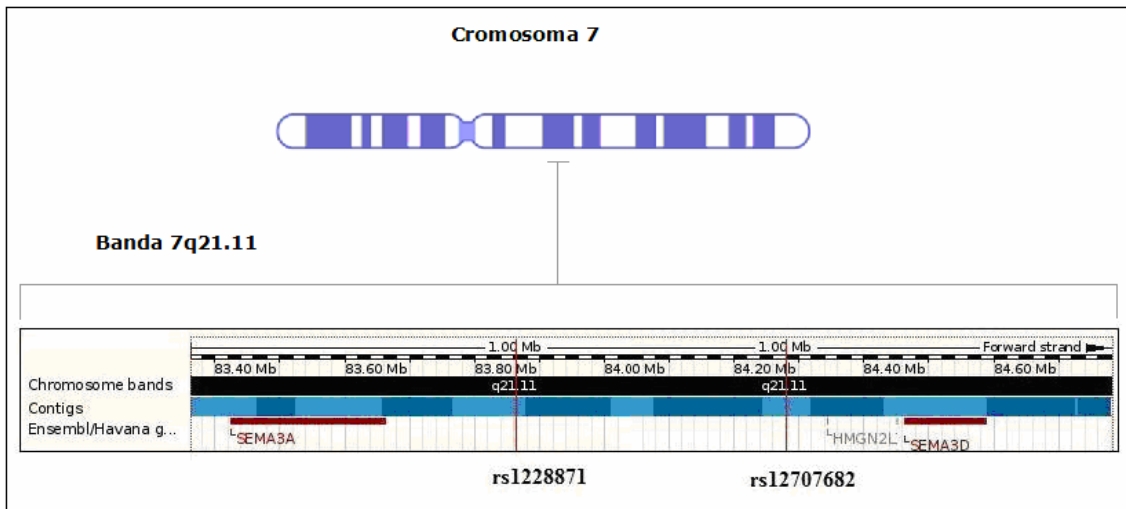


Figura A.17 Región cromosómica asociada a la aparición de HSCR en la que se localizan los genes *SEMA3A* y *SEMA3D*.

Por otra parte, además de la evaluación de nuevos genes candidatos por función como genes de susceptibilidad para HSCR, resultaría interesante la búsqueda de alteraciones genéticas de otra naturaleza en los genes en los que ya se han descrito mutaciones en su región codificante asociadas a HSCR. En este sentido, recientemente se ha señalado la implicación de alteraciones en la dosis génica en el diagnóstico, pronóstico y terapia de muchas enfermedades humanas (Henrichsen et al., 2009). En HSCR parece existir una predominancia de mutaciones *nonsense* y *missense*, aunque también se han descrito pequeñas deleciones e inserciones, mutaciones que alteran la pauta de lectura y mutaciones de *splicing* (Human Gene Mutation Database del Institute of Medical Genetics in Cardiff, <http://www.hgmd.cf.ac.uk>). La explicación de una tasa tan baja de variaciones en el número de copias (CNV, *Copy Number Variations*) asociadas a HSCR podría deberse a que las técnicas habitualmente empleadas en los rastreos mutacionales de estos pacientes, como SSCP, dHPLC o secuenciación directa, sólo son capaces de detectar deleciones/duplicaciones pequeñas (decenas de pares de bases). Por otra parte, las técnicas de citogenética sólo permiten detectar alteraciones del orden de megabases. Por lo que las deleciones/duplicaciones de tamaño medio asociadas con frecuencia a enfermedades, que comprenden un gen o parte de él, no pueden ser detectadas con ninguna de estas técnicas. Nuestro grupo llevó a cabo un estudio para evaluar la presencia de CNVs en genes implicados en HSCR utilizando un kit comercial de MRC-Holland que incluía los genes *RET*, *ZFHX1B*, *EDN3* y *GDNF* y no reveló asociación de CNVs con HSCR en estos genes (Núñez-Torres et al., 2009). Los mismos resultados se observaron en población

alemana (Serra et al., 2009). Sin embargo, estudios adicionales en otros genes relacionados con HSCR son necesarios para descartar completamente la implicación de CNVs en la patogénesis de HSCR.

En resumen, podemos decir que HSCR es una enfermedad compleja que resulta de la interacción de varios genes y se manifiesta con una penetrancia baja y dependiente de sexo y con una expresión del fenotipo variable.

A.2.4. Factores de susceptibilidad genéticos para las formas esporádicas de la enfermedad de Hirschsprung

Aunque existen un alto número de genes cuya implicación en HSCR ha sido demostrada, mutaciones en estos genes son sólo responsables de algo más de la mitad de los casos familiares y de una menor proporción de casos esporádicos. Existen cada vez más evidencias de que la susceptibilidad a HSCR depende de alteraciones de secuencia que pueden tener un efecto menos severo sobre la proteína o que se encuentran en regiones no codificantes (Brooks et al., 2005).

En este sentido, además de las mutaciones tradicionales que dan lugar a HSCR, se ha observado que existen polimorfismos y haplotipos de *RET* que se encuentran fuertemente asociados a las formas esporádicas de la enfermedad. En sentido estricto, un polimorfismo es la aparición de una variante en la secuencia de DNA que presenta al menos dos alelos distintos con una frecuencia superior al 1% en población general. Existen distintos tipos de polimorfismos en humanos: *Copy number variations* (CNV), microsatélites STR (*Short Tandem Repeat* o *Dinucleotide Microsatellite Repeat Polymorphism*), *Restriction Fragment Long Polymorphism* (RFLP), *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR); pero en general en este trabajo hemos utilizado el término polimorfismo para referirnos a polimorfismos de cambio de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP). La mayor parte de estos polimorfismos aparecen en regiones no codificantes y suelen no tener ningún impacto sobre el fenotipo. Aquellos polimorfismos que generan alteraciones fenotípicas y enfermedad se denominan mutaciones. Sin embargo, muchos SNPs a los que tradicionalmente no se les había considerado dañinos han resultado tener consecuencias muy importantes en el fenotipo del individuo (Richard y Beckmann, 1995). Por otra parte, el uso de SNPs para el análisis de asociación de regiones cromosómicas o de variantes genéticas con enfermedades humanas

ha resultado ser una herramienta muy potente en la caracterización de nuevos genes responsables de diversas enfermedades. Se denomina haplotipo a la combinación específica de alelos dentro de una región cromosómica. Los SNPs que se encuentran en dicha región están ligados y por lo tanto se transmiten conjuntamente de generación en generación, por lo tanto un haplotipo es un grupo de SNPs que se heredan en bloque. Gracias a esto, el estudio de un número reducido de SNPs dentro de un *locus* permite la identificación del resto de sitios polimórficos en dicha región. El estudio de haplotipos se ha convertido en una herramienta útil y potente en genética humana.

Los primeros factores de susceptibilidad genéticos para HSCR fueron encontrados por nuestro grupo a raíz de los resultados del análisis genético de los miembros de una familia MEN2A/HSCR (Borrego et al., 1998). Se postuló que ambos fenotipos estaban asociados a la mutación puntual C620S de *RET*, ya que la secuenciación directa de *RET* y *GDNF* descartó la posibilidad de que existiera una segunda mutación en la región codificante de estos genes en el único miembro que presentaba ambos fenotipos. Sin embargo, se vio que este paciente era homocigoto para el polimorfismo silente A45A (c.135G>A), ubicado en el exón 2 de *RET*. Este dato sugería la posibilidad de que A45A pudiera ser un factor de susceptibilidad para la enfermedad de HSCR, actuando como un alelo de baja penetrancia.

Para evaluar este supuesto, se genotiparon 7 SNPs en la secuencia codificante del proto-oncogén *RET* (A45A, V125V, A432A, G691S, L769L, S836S y S904S) en una serie de pacientes HSCR esporádicos y en un grupo de controles no relacionados y sin antecedentes de enfermedades gastrointestinales (Borrego et al., 1999). Este estudio demostró una estrecha asociación de las variantes A45A y L769L (c.2307T>G) a la aparición del fenotipo HSCR. Para determinar si los cSNPs asociados a HSCR conferían *per se* la predisposición a la enfermedad, o bien existía un *locus* en desequilibrio de ligamiento causante de la misma, se trazaron los haplotipos de *RET* constituidos por la combinación de los 7 cSNPs. Mediante el análisis de segregación de las variantes en las triadas constituidas por los pacientes índices y sus padres se identificaron doce haplotipos diferentes. Todos los haplotipos que incluían el polimorfismo A45A, estaban sobre-representados al comparar HSCR y controles (Borrego et al., 2000).

Por otra parte, la aparición de un nuevo miembro en la familia MEN2A/HSCR publicada en 1998, que presentaba fenotipo HSCR pero no portaba la mutación C620S, parecía indicarnos que la mutación no era la

causante de este fenotipo en la familia. Es más, se encontró que los dos miembros de la familia con fenotipo HSCR eran los únicos homocigotos para la variante A45A (Fernández et al., 2003). La relevancia de los datos aportados por nuestro grupo fue confirmada en distintas poblaciones, tales como la alemana, italiana o china (Fitze et al., 1999; Sancandi et al., 2003; García-Barceló et al., 2003b). Inicialmente se propusieron mecanismos directos de actuación de A45A, como la activación de sitios críticos de maduración, la disminución de la expresión del alelo portador de la variante conduciendo a una haploinsuficiencia funcional, o el uso preferencial de tRNA específicos que disminuiría la eficiencia de la traducción del alelo que porta el polimorfismo (Borrego et al., 1999, 2000). Sin embargo, estas hipótesis no han podido ser corroboradas funcionalmente. Por otra parte, se propuso que la variante A45A podría estar en desequilibrio de ligamiento con algún locus funcional desconocido en aquel momento (Borrego et al., 1999, 2000; Fitze et al., 1999).

El análisis de estos datos mediante TDT (*Transmission Disequilibrium Test*, test de desequilibrio de transmisión) y LD-mapping (*Linkage Disequilibrium mapping*, mapeo genético empleando desequilibrio de ligamiento) parecía indicar la existencia de un locus ancestral, localizado en un intervalo de hasta -20kb respecto de A45A y en dirección 5', en desequilibrio de ligamiento con A45A. Inicialmente, el rastreo del extremo 3' del intrón 1 de *RET* permitió la caracterización de las variantes c.74-126G>T, c.74-1370C>T y c.74-1463T>C, que mostraron estar significativamente sub-representadas en la cohorte HSCR con respecto al grupo control. Además, tras la generación de haplotipos constituidos por la combinación de las tres variantes, se demostró la existencia de un haplotipo fuertemente asociado a HSCR (haplotipo 0: c.74-1473T, c.74-1370C, c.74-126G) (Borrego et al, 2003a). Los nuevos cálculos de LD-mapping permitieron especular sobre la existencia de una hipotética mutación para HSCR a una distancia alrededor de las 20-30 kb de A45A, quizá aún dentro del intrón 1. Así, era plausible que dicha mutación se localizase dentro de un motivo funcional no conocido hasta la fecha, que controlaría la actividad transcripcional de *RET*. Por ello, se continuó con el rastreo mutacional sistemático a lo largo del intrón 1, exón 1 y las 12 kb hacia 5' con respecto al inicio de traducción, con el fin de identificar ese hipotético locus fundador responsable de una gran proporción de HSCR esporádicos (Fernández et al., 2005). Aunque no se encontraron mutaciones germinales en el sentido tradicional de la palabra en nuestros pacientes, sí se detectaron un total de 25 nuevos polimorfismos que mostraron encontrarse en desequilibrio de ligamiento con el llamado haplotipo 0 (c.74-1473T, c.74-1370C, c.74-126G; Borrego et al.,

2003a) y A45A, y fuertemente asociados a la enfermedad. Esta asociación fue demostrada, no sólo por los resultados de estudios comparativos entre los casos HSCR y los controles, sino también por los desprendidos del análisis por TDT en las triadas HSCR. El desequilibrio de ligamiento se mantenía a lo largo de toda la región analizada hasta la posición -1249. La importancia de estos resultados reside en el hallazgo de un punto de ruptura del LD (*LD-breakpoint*) que nos permitió acotar en 5' la región de *RET* ligada a HSCR. Estos resultados parecían descartar la existencia de una mutación causante de HSCR tal como se concibe en el sentido tradicional, pero reforzaban la idea de la presencia de un marcador o de una combinación específica de marcadores que confieren susceptibilidad a la enfermedad con baja penetrancia. Así, el haplotipo que confiere susceptibilidad a HSCR de *RET* junto con otros factores de susceptibilidad en otros genes, podría dar lugar a la aparición del fenotipo, lo que estaría en consonancia con un modelo de enfermedad poligénica y herencia multifactorial para HSCR. Para dilucidar el mecanismo preciso de actuación de este alelo de *RET* cabría plantearse el papel que podrían desempeñar las dos variantes situadas a -200 y -196 pb con respecto al ATG inicial de *RET*, por estar situadas en una zona de posible unión a factores de transcripción. En este sentido, nuestro grupo realizó estudios funcionales, demostrando igualmente que el haplotipo asociado a HSCR da lugar a una actividad transcripcional significativamente menor que la que originan el resto de haplotipos identificados (Fernández et al., 2005). Por otra parte, se vio que ambas variantes estaban localizadas en el sitio de unión para el factor de transcripción TTF-1, demostrándose un descenso en la transcripción de *RET* en presencia de la combinación -200A,-196C asociada a HSCR (García-Barceló et al., 2005). Además, los patrones de expresión de TTF-1 y *RET* coinciden durante el desarrollo del SNE. Por tanto, se podría postular que TTF-1 estaría implicado en la regulación de la expresión de *RET* durante el desarrollo del SNE, dándose una reducción de los niveles de expresión en presencia del haplotipo asociado a HSCR.

En base a estos hallazgos, completamente reproducibles en varias series de pacientes de distinto origen geográfico (Griseri et al., 2005; García-Barceló et al., 2005; Burzynski et al., 2005; Pelet et al., 2005), se realizó un estudio para refinar la región de *RET* en asociación con la enfermedad, integrando los resultados con un análisis genómico funcional comparativo para identificar los elementos conservados y funcionales (Emison et al., 2005). Gracias a este análisis se encontró un dominio conservado entre especies con función potenciadora de la transcripción (*enhancer-like domain*), situado entre las

kilobases 9 y 10 del intrón 1. Los estudios *in silico* e *in vitro* predicen que variantes localizadas en ese dominio podrían reducir marcadamente la actividad promotora de transcripción, y explicarían varios rasgos del complejo patrón de herencia de HSCR. Además, demostraron que este dominio era uno de los principales reguladores de la expresión de *RET*, potenciándola específicamente en el SNE (Grice et al., 2005). La hipótesis del impacto en HSCR de variantes de secuencia en ese dominio *enhancer-like*, nos permitiría especular sobre la posibilidad de que factores adicionales interaccionasen con este elemento y pudiesen actuar modulando la actividad transcripcional de *RET*. Así cabría esperar que la penetrancia de dicha mutación dependiese de otros genes, factores epigenéticos e incluso ambientales, lo que concordaría de nuevo con un modelo poligénico y complejo de esta enfermedad.

Por otra parte, nuestro grupo y otros también habían identificado lo que se había denominado un "haplotipo protector" para HSCR, por encontrarse claramente sub-representado en pacientes al comparar con controles. Dicho haplotipo se caracterizaba por la presencia de la variante S836S (c.2508C>T, exón 14) (Borrego et al., 1999, 2000; Griseri et al., 2000), que a su vez se encuentra en desequilibrio de ligamiento con la variante c.74-126G>T (Borrego et al., 2003a). Diversos argumentos sugerían que podría existir una variante funcional en la región 3' de *RET* ligada a S836S y responsable de ese efecto protector. Recientemente, se ha logrado caracterizar la variante c.*587T>C (g.128496T>C) localizada en extremo 3'UTR del gen, que podría afectar la estructura secundaria del mRNA de *RET* (Griseri et al., 2007), pudiendo estar implicado en la patogénesis de HSCR y MTC esporádico. Esta variante, además, está en desequilibrio de ligamiento con S836S (c.2508T) y también con la variante c.74-126T, ambas consideradas como alelos que predisponen a MTC y protegen frente HSCR (Gimm et al., 1999; Griseri et al., 2000; Ruiz et al., 2001; Borrego et al., 2003a; Fernández et al., 2006; Fugazzola et al., 2008). Los resultados de estos ensayos funcionales sugieren que la presencia de c.*587T>C (g.128496T>C) podría obstaculizar la degradación del mRNA de *RET*, conduciendo a un aumento de los productos de transcripción, y consiguientemente a un aumento de la cantidad de proteína en la membrana celular, lo que explicaría el efecto protector frente a HSCR.

A.2.5. Interacción entre vías de señalización y factores modificadores. Estudios de ligamiento y estudios de asociación a escala genómica

Como ya se ha expuesto con anterioridad, la completa colonización del tracto gastrointestinal por parte de los precursores procedentes de la cresta neural, su correcta diferenciación y la formación de los ganglios entéricos depende de la actuación coordinada de una red de moléculas que interactúan entre sí. Por este motivo, es probable que exista un nexo genético, además de funcional, entre dichas moléculas. Las rutas de señalización de RET y EDNRB fueron consideradas en un principio como rutas con independencia bioquímica. Sin embargo, la concurrencia de una mutación en *RET* y otra en *EDNRB* en un paciente HSCR parecía indicar lo contrario (Auricchio et al., 1999). Además, este hallazgo indicaba que para la manifestación del fenotipo puede ser necesaria la presencia de más de una mutación, especialmente cuando el efecto de éstas no es severo. La interacción de estas dos rutas (Figura A.18) también se puso de manifiesto en el estudio de asociación en población menonita en la que se había detectado la presencia de la mutación W276C en *EDNRB* (Puffenberger et al., 1994). Dicho estudio demostró que esta mutación se transmitía conjuntamente con las variantes comunes de *RET* que habían sido asociadas a HSCR en los individuos afectados, y que en dicha población aumentaba la penetrancia de la mutación en *EDNRB*, aumentando por tanto el riesgo de padecer la enfermedad (Carrasquillo et al., 2002). De la misma manera se ha observado que la presencia de una determinada combinación de SNPs en el gen *PHOX2B* incrementa la susceptibilidad a HSCR en individuos portadores de las variantes en *RET* asociadas a HSCR (García-Barceló et al., 2003b; Miao et al., 2007). Además en ratones, *Sox10* ha mostrado interactuar con *Ret* y con *Ednrb/Edn3* (Lang et al. 2000; Cantrellet al. 2004; Stanchina et al., 2006).

En la mayoría de los casos, mutaciones puntuales en los genes anteriormente descritos conducen a la aparición de formas sindrómicas de HSCR, o bien de formas aisladas de L-HSCR. Sin embargo existe una gran proporción de casos S-HSCR en los que no se han identificado las causas genéticas responsables de este fenotipo. En los últimos años se han realizado diversos estudios de ligamiento genómico en familias HSCR con el objetivo de identificar regiones del genoma asociadas a la aparición de esas formas aisladas de S-HSCR, que son las más frecuentes y que parecen tener una herencia

multifactorial. De esta manera no sólo se han identificado nuevos genes y *loci* de susceptibilidad para HSCR, sino que también se han determinado nuevas interacciones genéticas que actúan de manera aditiva para dar lugar a HSCR.

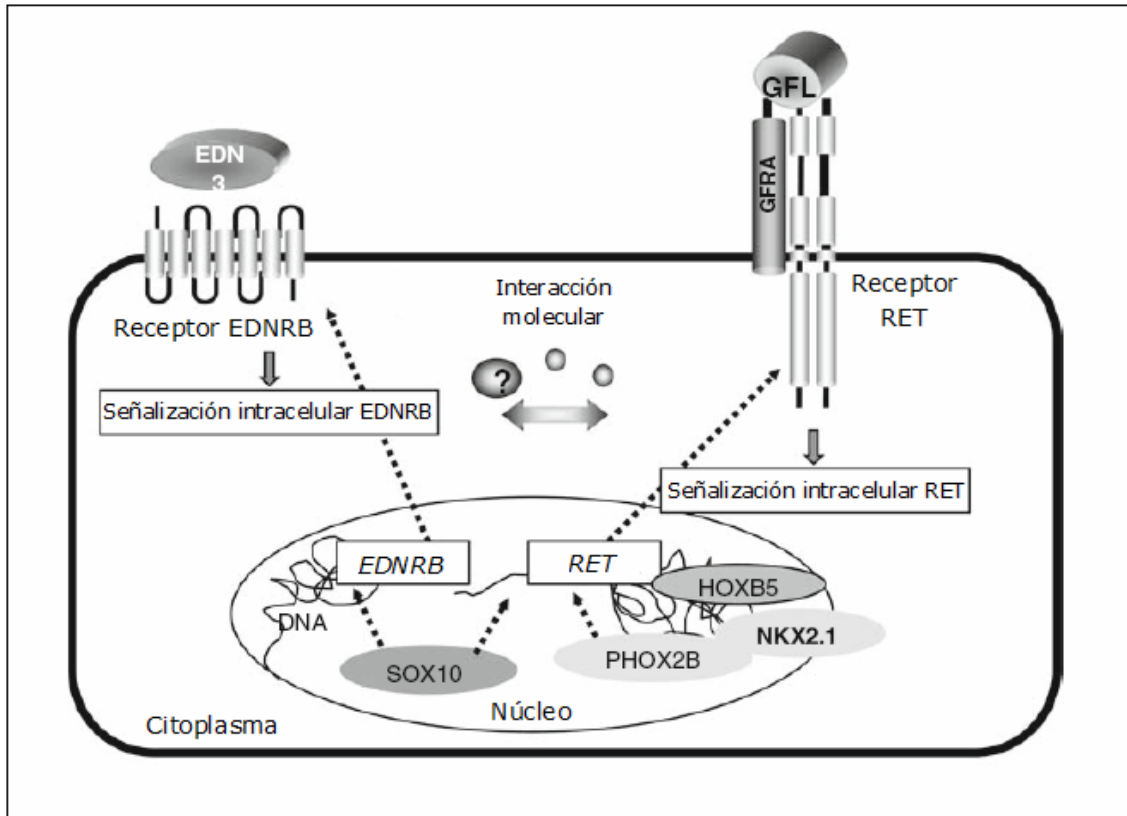


Figura A.18. Representación esquemática de una célula derivada de la cresta neural y de la interacción de las rutas de señalización dependientes de RET y de EDNRB. Adaptada de Tam y García-Barceló, 2009.

En el primer estudio se analizaron un total de 12 familias, con 2 o más individuos afectados por familia, utilizando una amplia variedad de marcadores microsatélite distribuidos por todo el genoma. De este modo, se identificó un nuevo *locus* de susceptibilidad en la región cromosómica 9q31 que, en conjunción con *RET*, conduce a la aparición del fenotipo HSCR en una de las familias que no tenía mutaciones en la región codificante de *RET*, pero que sí mostraba ligamiento de este *locus* con la enfermedad (Bolk et al., 2000). Esto hizo pensar que, aunque las mutaciones que imposibilitan la funcionalidad de RET pueden ser necesarias para la aparición del fenotipo HSCR, las mutaciones hipomórficas en este locus pueden necesitar de la presencia de otros factores genéticos, como el localizado en 9q31, para la expresión de HSCR.

Posteriormente, se analizaron 371 marcadores VNTR en 49 familias S-HSCR, demostrando la existencia de tres *loci* de susceptibilidad situados en 3p21, 10q11 y 19q12, siendo *RET* el gen de susceptibilidad localizado en 10q11 (Gabriel et al., 2002). Se propuso que tanto 3p21 como 19q12 eran *loci* dependientes de *RET* y por lo tanto modificadores de la expresión de *RET*.

En otro estudio similar con marcadores microsatélites STR y SNPs, se identificaron *loci* de susceptibilidad para HSCR en las regiones 10q11, 13q22 y 16q23 (Carrasquillo et al., 2002). Este análisis se realizó en 43 triadas familiares de origen menonita, población con alto índice de consanguinidad que presenta una incidencia de HSCR de 1:500 nacidos vivos. De nuevo, se llegó a la conclusión de que *RET* correspondía con el gen de susceptibilidad de 10q11, y como hemos visto con anterioridad, *EDNRB* correspondía con el localizado en 13q22. En cuanto a 16q23, los autores sugirieron la posible candidatura de dos genes localizados en esta región, e implicados en el desarrollo del SNE (*CDH13* y *PLCG2*), aunque hasta el momento no se ha reportado ningún trabajo en el que se analice su asociación con la patología.

En otro estudio se realizó el genotipado de 4.244 SNPs en 35 familias HSCR de la población menonita usando tecnología Affymetrix (Lin et al., 2004). De este modo se identificaron tres *loci* asociados con la enfermedad: 13q22, 21q21 y 10q21. Igualmente, los genes localizados en 13q22 y 10q21 corresponderían a *EDNRB* y *RET*, respectivamente. Sin embargo, aparece por primera vez el locus 21q21 asociado a HSCR, donde se localiza el gen *NCAM2* (*neural cell adhesion molecules 2*). La localización de esta región asociada a HSCR en el cromosoma 21 resulta también interesante dada la asociación entre HSCR y síndrome de Down.

Un estudio realizado en una familia multigeneracional de origen alemán con 5 miembros afectados de HSCR reveló un ligamiento a la región 4q31-q32 (Brooks et al., 2006). Ningún gen localizado en esta región cromosómica se había relacionado previamente con la enfermedad. *MAB21L2* era el mejor gen candidato dentro de esta región tanto por posición como por función ya que durante el desarrollo embrionario de ratón se expresa en el SNC y cresta neural. Sin embargo, al analizar la secuencia codificante del gen no se encontraron mutaciones y se propuso que el locus 4q posiblemente sea necesario pero no suficiente para causar HSCR en ausencia de otros *loci* modificadores.

Recientemente, un estudio de asociación a escala genómica realizado en 181 pacientes HSCR esporádicos de origen chino empleando tecnología Affymetrix, reveló, además de una clara asociación con *RET*, que la aparición de HSCR estaba asociada a la región cromosómica 8p12 en la que se localiza el gen *NRG1* (García-Barceló et al., 2009). El estudio de las variantes de secuencia localizadas en este gen en dicha serie de pacientes reveló que se comportaba como un factor modificador de la penetrancia para HSCR, aunque hasta el momento no se han detectado variantes causales que puedan ser responsables de una pérdida de la funcionalidad de la proteína o una disminución de su expresión.

Todos estos datos ponen de manifiesto nuevamente la presencia del carácter poligénico de HSCR, y la necesidad de identificar nuevos genes asociados a la enfermedad para profundizar en el conocimiento de las bases moleculares de la misma, de las interacciones genéticas entre distintos *loci* para dar lugar al fenotipo HSCR y del desarrollo del SNE. Otra aproximación experimental que se ha llevado a cabo para ampliar nuestro conocimiento sobre el desarrollo del SNE y los genes que participan en este proceso es el análisis de expresión en diferentes tejidos. Los datos de dicha expresión, así como las diferencias de expresión entre distintas condiciones nos pueden ofrecer resultados muy interesantes que nos ayuden a identificar nuevos genes candidatos para la enfermedad de HSCR. En este sentido son significativos los estudios realizados en intestino de ratón *Ret*^{-/-} tanto agangliónico como normogangliónico, así como de intestino control utilizando tecnología Affymetrix (Heanue et al., 2006; Vohra et al., 2006).

A.3. Caracterización clínica y bases moleculares de la Displasia Neuronal Intestinal

A.3.1. Características clínicas y clasificación de la Displasia Neuronal Intestinal

La displasia neuronal intestinal (DNI, OMIM 601223) fue descrita por Meier-Ruge en 1971 como una malformación del SNE (Meier-Ruge, 1971; Puri y Shinkai 2004), que se clasifica en dos subtipos diferentes desde el punto de vista clínico e histológico (Fadda et al, 1983). La DNI tipo A (OMIM 243180), que aparece en menos del 5% de los casos, se caracteriza por aplasia o

hipoplasia congénita de la innervación simpática, y se presenta de forma aguda en el periodo neonatal con episodios de obstrucción intestinal, diarrea y deposiciones con sangre. La clínica de la DNI tipo B (OMIM 601223), recuerda a la de HSCR, apareciendo con cierta frecuencia asociada a ella. Se caracteriza por una malformación del plexo parasimpático submucoso, y abarca alrededor del 95% de los casos de DNI aislados. Estos niños presentan un estreñimiento crónico y un tránsito intestinal fuertemente disminuido. Los rasgos histológicos propios de esta enfermedad incluyen hiperplasia del plexo submucoso, aparición de ganglios gigantes con más de 7 células por ganglio, presencia de ganglios ectópicos en las capas muscular y mucosa, y un incremento en la actividad acetilcolinesterasa de la lámina propia y alrededor de los vasos sanguíneos de la submucosa, que indica inmadurez en el SNE (Puri and Shinkai 2004). A pesar de que se trata de una anomalía del plexo submucoso, en algunos casos se han encontrado anomalías en la innervación de la capa *muscularis*, debido a una hiperplasia del plexo mientérico en la región displásica de pacientes DNI B (Kobayashi et al., 1996b), pero se acepta de manera generalizada que es una condición que afecta exclusivamente al plexo submucoso.

La DNI ha generado una gran controversia a lo largo de los años, en gran medida debido a la falta de un criterio claramente establecido para su diagnóstico. Muchos de los rasgos histológicos propios de la DNI pueden ser también indicativos de inmadurez del SNE y pueden aparecer en individuos sanos a edades tempranas. Esto ha provocado que la cohorte de pacientes de algunos estudios no esté bien caracterizada y que algunos profesionales sanitarios duden de la existencia de la DNI como entidad clínica. Sin embargo, el esfuerzo conjunto de la comunidad científica en este campo ha permitido definir claramente cuáles son los criterios diagnósticos para DNI B generalmente aceptados. Dichos criterios establecen que se deben encontrar un mínimo del 20% de ganglios gigantes (al menos 8 células nerviosas por ganglio) en 30 cortes consecutivos de preparación histológica, analizando al menos 25 ganglios. La edad de diagnóstico debe ser siempre superior a un año. Además, otro de los problemas en el diagnóstico de esta enfermedad, es que la aparición de ganglios gigantes se considera una característica propia de la variabilidad interindividual normal, y es por esto que la aparición de unos criterios diagnósticos claramente definidos ha sido fundamental para avanzar en el conocimiento de esta patología.

La presencia de estos ganglios gigantes se debe a un aumento del número de células nerviosas en el segmento de intestino afecto, siendo éstas

de menor tamaño que las que aparecen en intestino normal y tendiendo a agruparse en ganglios esféricos gigantes en lugar de los ganglios con forma de disco que se observan en el intestino normogangliónico. En contraposición con lo que ocurre en HSCR, DNI B no incluye región agangliónica, pero en algunas ocasiones se han descrito un incremento de las fibras nerviosas extrínsecas en la región de intestino afecta, tal y como ocurre en HSCR (Meier Ruge et al, 1995).

Existen evidencias que apuntan hacia una posible conexión entre estas dos afecciones del SNE, ya que en muchas ocasiones el intestino HSCR presenta una zona de transición próxima a la región agangliónica que recuerda a DNI B (Meier Ruge et al, 1995; Kobayashi et al., 1995; Schmittenbecher et al, 1999). En este sentido, varios investigadores han descrito que entre un 25% y un 35% se presentan pacientes con DNI B en asociación con HSCR (Fadda et al, 1983; Kobayashi et al, 1995; Holschneider y Puri, 2000).

El tratamiento de la DNI B puede pasar en algunos casos por la resección quirúrgica del segmento intestinal afectado de la misma manera que en el caso de pacientes HSCR. Sin embargo, en un 50% de los casos no es necesario tratamiento quirúrgico, ya que el tratamiento conservativo es suficiente (Skaba et al., 2006). Estos casos se tratan con enemas y laxantes, y las deposiciones se pueden eliminar bajo anestesia general con la dilaceración del esfínter anal. Se observa una maduración normal del intestino afectado, desapareciendo los síntomas con el tiempo en la mayor parte de los casos. Normalmente, con el tratamiento conservativo, los síntomas remiten después de los 4 años de edad, aunque nunca completamente en el 30% de los pacientes (Schmittenbecher et al., 2000).

A.3.2. Etiopatogenia y Epidemiología de la DNI B

La etiopatogenia de la DNI B sigue siendo un enigma para la comunidad científica. Normalmente se asume que es una condición congénita, debida a un retraso en la maduración del SNE, aunque la asociación de esta patología con una obstrucción intestinal crónica puede apoyar la idea de que dicha obstrucción, o la inflamación asociada, sea causa de una reacción del sistema nervioso entérico, ya sea en el feto o durante el periodo postnatal (Gálvez et al., 2004; Kobayashi et al., 2004)). En este sentido se ha observado la

presencia de DNI B en la submucosa proximal de distintas lesiones por estenosis, así como asociada a disganglionosis primarias mientéricas (Kapur, 2003; Meier-Ruge et al., 2004; 2006). Sin embargo existen numerosas evidencias que apoyan el origen congénito de esta enfermedad, como se verá en el siguiente apartado. De hecho, se ha sugerido en varias ocasiones la posibilidad de que DNI B sea, al igual que HSCR, una malformación del desarrollo neural (Kapur, 2003). Bajo este supuesto, resulta fácil pensar en que fallos en la señalización y diferenciación neural del SNE, parecidos a los que dan lugar a HSCR, puedan ser responsables de un aumento en el número de precursores neurales diferenciados que darán lugar a la hiperganglionosis característica de la DNI B. Esto podría resultar incluso más evidente en los casos de DNI B asociada a HSCR, en los que los mismos fallos que dan lugar a la aganglionosis podrían jugar un papel muy importante en la acumulación de precursores diferenciados en la región anterior a dicha aganglionosis.

Al igual que HSCR, la DNI B está catalogada como una enfermedad rara. Su incidencia es difícil de estimar debido a la variabilidad de su expresión clínica y a las dificultades de establecer el diagnóstico. En general, se acepta que alrededor de un 3% de los niños por encima de un año que presentan estreñimiento crónico padecen DNI (Meier-Ruge et al., 2006). En nuestra población se ha descrito una incidencia para la DNI B de 1 por cada 7.500 recién nacidos vivos (Granero et al., 2007), aunque la incidencia de esta enfermedad es muy variable de unos estudios a otros, siendo siempre inferior a la de HSCR (Meier-Ruge et al., 1992; Martucciello et al., 1994; Berger et al., 1998). En cualquier caso, podemos afirmar que la DNI B es la segunda afección de la inervación intestinal más frecuente tras la enfermedad de Hirschsprung (Martucciello et al., 2002), y la podemos encontrar asociada a ella en un 6% de los pacientes HSCR, mientras que un 25% de los pacientes DNI B presentan también HSCR (Meier-Ruge et al., 2006).

A.3.3. Genética molecular de la DNI B

Al contrario de lo que ocurre con HSCR, se conoce muy poco de la genética de DNI B. Aunque sigue habiendo cierta incertidumbre sobre la incidencia real de la enfermedad, actualmente DNI B se considera una entidad clínica independiente, con un claro componente genético, que se deduce a partir de un estudio realizado sobre gemelos monozigóticos afectados y sobre

familias con varios miembros DNI B en distintas generaciones (Ure et al., 1994; Martucciello et al., 1994; Kobayashi et al., 1996a; Costa et al., 2000). Además, la presencia de antecedentes familiares de estreñimiento en una gran proporción de nuestros pacientes (40%) podría estar indicando la presencia de factores genéticos que predispongan a dicha enfermedad (Granero et al., 2007). Sin embargo no se ha podido identificar en humanos ningún gen asociado con esta patología.

El componente genético de la DNI B está además reforzado por los resultados de estudios realizados en 2 modelos animales independientes, cuya existencia permite pensar que podrían existir formas hereditarias de DNI B en humanos. Se ha visto que ratones con mutaciones en el gen *Hox11L1*, muestran una patología del SNE que recuerda al fenotipo DNI B en humanos, con un aumento de la densidad de los ganglios mientéricos e hiperplasia de los submucosos y, en algunos casos, signos de pseudo-obstrucción colónica (Shirasawa et al., 1997; Hatano et al., 1997; Yamataka et al., 2001; Yanai et al., 2004). Dado que la expresión del factor de transcripción que codifica el gen *Hox11L1* se limita a tejidos derivados de la cresta neural, se piensa que este gen podría tener una función importante regulando la proliferación y diferenciación de las células derivadas de la cresta neural y que su expresión es fundamental para la correcta inervación del SNE, al menos en el ratón. Se conoce el homólogo de este gen en humanos, pero hasta el momento no se ha demostrado que esté implicado en DNI B ni en HSCR (Costa et al., 2000), aunque la serie de pacientes utilizada en dichos estudios fue muy reducida y por lo tanto no permite descartar definitivamente su implicación en dichas patologías.

Resulta también curioso el hecho de que modelos de ratas con mutaciones deletéreas de *EDNRB* en heterocigosis, dan lugar a un fenotipo muy parecido a DNI B. Concretamente la mutación *spotting lethal* (sl) es una deleción espontánea de 301pb en el gen *EdnrB*, que en homocigosis da lugar a aganglionosis en ratas, y ha sido usada como modelo de HSCR. Esta misma mutación en heterocigosis genera hiperganglionosis y ganglios gigantes en el plexo submucoso idénticos a los observados en pacientes DNI B (Boyen et al., 2002). Hay que decir que estos animales no mostraban ningún signo de motilidad intestinal alterada. Además, se ha observado una hiperplasia de los ganglios submucosos idéntica a la DNI B, antes de la región agangliónica en ratones deficientes en EDN3 (Sandgren et al., 2002). Por todo ello, la ruta

EDN3/EDNRB implicada en el desarrollo del SNE, es candidata a ser analizada en el contexto de DNI B.

En una primera aproximación a la genética de esta enfermedad Gath et al (Gath et al., 2001) realizaron el rastreo de *RET*, *GDNF*, *EDNRB* y *EDN3* en pacientes con DNI B o DNI B+HSCR, y no encontraron ninguna mutación que pudiera ser responsable del fenotipo observado. No obstante, la sensibilidad de la técnica empleada era baja, y el número de pacientes analizados muy reducido para poder excluir la relación de los genes analizados con DNI B. Además, la ausencia de mutaciones tradicionales no excluye la existencia de variantes que confieran susceptibilidad a la enfermedad, exactamente de la misma forma que ocurre con el haplotipo *RET* de riesgo para HSCR. En cualquier caso, al tratarse de otro desorden del SNE, las rutas metabólicas involucradas en su formación son candidatas a estar relacionadas con la patogénesis de la enfermedad.

B. HIPOTESIS DE TRABAJO Y
OBJETIVOS DEL ESTUDIO

B.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

De acuerdo con un modelo de herencia multifactorial para HSCR, hay evidencias de que la mayoría de los pacientes portan alelos de *RET* que confieren susceptibilidad a la enfermedad con baja penetrancia. Nuestro grupo identificó el haplotipo en *RET* fuertemente asociado a HSCR y dicho estudio, corroborado en otras series de pacientes, constituyó la base para la caracterización del dominio enhancer-like en el intrón 1, donde podría residir la causa molecular que conduce a la aparición del fenotipo en un alto porcentaje de casos esporádicos, especialmente en las formas de segmento corto. Por otra parte, la expresión fenotípica de una enfermedad compleja también depende de los efectos de alelos protectores, que frecuentemente previenen de la enfermedad contrarrestando el efecto de factores de susceptibilidad. Recientemente se ha descrito un locus en 3'UTR de *RET* que parece ejercer un efecto protector frente a HSCR. En el presente trabajo nos hemos planteado el análisis de la distribución de una variante de la región 3'UTR en nuestros pacientes, para profundizar en el conocimiento de la base etiopatogénica de HSCR. El análisis detallado de este *locus*, junto con los datos anteriores del intrón 1 de nuestro grupo, podría constituir un paso definitivo para la estimación del riesgo de recurrencia y para la posibilidad de ofrecer consejo genético a las familias afectas.

El papel fundamental del proto-oncogén *RET* en HSCR convierte a los genes que codifican para sus ligandos en excelentes candidatos para la enfermedad, ya que una mutación en estos genes podría llevar a una alteración en la activación de la cascada de señalización de RET. Así, hemos planteado la ampliación del rastreo mutacional de los genes que codifican para los ligandos de RET en una cohorte mayor de pacientes y la realización de un estudio funcional de las mutaciones encontradas, con el fin de esclarecer la implicación de estos genes en la patogénesis de HSCR. También nos hemos planteado el análisis de los genes *EDNRB*, *EDN3* y *SOX10*, que han sido asociados previamente con HSCR aislado o sindrómico, en nuestra serie de pacientes HSCR, con el fin de determinar el espectro mutacional de estos genes en nuestra serie de pacientes.

Asimismo, dada la naturaleza poligénica de HSCR, hemos pretendido desarrollar una evaluación sistemática de otros genes candidatos por función, con el fin de identificar factores de susceptibilidad asociados a su aparición. En este sentido, conocemos el papel de la ruta de las neurotrofinas en el desarrollo embrionario del SNE, así como su localización diferencial en intestino normal vs

intestino agangliónico y la asociación de mutaciones en *NTF3* a HSCR. Por tanto, nos proponemos evaluar el gen *NTRK3* como candidato para la aparición del fenotipo HSCR. De la misma manera se evaluaron los genes *SEMA3A* y *SEMA3D*, debido a las evidencias del papel que la ruta de señalización dependiente de las semaforinas tiene en el desarrollo del SNE, tanto en la formación de la red neuronal como en la migración de los precursores neurales. Además, estos genes habían resultado asociados a HSCR aislado y esporádico en un estudio de asociación a nivel genómico.

Estudios recientes han puesto de manifiesto la importancia de alteraciones en la dosis génica en el diagnóstico, pronóstico y terapia de numerosas enfermedades. Sin embargo, éste no parece ser el caso de HSCR, con una predominancia de mutaciones puntuales, aunque también existen pequeñas inserciones y deleciones. Una explicación para la ausencia de CNVs asociados a HSCR podría ser que ni las técnicas utilizadas para realizar rastreos mutacionales ni las técnicas citogenéticas son capaces de detectar estas deleciones/duplicaciones de tamaño medio que afectan a un gen o a parte de él. Nuestro grupo realizó un análisis de anomalías de la dosis génica para los genes *RET*, *ZFHX1B*, *EDN3* y *GDNF*, en nuestra serie de pacientes HSCR y no se encontraron CNVs asociados a la enfermedad en ninguno de estos genes. Para determinar si hay alguna relación entre HSCR y alteraciones en la dosis génica nos planteamos realizar el rastreo de CNVs en la región codificante de otros genes que habían sido previamente asociados a esta patología, concretamente de los genes *EDNRB*, *NRTN*, *GFR α 1*, *SOX10* y *PHOX2B*.

Por otra parte, se tienen muy pocos datos sobre las bases moleculares de la DNI B. Dada la clara implicación de *RET* y *EDNRB* en HSCR, y la importancia de las rutas de señalización celular en la que participan estos genes en el desarrollo del SNE, sería plausible que también ejercieran un papel en la aparición de otras alteraciones del SNE, como la DNI B. Por ello, nos hemos planteado evaluar ambos genes y sus ligandos como genes de susceptibilidad para la DNI B, con el fin de esclarecer las causas de esta enfermedad.

B.2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

1. Evaluación de los genes que codifican para los ligandos de *RET*, *GDNF*, *NRTN*, *ARTN* y *PSPN*, como genes de susceptibilidad para HSCR.

1.1. Rastreo mutacional de estos genes en la cohorte de pacientes HSCR.

- 1.2. Estudio funcional de las mutaciones encontradas en nuestros pacientes.
2. Evaluación de la región 3' UTR del gen *RET*, como *locus* de susceptibilidad/protección para HSCR mediante estudios de casos y controles.
3. Análisis molecular y funcional de los genes *EDNRB*, *EDN3* y *SOX10*, previamente descritos como asociados a HSCR, en nuestra serie de pacientes.
 - 3.1. Rastreo mutacional de estos genes en nuestra serie de pacientes HSCR.
 - 3.2. Evaluación de los polimorfismos identificados y de los haplotipos constituidos por sus combinaciones, como factores de susceptibilidad para HSCR mediante estudios de casos y controles y TDT.
 - 3.3. Estudio funcional de las mutaciones encontradas en nuestros pacientes.
4. Evaluación de nuevos genes candidatos por función (*NTRK3*, *SEMA3A* y *SEMA3D*) como genes de susceptibilidad para HSCR.
 - 4.1. Rastreo mutacional de los genes candidatos en la serie completa de pacientes HSCR.
 - 4.2. Evaluación de los polimorfismos identificados y de los haplotipos constituidos por sus combinaciones, como factores de susceptibilidad para HSCR mediante estudios de casos y controles y TDT.
5. Rastreo de anomalías en la dosis génica de los genes *EDNRB*, *NRTN*, *GFR α 1*, *SOX10* y *PHOX2B* en nuestra serie de pacientes HSCR
6. Evaluación de genes implicados en la cascada metabólica de RET (*RET*, *GDNF*, *ARTN*, *NRTN* y *PSPN*) y EDNRB (*EDNRB* y *EDN3*) como genes de susceptibilidad para DNI.
 - 6.1. Rastreo mutacional de *RET* y sus ligandos en la serie completa de pacientes DNI.
 - 6.2. Rastreo mutacional de *EDNRB* y *EDN3* en la serie completa de pacientes DNI.
 - 6.3. Evaluación de las variantes y haplotipos de *RET*, *EDNRB* y *EDN3* como factores de susceptibilidad para DNI.

C. MATERIALES Y MÉTODOS

C.1. Pacientes y Controles

Todos los individuos que han participado en nuestros estudios han autorizado su inclusión mediante consentimiento informado. Dichos consentimientos siguen las normas de protección de los sujetos humanos contenidas en la declaración de Helsinki, así como lo estipulado en el Título I, Artículo 12, del real Decreto 561/1993 de 16 de abril, y han sido aprobados por el Comité de Ética e Investigación Clínica de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío de Sevilla.

C.1.1. Pacientes con la enfermedad de Hirschsprung

Los pacientes HSCR incluidos en el presente trabajo han sido remitidos a la Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal procedentes de la Unidad de Gestión Clínica de Cirugía Infantil de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, centro de referencia autonómico para esta patología, y de Servicios de Genética de otros hospitales españoles. El protocolo utilizado para el estudio clínico de los pacientes HSCR incluye:

- Historia clínica.
- Estudio radiológico mediante enema opaco.
- Manometría anorrectal.
- Biopsia rectal por succión a 35 y 7cm para estudio anatomopatológico.
- Estudios de genética clínica mediante la realización del árbol genealógico, valoración de la transmisión familiar, clasificación de los sujetos en riesgo, análisis de la heterogeneidad clínica intra y extrafamiliar y extracción protocolizada de muestras de sangre del paciente índice y de sus familiares para el estudio molecular.

Hasta la finalización de los distintos estudios incluidos en el presente trabajo, hemos obtenido muestra de DNA genómico de un total de 220 pacientes HSCR (49 mujeres y 171 hombres). De estos pacientes, 193 son esporádicos y los 27 restantes son casos familiares incluidos en 15 familias. La tasa de casos familiares registrados en nuestra cohorte es de un 12% (27/220) y disponemos de DNA de 64 familiares en primer grado (padres y hermanos) de dichas familias. Asimismo, hemos completado la triada (paciente, padre y madre) en 178 de los 193 pacientes esporádicos, mientras que para otros 14 casos sólo se dispone de uno de los padres, y sólo en el caso restante no hemos podido acceder a ninguno de ellos.

Para definir el fenotipo HSCR de nuestros pacientes hemos utilizado el criterio propuesto por Chakravarti y Lyonnet, 2002. Según estos criterios, en nuestra cohorte de pacientes, 126 pacientes han sido catalogados como S-HSCR (80%), 20 como L-HSCR (13%), y 11 casos presentaron ATC (7%). Los pacientes que presentaron aganglionosis hasta el colon descendente se han incluido dentro del grupo de pacientes S-HSCR. No disponemos de la longitud del segmento agangliónico en los 63 casos restantes. En nuestra cohorte de pacientes se han encontrado otros fenotipos asociados a la presencia de HSCR. De esta manera 30 de nuestros pacientes presentaban Displasia Neuronal Intestinal tipo B (DNI B) asociado a HSCR y otros 20 Síndrome de Down. Uno de nuestros pacientes presentaba WS4.

C.1.2. Pacientes con Displasia neuronal intestinal B

Los pacientes DNI B incluidos en el presente trabajo han sido remitidos a la Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal procedentes de la Unidad de Gestión Clínica de Cirugía Infantil de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, centro de referencia autonómico para esta patología. DNI B fue diagnosticado histológicamente aplicando los criterios revisados por Meier-Ruge et al. en 2006 (Meier-Ruge et al., 2006). El protocolo utilizado para el estudio clínico de los pacientes DNI B, es el mismo que en el caso de HSCR. En base a estos criterios, el diagnóstico se estableció en pacientes mayores de un año, evaluando, al menos, 25 ganglios submucosos al azar. Para considerar un ganglio gigante ha de contener más de 8 células nerviosas en sección transversal (Meier-Ruge et al., 2006). Un paciente se consideró DNI B cuando al menos un 20% de los ganglios colónicos submucosos analizados fueron catalogados como gigantes. Estos criterios diagnósticos se aplicaron de la misma manera a los pacientes que presentaron DNI B asociado al fenotipo HSCR.

En el presente estudio hemos incluido un total de 23 pacientes DNI B además de los 30 pacientes con fenotipo HSCR+DNI B anteriormente indicados. Hay que resaltar que uno de los pacientes de la serie tenía un gemelo monozigótico también afecto de DNI B. Para el resto de los casos la enfermedad se presentó de manera esporádica en la familia. Se pudieron completar las triadas de paciente y ambos padres en todos los casos menos en uno.

C.1.3. Individuos control

El grupo control usado en el presente trabajo estaba constituido por 200 individuos sanos no relacionados, sin antecedentes personales o familiares de enfermedad genética, ni de alteraciones entéricas o neurocristopatías. Este grupo de controles se empleó en la evaluación de polimorfismos genéticos como factores de susceptibilidad para una determinada patología, ya que es preciso comparar la frecuencia y distribución de dichas variantes en el grupo de pacientes con las de un grupo control. También se utilizó este grupo control para comprobar si una nueva variante encontrada mediante el rastreo de la secuencia codificante de un gen era una mutación o un polimorfismo común.

C.2.Métodos

C.2.1. Técnicas generales utilizadas para estudios de Ácidos nucleicos

C.2.1.1. Extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica

El ácido desoxirribonucleico (DNA) se encuentra en el núcleo de las células de los organismos eucariotas y en el citoplasma de procariontes. El DNA genómico se obtuvo a partir de una muestra de sangre periférica de los pacientes, sus familiares y controles.

Procedimiento de extracción de DNA a partir de muestras de sangre periférica:

1) Lisis de eritrocitos

- Lavar aproximadamente 15mL de sangre total con suero fisiológico. Para ello se utilizan tubos Nunc de 50mL de polipropileno estériles. Centrifugar 5-10 minutos a 2000-2500 rpm y 4°C.

Materiales y métodos

- Desechar el sobrenadante dejando la capa celular. Añadir tampón de lisis de eritrocitos (Tris-pH=7,5 20mM; MgCl₂ 5mM) hasta alcanzar un volumen de 50mL y agitar suavemente hasta alcanzar la total disolución de la mezcla. Centrifugar 15 minutos a 3500 rpm y 4°C.

- Decantar el tubo con cuidado y añadir nuevamente tampón de lisis de eritrocitos hasta un volumen final de 50mL. Centrifugar 15 minutos a 3500 rpm y 4°C.

- Desechar el sobrenadante.

2) Digestión de proteínas

- Añadir 3mL de tampón de lisis de leucocitos (WCLB, NaCl 400mM; EDTA pH=8 2mM; Tris pH=7,5 10mM), 200µL SDS 10% y 500µL solución de proteinasa K (Proteinasa K 2mg/mL; SDS 1%; EDTA pH=8 2mM). Agitar con vórtex hasta observar un aspecto homogéneo. Incubar a 37°C y agitación durante una noche.

3) Extracción de DNA

- Añadir 1mL de NaCl 5,5M. Agitar durante 15 segundos en vórtex y centrifugar 15 minutos a 3500 rpm y 4°C.

- Con el objeto de eliminar el exceso de sales, traspasar el sobrenadante a otro tubo Nunc y centrifugar 15 minutos a 3500 rpm y 4°C.

- Añadir v/v de cloroformo (Merck). Agitar manualmente durante 15 segundos y centrifugar 15-20 minutos a 3500 rpm y 4°C. Traspasar la fase superior a otro tubo cuidadosamente.

- Añadir 2 v/v de etanol absoluto (Merck) y agitar suavemente hasta observar la medusa de DNA.

- Recuperar el DNA y lavarlo con etanol al 70% a -20°C. Posteriormente, pasarlo a un criotubo Nunc con 0,5-1mL (según el tamaño de la medusa obtenida) de Tris 10mM/EDTA 0,2mM e incubar unas horas a 37°C en agitación para que se disuelva completamente. Conservar a -80°C.

C.2.1.2. Espectofotometría de Ácidos nucleicos

Para conocer la concentración y pureza de las muestras de DNA o RNA, se determinó la absorbancia (densidad óptica, DO) de las mismas a distintas

longitudes de onda mediante el espectrofotómetro SmartSpec™ 3000 (BIO-RAD). Según la ley de Lambert-Beer ($DO = \alpha lc$), conociendo el coeficiente de absorción (α) del DNA o RNA, y la distancia (l) que la luz atraviesa por una solución de dicha molécula, podremos deducir la concentración (c) a partir de la DO.

Para ello, se preparó una dilución 1:20 de la muestra y se midió la absorbancia a 260nm y 280nm (ambas longitudes de ondas del espectro del ultravioleta). La DO 280nm equivale a las proteínas. Para estimar la pureza de la solución de Ácidos nucleicos se utiliza el cociente DO260/DO280. Cuando la extracción ha sido adecuada este valor oscila entre 1,6 y 2.

El coeficiente de absorción del DNA de doble cadena a 260nm es 0,02mL/ μ g y la del RNA es de 0,025 mL/ μ g. Para conocer la cantidad de DNA o RNA (μ g/mL) de la muestra se multiplica la DO260nm por 20 (factor de dilución) y por 50 ó 40 (el inverso del coeficiente de absorción del DNA de doble cadena o del RNA a 260nm respectivamente) y se divide por 1 (distancia en centímetros que atraviesa la luz por la solución).

C.2.1.3. Amplificación de DNA mediante PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) nos permite sintetizar *in vitro* grandes cantidades de un fragmento específico de DNA. Las aplicaciones de la PCR han crecido de forma exponencial, de manera que hoy en día, la gran mayoría de las técnicas que se realizan en un laboratorio de genética molecular están basadas en la PCR.

Para llevar a cabo la amplificación de un fragmento específico de DNA es necesario conocer las secuencias flanqueantes a la región de interés, las cuales nos van a aportar la información necesaria para el diseño de los cebadores. Dichos cebadores son secuencias cortas de DNA de unas 15 a 30 bases complementarias a cada una de las cadenas de DNA de la región que se quiere amplificar. Para la amplificación también son necesarios los desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) que actúan como precursores del DNA, así como la enzima DNA polimerasa y el molde de DNA que se pretende amplificar.

La PCR consiste en la repetición cíclica de tres etapas:

- Desnaturalización: esta fase se realiza a 95°C y en ella tiene lugar la separación de la doble cadena de DNA.

- Hibridación: fase en la que los cebadores se unen específicamente a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases. La temperatura de hibridación es específica de cada fragmento y de los cebadores empleados, en función de la longitud y composición de bases de éstos.

- Extensión: esta fase se realiza a 72°C y en ella la enzima DNA polimerasa incorpora los desoxinucleótidos disponibles en la solución y extiende la hebra que se está sintetizando. La enzima DNA polimerasa más utilizada actualmente es termoestable y procede de la bacteria *Thermus aquaticus*.

Después de cada ciclo se obtiene como resultado la duplicación de la secuencia de DNA diana. Dado que las nuevas copias también sirven como moldes en los siguientes ciclos, la cantidad de DNA generado se incrementa de forma exponencial. De este modo, al final de n ciclos el número de copias de DNA por cada molécula será de 2^n . Los fragmentos amplificados se detectan fácilmente mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio. El bromuro de etidio es una sustancia fluorescente que se intercala entre pares de bases adyacentes del DNA, posibilitando su visualización cuando se ilumina con luz UV. La tecnología de la PCR no se reduce a un único dictado de instrucciones que trabaja en cualquier situación (Innis et al., 1990), por lo que es necesario ajustar algunos parámetros del proceso para cada fragmento. A continuación realizaremos una descripción de las condiciones experimentales de la PCR *tipo* utilizada en este trabajo. Sobre estas condiciones se realizaron modificaciones específicas, que se detallaran posteriormente, para cada una de las reacciones puestas a punto.

Protocolo de amplificación mediante PCR

1) Reactivos utilizados en la PCR (volumen final 25µL)

DNA molde (DNA genómico*)	0,4ng/µL
Solución de desoxinucleotidos trifosfato (Roche Diagnostics)	0,2mM (cada uno)
Tampón de PCR 10x (Tampón comercial Roche Diagnostics)	1X
Solución de Cloruro Magnésico 25mM (Roche Diagnostics)	1,5mM
Cebadores**	0,5µM (cada uno)
Taq DNA polimerasa (Roche Diagnostics)	0,5U
H ₂ O csp	25µL

*25ng de DNA genómico humano, equivalen a 7500 copias de cualquier segmento monocopia (Innis et al., 1990). **Los cebadores fueron suministrados por Operon y Sigma-Aldrich, y diseñados usando el programa informático Primer 3 Out put (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

2) Condiciones de amplificación

Las condiciones de amplificación de cada uno de los fragmentos de PCR en el presente trabajo varían y se indicarán específicamente en cada apartado, utilizando una modificación de la fórmula $(D_i) \rightarrow [(T_{aD} - T_{iD}) \rightarrow (T_{aH} - T_{iH}) \rightarrow (T_{aE} - T_{iE})] \times N \rightarrow (E_f)$, publicada por nuestro grupo (Ruiz et al., 1997):

D_i : Ciclo de desnaturalización inicial.

T_{aD} : Temperatura de Desnaturalización.

T_{iD} : Tiempo de Desnaturalización.

T_{aH} : Temperatura de Hibridación.

T_{iH} : Tiempo de Hibridación.

T_{aE} : Temperatura de Extensión.

T_{iE} : Tiempo de Extensión.

N : Número de ciclos.

E_f : Ciclo de Extensión final de la PCR.

En el presente trabajo se utilizaron los termocicladores PTC-100™ (MJ Research) y Biometra® TGRADIENT (Whatman Biometra).

C.2.1.4. Rastreo de mutaciones mediante dHPLC

La técnica empleada para el rastreo de mutaciones puntuales de la secuencia codificante de los distintos genes es la cromatografía líquida de alta presión en condiciones desnaturalizantes (*denaturing high-pressure liquid chromatography*, dHPLC). Este método, basado en la formación de heterodúplexes, es muy sensible y permite la detección de sustituciones de un único nucleótido, así como pequeñas inserciones y deleciones, con un 100% de eficiencia (Oefner et al., 1999; Marsh et al., 2001).

Para llevar a cabo esta técnica es necesaria la amplificación por PCR de los fragmentos que se quieren analizar. Posteriormente, los productos de PCR se someten a un proceso de desnaturalización a 95°C, seguido de un descenso gradual de la temperatura hasta 65°C durante 30 minutos. En la renaturalización se

favorece la formación del heterodúplex si existe alguna variación de secuencia entre los dos alelos del fragmento presentes en la muestra.

El análisis en nuestro laboratorio se realiza en el sistema WAVE DNA Fragment Analysis (Transgenomic) utilizando una columna de separación de DNA DNASep® (Transgenomic). 5µL de cada muestra se inyectan en la columna con una tasa de flujo de fase móvil de 0,9 mL/min y bajo condiciones de temperatura que permiten la desnaturalización parcial del DNA, esta temperatura es específica del fragmento. La fase móvil consiste en una mezcla de acetato de trietilamonio (TEAA) 1M (Tampón A) y TEAA 1M con 25% de acetonitrilo (ACN) (Tampón B). En solución, el TEAA forma el ión de trietilamonio cargado positivamente (TEA+) y contiene terminaciones tanto hidrofóbicas como hidrofílicas. La porción cargada positivamente de TEA+ se asocia con los grupos fosfatos cargados negativamente de la molécula de DNA creando una capa hidrofóbica en el fragmento que hace que se una a las partículas también hidrofóbicas (Poliestireno divinilbenzeno) que contiene la columna en su interior. La concentración de ACN aumenta con el tiempo haciendo que disminuya la capacidad de unión del TEA+ y el DNA se libere de las partículas de la columna. Los fragmentos con bases desapareadas salen primero de la columna, ya que su unión a la fase estacionaria es más débil, seguidos por los completamente apareados que se unen más fuertemente a dicha fase. Por tanto, la resolución de la muestra va a depender de la temperatura óptima del horno y del gradiente de ACN, que determina el programa WAVEMAKER (Transgenomic) en función del tamaño y el contenido GC del fragmento. Éstos pasan a continuación por un detector UV que detecta la absorbancia con respecto al tiempo, y el resultado se representa en forma de cromatograma. Si no existe ninguna variante de secuencia en la muestra, todos los fragmentos de DNA se encuentran completamente apareados y salen de la columna al mismo tiempo, apareciendo un solo pico en el cromatograma. Si existe alguna mutación o variante de secuencia, aparecen entre dos y cuatro picos.

C.2.1.5. Secuenciación automática de los productos de PCR

La secuenciación de DNA a partir de productos obtenidos mediante PCR, se lleva a cabo como método de rastreo y caracterización de mutaciones. La secuenciación se realizó en el secuenciador ABI Prism®3730 (Applied Biosystems) de 48 capilares. El proceso de secuenciación comienza con la amplificación por PCR del fragmento de DNA que queremos analizar. Posteriormente, se procedió a la

purificación del producto mediante electroforesis de la muestra en un gel de agarosa al 2%, excisión del fragmento de DNA amplificado correspondiente al tamaño deseado, y purificación de este utilizando el kit Qiaquick gel extraction (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Alternativamente se utilizó ExoSAP-IT (USB Corporation), otro sistema de purificación que consiste en la eliminación enzimática de los cebadores y dNTPs no consumidos en la reacción de PCR. Para ello, se utilizan dos enzimas hidrolíticas: la Exonucleasa I, que degrada los cebadores y otros DNAs de cadena simple no específicos producido durante la PCR, y una fosfatasa alcalina que hidroliza los residuos de dNTPs. ExoSAP-IT se añade directamente al producto de PCR, por lo que no es necesario electroforesis en geles de agarosa, se incuba a 37°C durante 15 minutos y se desactivan las enzimas a 80°C.

Una vez obtenido el producto purificado se lleva a cabo la reacción de secuenciación en el termociclador PTC-100™ (MJ Research). Esta reacción está basada en el método bioquímico de Sanger utilizando dideoxinucleótidos marcados con fluorescencia como terminadores de la reacción de elongación de la cadena complementaria. Cada uno de los dideoxinucleótidos (ddATP, ddCTP, ddTTP y ddGTP) está marcado con un fluorocromo distinto y su unión a la cadena en formación detiene la elongación de la misma. En la mezcla de reacción también encontraremos deoxinucleótidos no marcados para la elongación de dicha cadena, así tendremos dideoxinucleótidos en todas las posibles posiciones de la secuencia. Para esta aplicación se utilizó el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). El programa de secuenciación es: (95°-5')->[(95°-30'')->(55°-10'')->(60°-4')]x30. Posteriormente, procedemos a la purificación de los productos de secuenciación mediante el empleo de las placas AutoSeq96 que contienen Sephadex G-50 prehidratado (Amersham Biosciences). Las muestras una vez purificadas, se inyectan en el secuenciador. Las condiciones de inyección son: voltaje 1,2 KV durante 15 segundos. La electroforesis se realiza dentro de cada uno de los capilares rellenos del polímero POP-7™ Performance Optimized Polymer (Applied Biosystems), bajo las siguientes condiciones de voltaje y tiempo: 15 KV y 40 minutos, aunque el tiempo de la carrera puede variar en función del tamaño de los productos. El tampón de electroforesis utilizado fue 10X Buffer con EDTA (Applied Biosystems).

La lectura e interpretación de la secuencia se realiza utilizando el programa Sequencing Analysis v5.2 (Applied Biosystems). Para llevar a cabo el alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas y compararlas con la secuencia de referencia disponemos del programa SeqScape® v2.5 (Applied Biosystems).

C.2.1.6. Estudios de expresión por RT-PCR

La PCR en transcripción reversa (*Reverse transcription PCR*, RT-PCR) es una variante de la PCR en la que se utiliza como molde una molécula de RNA. En el presente trabajo se obtuvieron las muestras de RNA a partir de linfocitos de sangre periférica utilizando el kit QIAamp® RNA Blood Mini Kit (Quiagen), a partir de 2mL de sangre, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La cantidad y calidad del RNA purificado se cuantificó a partir de su absorbancia en el espectrofotómetro y mediante visualización de la muestra en gel de agarosa 1% tras su migración electroforética y tinción con bromuro de etidio. Consideramos que la extracción había sido satisfactoria si la concentración del RNA purificado estuvo entre 50-200 ng/ μ L y tras la electroforesis se pudo observar el mRNA como un *smear*, o mancha homogénea, entre las bandas correspondientes al rRNA-28S (5,3Kb) y rRNA-18S (2Kb). Además no se debieron ver contaminaciones de DNA genómico tras la electroforesis.

Mediante un proceso de retrotranscripción se pasa del RNA al DNA complementario (cDNA), usando una enzima llamada transcriptasa reversa. El cDNA resultante será posteriormente amplificado mediante una reacción de PCR tradicional. La retrotranscripción se realizó a partir de 3 μ g de RNA utilizando el kit SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invotrogen). Para llevar a cabo la reacción empleamos un termociclador Biometra® TGRADIENT (Whatman Biometra) y el protocolo de procesamiento fue el siguiente:

- Incubar durante 5 minutos a 65°C el RNA molde, junto con la mezcla de dNTPs (1mM) y los Oligo-dTs (0,5 μ g), diluidos en agua DEPC hasta un volumen final de 10 μ L. Tras la incubación mantener la dilución en frío durante al menos 1 minuto.
- Añadir 9 μ L de la mezcla de reacción a la dilución anterior e incubar durante 2 minutos a 42°C. Mezcla de reacción: RT buffer (1X), MgCl₂ (11mM), DTT (22mM), RNase OUT™ (10U).
- Añadir 1 μ L de enzima SuperScript™ II RT, mezclar e incubar 50 minutos a 42°C. Pasado este tiempo incubar a 70°C durante 15 minutos y enfriar.
- Añadir 1 μ L de RNasa H e incubar a 37°C durante 20 minutos.

Como control negativo y positivo, respectivamente, se realizaron dos reacciones en paralelo, una de ellas sin añadir la enzima y la otra usando como molde RNA control (Invitrogen). Para la amplificación tomaremos 2 μ L del resultado de la retrotranscripción y procederemos con la PCR tal y como se explica en el apartado C.2.1.3.

El resultado de la PCR se visualizará en un gel de agarosa, tras la migración electroforética del DNA y tinción con bromuro de etidio.

C.2.1.7. Genotipación por Taqman

La tecnología TaqMan permite la rápida genotipación de cambios de secuencia en un gran número de pacientes. El proceso de genotipación consta de una reacción de PCR que se realiza en el sistema 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), y a la que se añaden dos sondas Taqman[®] MGB (Applied Biosystems) complementarias a la región donde se localiza la variación de secuencia que queremos estudiar, cada una a un alelo. El programa general de amplificación utilizado fue: (95^o-10')->[(92^o-15'')->(60^o-1')]x 40. Esta PCR se realizó a volumen final 10 μ L, con 15ng de DNA genómico y utilizando el kit comercial TaqMan 2x Genotyping PCR Master Mix (Applied Biosystems), según las recomendaciones del fabricante. Los cebadores y sondas fueron diseñados y suministrados por Applied Biosystems. Las dos sondas poseen en su extremo 5' una molécula fluorescente llamada *reporter*, distinta entre sí para diferenciar la amplificación de los dos alelos (FAM ó VIC), y una molécula no fluorescente en su extremo 3' denominada *quencher*. Las sondas Taqman MGB de nueva generación además incorporan una molécula llamada MGB (*minor groove binder*) unida al extremo 3' junto al *quencher*, que se encaja en el surco menor del DNA de doble cadena incrementando la estabilidad y especificidad de hibridación de la sonda.

Cuando la sonda está íntegra, la proximidad del *reporter* y del *quencher* provoca un fenómeno denominado FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*, transferencia de energía mediante resonancia fluorescente) en el que el *quencher* capta la fluorescencia emitida por el *reporter* y se traduce en la anulación de la fluorescencia de la sonda (Didenko et al., 2001). En el curso de la PCR, cada sonda se une específicamente a su secuencia complementaria y durante la extensión de la cadena, la actividad 5' exonucleasa de la polimerasa AmpliTaq Gold DNA (Applied Biosystems) permite eliminar nucleótidos desde el extremo 5' de una cadena de

ácido nucleico, provoca la liberación del *reporter* de la sonda que ha hibridado, con la consiguiente emisión de fluorescencia. Los desapareamientos de base entre la sonda y la secuencia alélica reducen la eficiencia de la sonda para hibridar y la polimerasa tiende a desplazar la sonda de su unión a la cadena de DNA, en lugar de cortarla. La rotura de la sonda hace que se separen *reporter* y *quencher*, aumentando la fluorescencia emitida por el *reporter*, a diferencia de lo que ocurre con el desplazamiento de la sonda. De esta manera, la fluorescencia generada en la PCR indica qué alelos están presentes en la muestra. Esta fluorescencia es captada por el sistema óptico del equipo y los genotipos se analizan con el programa 7500 Fast Real-Time PCR System Sequence Detection Software version 1.3 (Applied Biosystems).

C.2.1.8. Detección de grandes deleciones por QMF-PCR

La PCR cuantitativa múltiple fluorescente (*Quantitative Multiplex Fluorescent PCR*, QMF-PCR) es una técnica que nos permite amplificar de manera simultánea varios fragmentos a partir de DNA genómico y cuantificar el producto de dicha amplificación. El fundamento de esta técnica es el mismo que el de la PCR convencional con la salvedad de que uno de los cebadores utilizados para la ampliación de cada fragmento está marcado con el fluorocromo FAM.

La amplificación se llevó a cabo de manera simultánea a un volumen final de 25 μ L, usando el QIAGEN[®] Multiplex PCR Kit (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante, y usando como molde 75ng de DNA genómico y un 6% de DMSO en la reacción. El programa general para la amplificación de los fragmentos fue: (95^o-15')->[(95^o-30'')->(55^o-30'')->(72^o-45'')]x22, con la particularidad de que el tiempo de extensión se aumenta en 3 segundos cada ciclo. Tras la amplificación se mezclaron 3 μ L de PCR con el marcador de tamaño GeneScan[™]-500LIZ[™] Size Standard (Applied Biosystems), en una proporción 100:5, y formamida Hi-Di[™] (Applied Biosystems) hasta alcanzar un volumen final de 10 μ L. Tras la desnaturalización de las muestras a 95^o durante 5 minutos, se inyectaron en el secuenciador de DNA automático ABI Prism[®]3730 (Applied Biosystems). Las condiciones de inyección fueron: voltaje 1,2KV durante 23 segundos. La electroforesis se llevó a cabo en polímero POP-7[™] Performance Optimized Polymer (Applied Biosystems), bajo un voltaje de 15 KV durante 40 minutos, y el tampón de electroforesis utilizado fue 10X Buffer con EDTA (Applied Biosystems).

Para el análisis de los distintos fragmentos amplificados y la normalización en base a la altura del pico de amplificación detectada se empleó el programa GeneMarker v1.51. (Softgenetics L.L.C.). La cuantificación del producto de PCR se hizo de manera relativa comparando la altura de los picos de amplificación normalizados entre pacientes y controles. Se consideró la dosis génica normal diploide entre 0,70 y 1,30. Los resultados fuera de este rango tuvieron que ser replicados en 3 experimentos independientes para ser considerados validos.

C.2.1.9. Detección de grandes deleciones por MLPA

La amplificación múltiple dependiente de ligación de sondas (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*, MLPA) nos permite la detección de pérdida o ganancia de material genético para genes específicos en un individuo. Se basa en la hibridación de sondas por especificidad de secuencia al DNA genómico, su ligación y posterior amplificación por PCR semicuantitativa de las sondas ligadas.

En la primera fase se lleva a cabo la hibridación del DNA genómico, previamente desnaturalizado, con un juego de sondas, cada una de las cuales consta de dos partes. Una mitad, el oligo de la derecha (*Right probe oligo*, RPO), contiene una secuencia específica de la región de interés (20-30 nucleótidos) flanqueada en su extremo 5' por una secuencia correspondiente a un cebador universal y está fosforilada en el extremo 3' para permitir su ligación. La otra mitad también contiene en un extremo una secuencia específica de la región de interés inmediatamente adyacente a la anterior y en el extremo 3' una secuencia correspondiente a un cebador universal, entre ambas existe un fragmento inespecífico, llamado secuencia espaciadora, de longitud variable que genera en las sondas la diferencia de tamaños necesaria para su separación en electroforesis capilar. Una vez que los oligos se han hibridado a su diana, se unirán mediante el uso de una ligasa termoestable, generando una sonda continua flanqueada por sitios de unión a cebadores universales que serán usados para su amplificación por PCR tradicional. Sólo se amplificarán exponencialmente aquellas sondas que hayan sido previamente ligadas. Uno de estos cebadores está marcado con un fluorocromo para su detección tras la electroforesis capilar (Figura C.1). La cantidad de sonda producida será proporcional al número de copias de la secuencia diana antes de la amplificación. Comparando los resultados del paciente con los de un individuo control podremos determinar si hay pérdida o ganancia de la secuencia diana en el paciente.

Los reactivos utilizados fueron suministrados por MRC-Holland, SALSA[®] reagents for MLPA[®] reactions EK1 MLPA reagents (MRC-Hollans). Utilizamos en termociclador Biometra[®] TGRADIENT (Whatman Biometra) y el protocolo de procesamiento fue el siguiente:

- Desnaturalización del DNA. Diluir las muestras de DNA genómico con 1 μ L de DNA (100 ng) en agua a un volumen final de 5 μ L. Calentar 5 minutos a 98 $^{\circ}$, enfriar a 25 $^{\circ}$ C.
- Hibridación de las sondas. Agregar 1,5 μ L de Probe mix + 1,5 μ L de Buffer MLPA. Incubar 1 minuto a 95 $^{\circ}$ C, e hibridar a 60 $^{\circ}$ C entre 12 y 24 horas.
- Ligación. Preparación de la mezcla de ligación: 3 μ L de buffer A-ligase-65, 3 μ L de buffer B-ligase, 25 μ L de agua y 1 μ L de ligase-65 por muestra. Reducir la temperatura del termociclador a 54 $^{\circ}$ C. Agregar 32 μ L de la mezcla de ligación. Incubar 15 minutos a 54 $^{\circ}$ C, calentar 5 minutos a 98 $^{\circ}$ C.
- Reacción de PCR. Preparación de la mezcla de PCR: 2 μ L de PCR-primers, 2 μ L de buffer Enzyme dilution, 5,5 μ L de agua y 0,5 μ L de polymerase por muestra. Agregar 10 μ L del mix de PCR a la reacción de ligación anterior. Condiciones de amplificación: [(95 $^{\circ}$ C-30''; 60 $^{\circ}$ C-30''; 72 $^{\circ}$ C-60'')x33]->72 $^{\circ}$ C-20'->4 $^{\circ}$ C- ∞

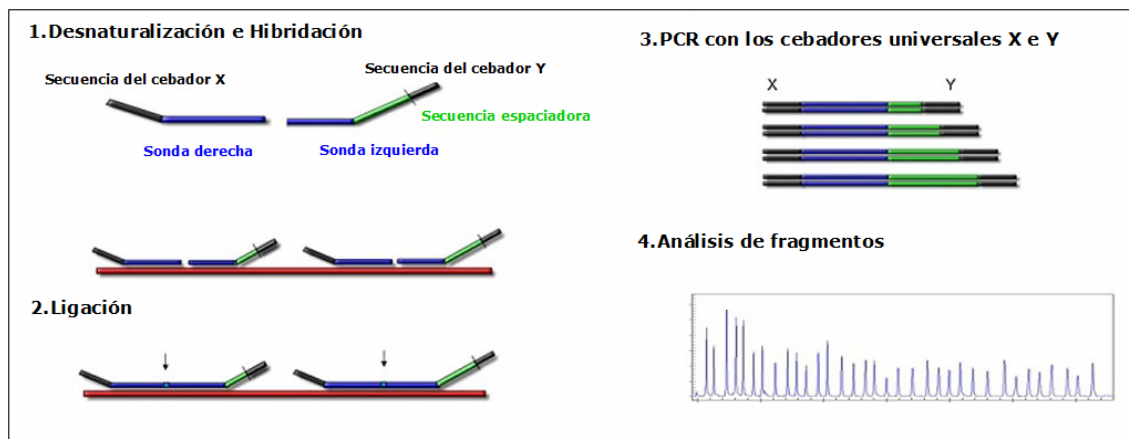


Figura C.1. Esquema del proceso de MLPA.

Tras la amplificación se mezcla en paralelo 1 μ L y 0,5 μ L de la PCR, con el marcador de tamaño GeneScan[™]-500LIZ[™] Size Standard (Applied Biosystems), en una proporción 100:5, y formamida Hi-Di[™] (Applied Biosystems) hasta alcanzar un volumen final de 10 μ L. Tras la desnaturalización de las muestras a 95 $^{\circ}$ durante 5 minutos, se inyectan en el secuenciador de DNA automático ABI Prism[®]3730

(Applied Biosystems). Las condiciones de inyección fueron: voltaje de 1,2KV durante 23 segundos. La electroforesis se llevó a cabo en polímero POP-7™ Performance Optimized Polymer (Applied Biosystems), bajo un voltaje de 15 KV durante 40 minutos, y el tampón de electroforesis utilizado fue 10X Buffer con EDTA (Applied Biosystems).

Para el análisis de los datos se utilizó el programa GeneMarker v1.75. (Softgenetics LLC). Se normalizaron las muestras en función de la altura de los picos y se compararon los resultados de los pacientes con individuos control. Se consideró la dosis génica normal diploide entre 0,75 y 1,30. Los resultados fuera de este rango tuvieron que ser replicados en 3 experimentos independientes para ser considerados validos.

C.2.1.10. Tratamiento estadístico de los datos. Estudios de casos y controles

Aplicación de la ley de Hardy-Weinberg

Para cada una de las variantes analizadas se calculó la frecuencia alélica y genotípica en los distintos grupos de estudio. El modelo de Hardy-Weinberg se utiliza para calcular las frecuencias genotípicas esperables a partir de las frecuencias alélicas observadas. En efecto, si consideramos en una población la pareja alélica A_1 y A_2 de un locus dado, se verifica que

$0 \leq p \leq 1$ y $0 \leq q \leq 1$; donde p es la frecuencia del alelo A_1 y q la frecuencia del alelo A_2

$$p + q = 1$$

Entonces se cumple que $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$, donde:

$$p^2 = \text{frecuencia del genotipo } A_1 A_1$$

$$2pq = \text{frecuencia del genotipo } A_1 A_2$$

$$q^2 = \text{frecuencia del genotipo } A_2 A_2$$

El equilibrio de Hardy-Weinberg es un modelo teórico para genética de poblaciones, en el que el concepto de equilibrio se basa en las siguientes hipótesis:

1. La población es panmíctica (todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse y el apareamiento es al azar).
2. La población es suficientemente grande.
3. La población no está sometida a migración, mutación o selección (no hay pérdida ni ganancia de alelos).
4. Las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación.

Para verificar el cumplimiento de la ley de Hardy-Weinberg en cada uno de los grupos de estudio y para cada una de las variantes estudiadas, utilizamos el test de χ^2 de Pearson comparando los valores de frecuencias genotípicas esperables frente a los valores observados. Si el valor de χ^2 fuese significativo no se cumpliría el equilibrio de Hardy-Weinberg, lo cuál sería indicativo de consanguinidad, selección, evento mutacional, u otro fenómeno que estuviera alterando el equilibrio.

Estudios de casos y controles. Test de χ^2 y test de Fisher

Con el fin de evaluar la posible asociación de una determinada variante de secuencia o de un haplotipo concreto a las enfermedades estudiadas, se utilizaron estudios de casos y controles. En este tipo de estudios, las asociaciones entre enfermedades y marcadores se hallan comparando las frecuencias de un alelo particular de un marcador en una serie de pacientes con las de un grupo de controles sanos. Hemos utilizado el test estadístico χ^2 de Pearson o el test de Fisher con dos colas, para detectar diferencias en las distribuciones de los polimorfismos o de los haplotipos generados a partir de éstos, entre los dos grupos de estudio. Para la aplicación de estos tests estadísticos hemos utilizado el paquete informático SPSS versión 15.0. para Windows.

El test de χ^2 es una prueba estadística diseñada por Carl Pearson que asume la hipótesis nula de no relación entre 2 variables cualitativas. Por ejemplo: Enfermedad (Sí y No) y Factor de Riesgo (Sí y No). La aplicación de la fórmula correspondiente a su cálculo da lugar a un "valor del estadístico p". Este valor indica la probabilidad de equivocarse si se acepta que las dos variables analizadas están realmente asociadas. Dicho de otra manera, la probabilidad de que las dos variables analizadas tengan una asociación real (no debida al azar) es de 1-p. El valor de p que consideramos límite para afirmar que dos variables están asociadas fue de $p < 0,05$. En el caso de análisis múltiples o análisis multivariantes, se bajó el

valor de significación para cada comparación con el fin de mantener en $\alpha=0,05$ la significación conjunta de todas las comparaciones realizadas, siendo α el error estadístico tipo 1, es decir, el error que se comete cuando rechazamos la hipótesis nula siendo ésta verdadera.

El test de Fisher con dos colas tiene un fundamento similar al anterior, aunque utiliza una aproximación matemática distinta y más compleja. Lo hemos empleado como alternativa al test χ^2 de Pearson cuando la frecuencia de las variantes estudiadas es muy baja siendo la frecuencia esperada inferior a 5 en, al menos, un 25% de las clases. Al igual que en el caso anterior, se considera que existe significación estadística cuando $p < 0,05$.

Test de desequilibrio de transmisión (*Transmisión disequilibrium test*, TDT)

La elección del grupo control en los estudios de asociación resulta crucial para evitar el riesgo de que el grupo en estudio y el grupo control provengan de subpoblaciones genéticamente diferentes. Para evitar esta posibilidad de sesgo hemos utilizado un método de asociación con controles internos conocido como test de desequilibrio de transmisión (TDT). Para su realización es necesaria la genotipación de tres individuos dentro de cada familia: el probando y sus padres. Así por ejemplo, para estudiar la posible asociación del alelo A1 con la enfermedad en estudio, se compara la frecuencia de dicho alelo entre los alelos transmitidos y los no transmitidos, de los padres sanos a sus hijos afectados. La significación estadística de la asociación se calculó mediante el test χ^2 de Pearson.

C.2.1.11. Herramientas bioinformáticas para el análisis in silico de cambios de secuencia

La bioinformática se define como *aquella disciplina interesada por todos los aspectos relacionados con la adquisición, almacenamiento, procesamiento, distribución, análisis e interpretación de la información biológica, mediante la aplicación de técnicas y herramientas de las matemáticas, biología e informática con el propósito de comprender el significado biológico de una gran variedad de datos.*

Con la finalización del Proyecto Genoma Humano se ha impulsado la aparición y desarrollo de herramientas bioinformáticas integradas para la búsqueda y

recuperación de datos sobre secuencias, estructuras, mutaciones y enfermedades. Estas herramientas bioinformáticas son programas diseñados para llevar a cabo el análisis de todos los datos biológicos almacenados por la comunidad científica.

En el presente trabajo se han empleado distintas herramientas bioinformáticas para el análisis *in silico* de los cambios de secuencia asociados a HSCR y DNI B identificadas en los genes rastreados en el presente trabajo, y son las siguientes:

-Detección de aparición o pérdida de sitios donadores o aceptores en el ensamblaje de la maduración del mRNA: http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html y http://www.tigr.org/tdb/GeneSplicer/gene_spl.html

- Predicción de sitios de unión de factores de transcripción en la secuencia promotora del gen: http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/promoter.pl y <http://www.ebi.ac.uk/asd-srv/wb.cgi>.

- Identificación de dominios funcionales en una proteína. Este análisis se lleva a cabo utilizando la herramienta Pfam (*Protein families database of alignments and HMMs*) (Bateman et al., 2002) (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>). De la misma manera, utilizamos la herramienta ScanProsite para la búsqueda de dominios, patrones o motivos proteicos incluidos en la base de datos PROSITE (Castro et al., 2006) (<http://expasy.org/tools/scanprosite/>). Esta información se utilizó para determinar si una variante podía o no afectar a algún dominio funcional de la proteína.

- Predicción de la influencia de un cambio de aminoácido en la estructura y función de la proteína. El programa SIFT (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>), predice si una determinada sustitución aminoacídica en una proteína será tolerada o no desde el punto de vista de conservación de su funcionalidad. Para ello se basa en homologías de secuencias con otras especies y en las propiedades físico-químicas de los aminoácidos. (Ng y Heinikoff, 2003). La herramienta PolyPhen (<http://coot.embl.de/PolyPhen>) es capaz de estimar el posible impacto de una sustitución aminoacídica en la estructura y función de una proteína usando parámetros similares a los de SIFT (Ramensky, 2002). Debido a que PolyPhen realiza el alineamiento de secuencias utilizando proteínas de familias proteicas relacionadas y proteínas putativas, la tasa de falsos negativos podría ser considerablemente alta. Para evitar esto, de manera alternativa en los casos negativos, se realizó un alineamiento utilizando la secuencia de la proteína de interés en distintas especies anotadas en NCBI mediante la herramienta ClustalW2

que permite el alineamiento múltiple de secuencias tanto proteicas como de DNA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

- Predicción de la influencia de un cambio de aminoácido en la estructura de la proteína. La herramienta DiANNA (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>) se utilizó para analizar el posible impacto de la inclusión de nuevos residuos de cisteína en la secuencia proteica, ya que es capaz de estimar con qué probabilidad una cisteína de cierta proteína se encuentra reducida, formando un puente disulfuro, o unida a un ligando metálico (Ferre y Clote, 2005). La herramienta GARNIER (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/garnier>) se utilizó para la predicción del impacto de una sustitución aminoacídica en la estructura secundaria de la proteína.

Nomenclatura de las variantes de secuencia

La nomenclatura empleada para la descripción de las variantes de secuencia identificadas en la presente Tesis se encuadra dentro de las recomendaciones de la Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>) (Dunnen y Antonarakis, 2001).

C.2.2. Técnicas generales utilizadas para estudios funcionales.

C.2.2.1. Clonación y producción de plásmidos.

La clonación en células es una de las técnicas más utilizada durante los últimos años en biología molecular para llevar a cabo estudios sobre la estructura y función de genes en eucariotas. El proceso consiste en aislar el fragmento específico de DNA que se quiere analizar e introducirlo en un vector. Este vector nos servirá de vehículo para la transferencia de material genético a una célula, en la que será capaz de replicarse y generar numerosas copias de sí mismo. Entre los vectores más utilizados se encuentran los plásmidos bacterianos, moléculas de DNA circular de doble cadena que se replican y heredan independientemente del cromosoma bacteriano. Una vez clonado *in vitro* el fragmento de DNA en el plásmido, éste puede introducirse en bacterias para su amplificación mediante un proceso artificial de transformación. Para identificar las células transformantes se utilizan marcadores selectivos codificados por el plásmido que suelen ser genes que

confieren resistencia a antibióticos, de esta manera en presencia de dicho antibiótico sólo crecerán las bacterias que contiene el plásmido que les confiere resistencia al mismo.

Además, los vectores de expresión permiten también la expresión del material genético clonado en un hospedador al fusionar dicho material genético a señales adecuadas de inicio de la transcripción y de la traducción. Por ello, ciertos plásmidos contienen también el origen de replicación del virus animal SV40 y el promotor de citomegalovirus (P_{CMV}), que permiten la replicación de este y transcripción del gen clonado, respectivamente, en células de mamíferos en cultivo.

Proceso empleado para la clonación en plásmidos

1) Tanto el plásmido como el fragmento de DNA que queremos clonar se cortan con enzimas de restricción. La mayoría de los plásmidos que se usan comúnmente en el laboratorio contienen sitios de policlonaje que consisten en secuencias que son reconocidas por diferentes enzimas de restricción. Se suelen utilizar dos enzimas de restricción diferentes que generen extremos cohesivos no complementarios.

2) Ligación del fragmento de DNA al plásmido lineal *in vitro*. Ello implica la formación de nuevas uniones entre los residuos fosfatos en el extremo 5' de la doble cadena de DNA y el grupo hidroxilo del extremo 3'. La formación del enlace fosfodiéster es catalizada *in vitro* por la enzima ligasa de DNA del bacteriofago T4.

3) Transformación de *E. coli* competente mediante choque térmico o electroporación y selección de los transformantes por resistencia a antibióticos. La estirpe de *E. coli* utilizada en el presente trabajo como intermediaria en los experimentos de clonación es la DH5 α (Invitrogen).

Protocolo de transformación

Durante la transformación de bacterias introduciremos una copia de nuestro plásmido de interés en la célula mediante un choque térmico. Las células transformadas crecerán en medio selectivo formando colonias aisladas, gracias a la presencia de un gen de resistencia a antibiótico. La transformación se realizará en 3 pasos:

1) Alicuotar 25 μ L de *E.coli* DH5 α competentes trabajando en condiciones estériles y en frío. Añadir entre 10 y 100ng de DNA plasmídico e incubar 30 minutos en hielo.

2) Someter las células a un choque osmótico a 42°C durante 30 segundos tras el cual se dejaran las células 2 minutos en hielo.

3) Añadir 250 μ L de medio SOC (Invitrogen) e incubar 1 hora a 37°C con agitación. Transcurrido este tiempo sembrar 30 μ L en una placa de Petri precalentada con LB y el antibiótico de selección e incubar 16 horas a 37°C.

Medio LB (pH 7.0) (esterilizar y guardar a 4°C).

Triptona	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	10g
H ₂ O csp	1L

Para medio sólido LB añadir 15g de agar. Autoclavar la solución y posteriormente verter en placas de Petri en condiciones de esterilidad.

De manera alternativa, y en algunos casos se llevó a cabo la transformación por electroporación utilizando bacterias *E.coli* DH5 α electrocompetentes. Este proceso es idéntico al anterior, con la diferencia de que se sustituye el choque térmico por la electroporación utilizando el electroporador Gene Pulser Xcell Electroporation System (BioRad) que transmite un pulso de corriente eléctrica de 240V durante 10 segundos a las células en contacto con el DNA. Este proceso aumenta la permeabilidad de la membrana bacteriana, lo que permite la entrada del DNA.

Proceso de preparación de *E.coli* electrocompetentes:

1) Sembrar en medio sólido LB una muestra de la estirpe DH5 α e incubar en estufa a 37°C toda la noche.

2) Inocular 25mL de medio líquido SOB con una colonia aislada obtenida del cultivo en medio sólido. Incubar en estufa con agitación a 37°C toda la noche.

3) Inocular 500 mL de medio líquido SOB con 5 mL del cultivo e incubar en estufa con agitación a 37°C hasta que la DO₅₅₀=0,55-0,65.

4) Colocar el cultivo en hielo con agitación durante 15 minutos. Repartir el volumen en 4 botes de centrifuga de 250mL previamente enfriados a 4°C y centrifugar a 2600G durante 20 min a 4°C.

6) Decantar el sobrenadante y resuspender las bacterias con agitación manual en 50mL de glicerol al 10% enfriado a 4°C. Pasar a un único bote y centrifugar como en el paso anterior.

7) Decantar el sobrenadante y resuspender las bacterias en 50mL de glicerol al 10% enfriado a 4°C. Centrifugar como anteriormente y decantar el máximo posible de sobrenadante.

8) Añadir 20mL de glicerol al 10% enfriado a 4°C y resuspender. Congelar en nitrógeno líquido alícuotas de 200µL utilizando microtubos de 1.5mL. Guardar a -80°C.

Utilizar material estéril y realizar el proceso preferentemente a 4°C.

Medio SOB (esterilizar y guardar a 4°C).

Triptona 20g

Extracto de levadura 5g

NaCl 0,5g

H₂O csp 1L

Añadir 10mL de KCl 250mM y ajustar el pH a 7,0. Justo antes de usar, añadir 5mL de MgCl₂ 2M.

Producción de plásmidos

Para la producción de DNA plásmídico se inoculó de 100 a 250mL de medio LB selectivo, según la cantidad de plásmido necesario, con una colonia de bacterias transformantes. Se dejaron crecer las células durante 16 horas a 37°C.

La purificación de los plásmidos se realizó utilizando el kits QIAGEN Plasmid Purification Mini Kit (Qiagen) para secuenciación, PCR o digestión/ligación. En el caso de la purificación de plásmidos para trasfección de células eucariotas, se utilizó EndoFree® Plasmid Purification Maxi kit (Qiagen) debido a la alta toxicidad de los lipopolisacáridos bacterianos para las células animales. En ambos casos se siguieron las indicaciones del fabricante.

En todos los casos el resultado de la purificación fue analizado mediante secuenciación para comprobar la integridad de la secuencia clonada y su correcta orientación. Además se determinó la concentración mediante espectrofotometría.

C.2.2.2. Mutagénesis dirigida mediante PCR

La mutagénesis dirigida es una técnica que permite generar mutaciones específicas en un fragmento de DNA clonado. De este modo, se puede expresar el gen alterado en el hospedador adecuado para comparar las propiedades de la proteína mutante y silvestre e identificar los dominios o aminoácidos que son esenciales para mantener la integridad estructural y/o funcional de la proteína. La forma más fácil, rápida y efectiva de introducir, delecionar o sustituir nucleótidos en un fragmento de DNA es el empleo de la PCR utilizando dos cebadores sintéticos que llevan incorporado el cambio de secuencia deseado.

Para la introducción de mutaciones en la secuencia de DNA hemos utilizado QuikChange[®] Site-Directed Mutagénesis Kit (Stratagene) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema permite el uso de plásmidos de doble cadena como molde. Para el proceso se utilizó una pareja de cebadores, cada uno de los cuales era complementario de una de las cadenas de plásmido, solapantes entre sí y contenían en su secuencia la mutación de interés. Dichos cebadores son extendidos durante la polimerización generando plásmidos mutantes con muescas alternadas. Tras este proceso las hebras parentales son degradadas por la endonucleasa *Dpn I* específica de DNA metilado o hemimetilado disponible en el kit. Los plásmidos mutantes con las muescas se introducen por transformación en las bacterias XL1-Blue supercompetent cells disponibles en el kit, que repararan estas muescas.

C.2.2.3. Transfección a células en cultivo

La transfección o introducción de material genético exógeno a células eucariotas en cultivo es una herramienta muy eficaz en los estudios de biología molecular y celular. Existen diferentes métodos para introducir DNA foráneo en las células en cultivos. Algunos de estos métodos se basan en producir un ambiente químico adecuado que provoca la adhesión de DNA a la superficie de las células de donde es endocitado por mecanismos aún no establecidos; otros usan un campo

eléctrico para abrir poros en la células, a través de los cuales presumiblemente pasa el DNA al interior y en los últimos años se han generalizado métodos que aprovechan, por una parte, la capacidad de los policationes de condensar sobre sí el DNA y por otra la de los liposomas de proteger esta unión de la degradación lisosomal y elevar la capacidad fusogénica de estos complejos. Existen otras técnicas como el microbombardeo con partículas cubiertas con DNA o la microinyección de genes en los núcleos de las células.

En el presente trabajo se empleó el método de la lipofección, que se basa en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y el DNA que tienen afinidad por la membrana plasmática. Se transfectaron las células tras 24 horas de crecimiento en cultivo, cuando habían alcanzado un 80% de confluencia, con 100ng-3µg de DNA y los reactivos Lipofectamine/PLUS reagents (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

C.2.2.4. Líneas celulares utilizadas y condiciones de cultivo

Las líneas celulares empleadas en el presente trabajo fueron:

- HEK293, derivadas de células embrionarias de riñón humano (human embryonic kidney, HEK), cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco) suplementado con 10% SFB (Gibco), 1mM Piruvato Sódico y 4mM L-glutamina.
- HeLa, derivadas de células epiteliales humanas procedentes de carcinoma cervical, cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% SFB, 1mM Piruvato Sódico y 4mM L-glutamina.
- SK-N-MC, derivadas de neuroblastoma humano y transfectadas de manera estable con *RET*, cultivadas en DMEM suplementado con 10% FCS, 1% Penicilina/Estreptomina, 2mM Piruvato Sódico, 2mM L-glutamina y 0,8mg/mL Geneticina, estas células fueron suministradas por Isabella Ceccherini (Laboratorio Dra. Ceccherini, Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto Giannina Gaslini, Genova, Italia).
- SK-N-BE(2), derivadas de neuroblastoma, cultivadas en RPMI suplementado con 10% SFB, 1% HEPES y 2mM L-glutamina. Estas células crecen en monocapa y se cultivan en condiciones de 5% de CO₂ a 37°C. Cuando

alcanzan 90-95% de confluencia se dividen en varias placas y el medio se cambia cada 3 días.

Durante la transfección las células fueron incubadas en medio Opti-MEM + GlutaMAX™-I (Gibco).

C.2.2.5. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó con el reactivo de cuantificación de proteínas de Bio-Rad, basado en el método de Bradford. Dicho método consiste en la formación de un compuesto entre los residuos de aminoácidos básicos de las proteínas y el colorante Azul Comassie, que absorbe luz a 595nm. El rango de determinación de concentración fue de 1 a 20 µg/mL. Mediante espectrofotometría, calibrando previamente con estándares de concentración conocida, se midieron las concentraciones de proteínas de cada muestra a una dilución adecuada.

C.2.2.6. Análisis por Western Blot

La técnica de western blot se emplea para identificar proteínas presentes en los extractos celulares que son reconocidas con un anticuerpo específico. Inicialmente las proteínas se separan por su tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia del detergente aniónico dodecil sulfato sódico (SDS). Este detergente permite la disociación de agregados supramoleculares de las proteínas durante la electroforesis, favoreciéndose esto por la presencia de agentes reductores como el β-mercaptoetanol, que rompe los puentes disulfuro de las proteínas. Además la electroforesis se realizó en condiciones desnaturizantes, para ello se hirvieron las muestras durante 15 minutos a 99°C antes de cargarlas en el gel. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de Polivinilidene Fluoruro (PVDF). Una vez bloqueada la membrana para impedir la unión no específica de anticuerpos, ésta se incubó con el anticuerpo específico, monoclonal o policlonal, que reconoce un epitopo de la proteína que queremos identificar. A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con un enzima, la peroxiasa, cuya reacción catalítica libera luz. En algunos casos, el anticuerpo secundario estaba conjugado con biotina, por lo que se trata con ImmunoPure® Ultra-Sensitive ABC Peroxidase Staining Kit (Pierce) que contiene el complejo molecular avidina-peroxisada, que se

une de manera covalente a la biotina, permitiendo esto amplificar la intensidad de la señal. Tras lavar la membrana del anticuerpo secundario, ésta se introduce en una solución que contiene luminol 6,6mg/mL, 4-yodofenol 4mg/mL y H₂O₂ 30% (ECL). La oxidación del luminol por la peroxidasa produce un compuesto que emite luz. Finalmente, al exponer la membrana a una película de fotografía (Pierce), ésta queda impresionada permitiéndonos identificar la localización de las proteínas una vez que se revela con los líquidos fotográficos adecuados (Sigma-Aldrich)

Las condiciones de electroforesis, transferencia e hibridación, así como las de preparación de las muestras se especifican en cada caso.

C.2.2.7. Detección por Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica que permite la visualización de proteínas en un microscopio fluorescente, empleando anticuerpos conjugados a fluorocromos. Se utilizará un anticuerpo primario específico del antígeno de interés y otro secundario conjugado con el fluorocromo de reconocimiento del primario. En el presente trabajo hemos empleado esta técnica sobre células eucariotas en cultivo.

Se cultivaron las células en placas de 24 pocillos (7,5x10⁴ células/pocillo) para transfectarlas 24 horas después. Las células fueron fijadas 24 horas después de la transfección en PFA 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras dos lavados con PBT (PBS Triton, Tampón salino fosfato), se incubaron en solución de bloqueo (PBS, BSA 1%, glicina 0,15%) toda la noche a 4°C. La hibridación con el anticuerpo primario se llevó a cabo en solución de bloqueo a 4°C durante 14-18 horas y con el secundario durante 2 horas a temperatura ambiente. Las preparaciones celulares se montaron en medio Vectaschield con DAPI como tinción de contraste (Vector Laboratorios) para su visualización en un microscopio de epifluorescencia Leica DMR. Alternativamente se contratiñeron las preparaciones con TO-PRO-3-iodide dilución 1:5000 (Molecular Probes) y se montaron en medio Vectaschield sin DAPI para su visualización con un microscopio confocal Zeiss Axioplan 2. El análisis de imágenes se llevó a cabo con el paquete informático Metaphor.

C.2.2.8. Ensayo de actividad luciferasa

Esta técnica permite determinar directamente, en cultivos de células eucariotas, la actividad de un promotor de interés en respuesta a distintas condiciones experimentales (tratamientos farmacológicos, sobreexpresión de proteínas, presencia de factores de transcripción, etc). La firefly luciferasa es una proteína monomérica de 61KDa de *Photinus pyralis* que no necesita modificaciones postraduccionales para ser catalíticamente activa y oxidar a la luciferina hasta oxiluciferina en una reacción bioluminiscente. La técnica se basa en cuantificar la expresión de la firefly luciferasa a través de la reacción de bioluminiscencia que ésta cataliza. La reacción es lineal en un amplio rango de concentraciones, dentro del cual la cantidad de luz emitida será proporcional a la expresión de la firefly luciferasa. La actividad luciferasa puede normalizarse respecto a la concentración total de proteína en el extracto.

Se cultivaron las células en placas de 12 pocillos (10^5 células/pocillo) para transfectarlas 24 horas después. La actividad transcripcional fue cuantificada 24 horas tras la transfección. Para ello se lavaron las células dos veces con PBS para retirar los restos de medio de cultivo y se lisaron añadiendo 200 μ L de Lysis Buffer (Promega) y agitando la placa durante 15 minutos. El homogenizado se centrifugó durante 10 minutos a 10.000G en frío. Se determinó la actividad luciferasa a partir de 30 μ L del sobrenadante recuperado utilizando el sistema Luciferase Assay System (Promega) en un luminómetro Tristan LB941 (Berthold Technologies). La actividad luciferasa fue normalizada respecto a la concentración de proteínas totales.

C.2.3. Rastreo mutacional de los ligandos de RET (GDNF, NRTN, ARTN y PSPN) en las cohortes de pacientes DNI B y HSCR. Rastreo mutacional del proto-oncogén RET en la cohorte DNI B. Caracterización molecular de los cambios identificados

Debido a que HSCR y DNI B son ambos desórdenes del SNE que se presentan asociados con cierta frecuencia, sería posible que hubiera rutas moleculares implicadas en la aparición de estas dos enfermedades. Dada la clara implicación de *RET* en HSCR, queremos determinar si este gen ejerce un papel importante en la aparición de otras alteraciones del SNE, como la DNI B. Por ello nos planteamos realizar el rastreo mutacional de la secuencia codificante del proto-oncogén *RET*, y de los genes que codifican para sus ligandos (*GDNF*, *NRTN*, *ARTN* y

PSPN) en pacientes DNI B con el fin de evaluar estos genes como genes de susceptibilidad para dicha patología. Los genes *RET* y *GDNF* ya habían sido evaluados con anterioridad en una cohorte de pacientes alemana con resultados negativos (Gath et al., 2001). En este estudio se incluían un total de 24 pacientes DNI B, pero no se rastreaban *NTRN*, *ARTN* ni *PSPN* (Gath et al., 2001).

Por otra parte nuestro grupo disponía de resultados del rastreo mutacional en 106 pacientes HSCR de los genes que codifican para los ligandos de RET. Dichos resultados preliminares (Ruiz-Ferrer, 2007), asociaban el fenotipo HSCR con la presencia de mutaciones, no sólo en *GDNF* y *NTRN* como había sido previamente publicado (Angrist et al., 1996; Ivanchuk et al., 1996; Salomón et al., 1996; Hofstra et al., 1997, 2000; Doray et al., 1998), sino también en *PSPN*. Dado el interés de los resultados nos planteamos la ampliación del rastreo de dichos genes en el resto de pacientes de nuestra serie. Así en el presente trabajo se han incluido un total de 111 pacientes HSCR, 106 de ellos esporádicos, y 5 familiares, pertenecientes a 2 familias distintas. Mediante la técnica de dHPLC se ha analizado la región codificante completa, las uniones intrón-exón y las regiones intrónicas flanqueantes de estos genes.

Las reacciones de PCR se realizaron de forma individual utilizando oligonucleótidos previamente descritos (Mulligan et al., 1993, 1994; Eng et al., 1994; Ceccherini et al., 1994; Hofstra et al., 1994; Myers et al., 1995; Borrego et al., 1998), o bien diseñados con el programa Primer3. Las condiciones empleadas fueron la general que se explica en el apartado C.2.1.3, con las siguientes excepciones:

- Exón 7 *RET*, con 0,25µM de cada cebador.
- Exón 1 *GDNF*, con 0,075mM de cada dNTP y 1U de Taq DNA polimerasa.
- Exón 2A *NRTN*, con 0,075mM de cada dNTP, 1µM de cada cebador, 1,25µL DMSO y 1U de Taq DNA polimerasa.
- Exón 2B *NRTN*, con 0,075mM de cada dNTP, 1µM del cebador 5', 0,5µM del cebador 3', 1µL DMSO y 1U de Taq DNA polimerasa.
- Exón 2 *ARTN*, con 0,075mM de cada dNTP, 1µM de cada cebador, 1µL DMSO y 1U de Taq DNA polimerasa.
- Exón 3A *ARTN*, con 0,075mM de cada dNTP, 1µM de cada cebador, 2µL DMSO y 1U de Taq DNA polimerasa.
- Exón 3B *ARTN*, con 0,075mM de cada dNTP, 1µM de cada cebador, 1µL DMSO, 5ng/µL de DNA genómico y 1U de Taq DNA polimerasa.
- Exón 2 *PSPN*, con 0,075µM de cada dNTP, 1µM de cada cebador, 0,5µL DMSO y 1U de Taq DNA polimerasa.

El programa general de amplificación de los fragmentos es: (95°-5')->[(95°-TiD)->(TaH°-TiH)->(72°-TiE)]xN->(72°-7').

Tabla C.1 Cebadores y condiciones de amplificación y dHPLC de los exones de *RET*.

Exón	Cebadores	TaH	TiD	TiH	TiE	N	pb	T ^a dHPLC	% Tampón B
1	5' CTAGCCGCAGTCCCTCCA 3' ACAGAAAGGCGATTCTGAAC	62	30	30	-	40	206	68.6	51.1
2	5' CCTTATTCTCACCATCCCTC 3' AGTGTCAGCGGCTGTGATAA	56	30	30	30	35	387	60.5 / 64	56.8
3	5' CCCACAGACCTGACTTCTCT 3' AAGACCAGCAGTAGCAGGCA	67	30	60	-	30	375	62.8 / 63.9	56.6
4	5' GCCCCTGTCTGCTTGGTGC 3' GGACACTAAACCGACCGAG	64	60	60	60	35	342	65 / 67.4	55.8
5	5' ACTGACCAACGCCCTCTGC 3' GCACCTCATTTCTGGGGG	60	30	30	30	35	275	63 / 65.3	53.9
6	5' ATTGTTGTGCCCTACCTG 3' CCCAGACAGGCAATAGGTA	58	30	30	30	35	285	64	54.3
7	5' TCTACCCTCAGGCCATTACA 3' AACCATTTACTGCTGGGTCA	56	60	60	60	35	483	61.7 / 63	58.3
8	5' TGGTGCTGTTCCCTGTCC 3' CCACCGGTGCCATCGCCCCT	62	30	30	30	35	262	65	53.5
9	5' AGCCTGCTGTGTCTCTGTG 3' CCATGCCCTGATTAACCCCT	60	30	30	30	35	160	62 / 64	48.2
10	5' GCGCCCCAGGAGGCTGAGTG 3' GGTGGTGGTCCCGGCCGCC	68	30	60	-	35	186	64.7	50
11	5' TGCCAAGCCTCACACCAC 3' TCCCTCCCTGGAAGGCAG	67	30	120	-	35	349	64 / 64.8	55.1
12	5' TTCTTCTCCCTGTCATCCT 3' TCTTCAGGGTCCCATGCTG	62	30	30	30	35	307	59.3 / 65	54.9
13	5' GCAGGCCTCTCTGTCTGAACTT 3' GGAGAACAGGGCTGTATGGA	65	30	60	-	35	296	63.5	54.6
14	5' AAGACCAAGCTGCCTGAC 3' GCTGGGTGCAGAGCCATAT	65	30	60	-	35	295	62 / 65.6	54.6
15	5' GTCTACCAGGCCGCTAC 3' ATGGTGCACCTGGGATCCCT	60	30	30	30	35	292	62.2 / 64.4	54.5
16	5' AGGGATAGGGCCTGGCCTTC 3' TAACCTCCACCCCAAGAGAG	66	30	30	30	35	192	58.6	50.3
17	5' CACTGGTCCTTTCACTCTCT 3' GGGAGGGAATGCACACAGAT	59	30	30	30	35	231	62 / 63.4	52.2
18	5' TGTGGTGGGCTGTCCTTCTG 3' CTGGGGTGAGGCTGGAGTCT	63	30	30	45	35	235	61.6 / 62.9	52.4
19	5' AGTGACCGCCATCTCTGT 3' ATAGTGCAAAGGGGACAGC	64	60	60	60	35	229	58.1 / 62.2	52.2
20	5' AGTTTTGGTTCTTCAGTGC 3' GACTTTCCATTCTCAGCAT	56	30	30	30	35	266	58	53.6
21	5' GCTTCTGTCACTTCTTATTGC 3' CTTGGCCTCACAAAATGC	61	45	40	60	30	268	61	53.7

Las tablas C.1 y C.2 muestran la secuencia de los cebadores utilizados, la temperatura de hibridación específica para cada fragmento (TaH), los tiempos de desnaturalización (TiD), hibridación (TiH) y extensión (TiE), el número de ciclos (N), el tamaño de los fragmentos amplificados (pb), la temperatura del horno del sistema WAVE DNA Fragment Analysis (T^a dHPLC) y el porcentaje de Tampón B de la fase móvil (% Tampón B).

Aquellas muestras que presentaron un perfil aberrante por dHPLC se analizaron mediante secuenciación directa bidireccional y se llevó a cabo el alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas con la secuencia de referencia de *RET* (RefSeq NM_020975.3), *GDNF* (RefSeq NM_000514.2), *NRTN* (RefSeq NM_004558.2), *ARTN* (RefSeq NM_057091.1) y *PSPN* (RefSeq NM_004158.2). Una vez caracterizados los cambios de secuencia, se analizó su presencia en los familiares mediante análisis por dHPLC, así como en un grupo constituido por 150 controles sanos.

Tabla C.2 Cebadores y condiciones de amplificación y dHPLC de los exones de los ligandos de RET (*GDNF*, *NRTN*, *ARTN* y *PSPN*).

Gen	Exón	Cebadores	TaH	TiD	TiH	TiE	N	pb	T ^a dHPLC	% Tampón B
<i>GDNF</i>	1	5' CCAGGCTTAACGTGCATTCT	66	30	15	30	35	343	65.3 / 67.7	55.9
		3' GTAGGCCACACAGCCATCAG								
	2A	5' CTGTGGGTCCAATTTTTGCT	57	30	30	30	35	361	57.2	56.3
		3' TTTCATAGCCCAGACCCAAG								
	2B	5' AACAAATGGCAGTGCTTCCT	61	30	30	30	35	487	58.1 / 59.1	58.4
		3' CTTCCATTCTGGGCAAACAT								
<i>NRTN</i>	1	5' GCTGCTGGAGGGACAGAC	67	30	15	15	35	304	60 / 66.2	54.8
		3' CACCACCTCCCACTCCACT								
	2A	5' ACCGTGCACTCCTGCAGGGG	68	40	40	40	30	267	68.9 / 72	53.7
		3' GCAGCCCCGAGGTCGTAGACG								
	2B	5' GTCCGACGAGACGGTGCT	62	30	15	10	35	322	68.6/70.6	55.3
		3' CTACGCACGCGCAGTCTT								
<i>ARTN</i>	1	5' GCTGCAAAGCACCTAACACA	60	30	30	30	35	345	61.1	55.9
		3' CTCTCCCTCACCAGTCAAGC								
	2	5' GTTTCCCCTCCACACAGCTA	64	30	30	30	35	348	63.8/66.9 / 68.7	54.4
		3' CCTGGAATGAGACCCAGTCA								
	3A	5' CTGCCGGGTAGGTGAGAG	65	30	30	30	35	371	67.7/69.8 / 71.3	56.5
		3' GGCTGAGGTCGTGTGGAG								
3B	5' GACGAGCTGGTGCGTTTC	59	30	20	20	35	302	66 / 68.5	54.8	
	3' AGGGTCCCAGGCAGGAAG									
<i>PSPN</i>	1	5' GCCGGCAGTGAAGAGGTTAG	61	30	30	30	35	308	62.7 / 64.5	54.9
		3' GAAGGGCGCTGACAGTGA								
	2	5' CCGATGGAGAGTTCTCGTCT	66	40	40	40	35	606	65 / 67.3	58.3
		3' CGGGAGAGTGGTGTCTTTA								

C.2.4. Estudio funcional de las mutaciones de los ligandos de RET

Tanto en el rastreo de los ligandos de RET en pacientes HSCR realizado con anterioridad en nuestro laboratorio, como en la ampliación de dicho rastreo presentado en este trabajo, se encontraron varias mutaciones. Tras evaluar la posible implicación de dichas mutaciones en HSCR se decidió comprobar el efecto de las mutaciones R91C-PSPN; A67T, A96S y F127L en NRTN; y A72H-ARTN en primer lugar sobre el nivel de expresión, y en el caso de aquellas que se encuentran en la región madura de la proteína se analizó su efecto en la fosforilación del receptor RET.

C.2.4.1. Clones utilizados y mutagénesis dirigida

Para la expresión de las proteínas PSPN, NRTN, ARTN y GFR α 4 se utilizaron los vectores de expresión pcDNA3-PSPN, pcDNA3-NRTN, pcDNA-ARTN y pCR3.1-GFR α 4 que permiten su expansión en cultivos bacterianos y su expresión en células de mamíferos en cultivo. El clon pCR3.1-GFR α 4 fue facilitado por Mart Saarma (Laboratorio Dr. Saarma, Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finlandia). Este clon procede de la clonación del cDNA de *GFR α 4* humano (GeneBank AJ291674) en el plásmido pCR3.1 (Lindahl et al., 2001). Para la construcción de pcDNA3-PSPN, se aisló el RNA total de células SK-N-BE(2) en cultivo y a partir de este se obtuvo el cDNA de *PSPN* (GeneBank BC143894) mediante RT-PCR utilizando los cebadores 5'-CGGGATCCGTGGGGCCTCCTGGCTGCAGGGG-3' y 5'-GGAATTCGCACTCACTGCTGGTCGCCCCAG-3'. Tras comprobar el producto de PCR por secuenciación directa, se digirió con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*, y se clonó en el vector pcDNA3 (Invitrogen) mediante ligación usando la ligasa T4 (Invitrogen). El cDNA de NRTN humano (GeneBank BC127182) se obtuvo de la colección de clones RZPD (German Science Centre for Genome Research) y se subclonó en el vector pcDNA3 tras su digestión con *EcoRI* y *BamHI*. Por su parte en cDNA de ARTN humano (GeneBank BC062375; Origene) se subclonó en el mismo vector en los lugares de corte de *EcoRI* y *XhoI*.

Las mutaciones a analizar se introdujeron en los plásmidos pcDNA3-PSPN, pcDNA3-NRTN y pcDNA3-ARTN respectivamente, mediante mutagénesis dirigida utilizando las parejas de cebadores de la tabla C.3. Las condiciones de PCR fueron

las recomendadas por el fabricante, con las siguientes excepciones: 3%DMSO, 40ng DNA molde y 400ng de cada cebador.

Tabla C.3 Cebadores empleados en la mutagénesis dirigida de *PSPN*, *NRTN* y *ARTN*

Fragmento	Cebadores
R91C-PSPN	5'-TCTTCTGCTACTGCGCCGGCAGCTGCC-3' 5'- AGTAGCAGAAGATGACCTTCTCCTCT-3'
A67T-NRTN	5'-TCCTGCAGGGGGCCCCGGATACGATGGAGCTGCGCGAGCTG-3' 5'-CAGCTCGCGCAGCTCCATCGTATCCGGGGCCCCCTGCAGGA-3'
A96S-NRTN	5'-CCCGGCGGCGGCGCGCGCGTTCGCGGTTGGGGGCGCGGCC-3' 5'-GGCCGCGCCCCAACCGCGAACGCGCGCGCCGCCCGGG-3'
F127L-NRTN	5'-GCTGTTGCGCTACTGCGCAGGCGCCTGCGAG-3' 5'-GTAGCGCAACAGCACCGTCTCGTCGG-3'
A72H-ARTN	5'-GCCGGGGGGACGCACGGCCCACTGGTGAGTGAAGAGCCC-3' 5'-GGGCTCTTCCACTGCACCAGTGGGCCGTGCGTCCCCCGGC-3'

C.2.4.2. Transfección de las células y expresión de los ligandos silvestre y mutantes

Tanto para analizar el nivel de expresión de los ligandos, como para testar la capacidad de activar a RET de aquellos ligandos con mutaciones localizadas en la región correspondiente a la proteína madura, es necesario generar una cantidad suficiente de ligandos, tanto mutantes como silvestres. Con este fin se cultivaron células HEK293 en placas de 10cm de diámetro (2×10^5 cels/placa) para transfectarlas 48 horas después con los clones PSPN, NRTN y ARNT, tanto silvestre como mutante (10 réplicas por cada construcción). Seis horas después de la transfección se sustituyó el medio por medio DMEM sin suero suplementado con insulina, transferrina y selenio (Gibco). Pasados dos días se concentró el medio en el que crecieron las células, que era rico en los ligandos que habían sido secretados por las células transfectadas, usando los filtros Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices (Millipore) y la centrífuga con rotor basculante Omnifuge 2.0 RS (Heraeus). La cuantificación de la concentración de los ligandos en el volumen recuperado se realizó mediante western blot.

Para la cuantificación de PSPN se realizó una electroforesis con 10µl de las muestras a cuantificar y 20ng de PSPN comercial (Peprotech), resuspendidas en la cantidad adecuada de tampón de carga. En el caso de NRTN la electroforesis se realizó con 20µl de las muestras a cuantificar y dos soluciones de NRTN comercial (Peprotech) con una cantidad de 5ng y 10ng. Mientras que para ARTN, la electroforesis se realizó con 20µl de las muestras a cuantificar y 20ng de ARTN comercial (Peprotech). La electroforesis se realizó en geles de acrilamida al 10%,

durante 1h a 20mA/gel en tampón de electroforesis (Tris 25mM, Glicina 200mM, SDS 0,1%). Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF durante 1h a 250mA en tampón de transferencia (Tris 48mM, Glicina 25M, SDS 0,037%, MeOH 20%). Tras bloquear la membrana durante 1h a temperatura ambiente con TTBS (Tris 100mM, NaCl 0,8M, Tween 20 0,1%) 5% leche desgrasada, se incubó con los anticuerpos policlonales anti-human PSPN, anti-human NRTN y anti-human ARTN (Peprotech) 1:1000 en TTBS 5% leche durante 16 horas a 4°C, respectivamente. La hibridación con el anticuerpo secundario policlonal Anti-rabbit (Cell Signalling) 1:1000 en TTBS 5% leche, se realizó durante 1h a 37°C.

Tras revelar la película fotográfica, se cuantificó la cantidad de proteína correspondiente a los ligandos silvestres y mutantes con el software ImageJ (JAVA).

C.2.4.3. Ensayo de activación de RET

Para el ensayo del efecto de los ligandos mutantes sobre la fosforilación de RET, se utilizaron las células SK-N-MC transfectadas de forma estable con el cDNA de *RET*. Para realizar el ensayo de PSPN, las células se transfectaron previamente con un vector de expresión de $GFR\alpha 4$, ya que el análisis mediante RT-PCR empleando los cebadores 5'-GCTCCTGCTCCAGAGGCACT-3' y 5'-AGGGGCCAGTAGGCCACAGA-3', reveló que las células no expresaban dicho correceptor. Tras cultivar las células hasta alcanzar el 70% de confluencia en placas de 10cm de diámetro, se incubaron en medio sin suero durante 12h y se estimularon durante 15 minutos con 150ng/mL de PSPN y NRTN tanto silvestre como mutante. En paralelo se realizó el mismo ensayo con la misma concentración de GDNF, PSPN y NRTN comercial (Peprotec) y sin tratamiento, como controles positivos y negativo, respectivamente. Transcurrido este tiempo las células se lavaron con PBS dos veces y se lisaron con 500 μ L de tampón de lisis NP-40 (Tris/HCl 20mM pH 7,5, NaCl 150mM, EDTA 2mM, NP-40 1% y suplementado con cóctel inhibidor de proteasas y fosfatasa comercial: PhosStop Phosphatase Inhibitor Cocktail Tables; Complete protease Inhibitor Cocktail tables; Roche. El volumen recogido se incubó durante 15 min a 4°C con agitación y se centrifugó 15 min a 13000 rpm en frío. Se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante y tomamos 1mg de proteína total en 0,750mL de tampón de lisis para incubarlos con 4 μ g de anticuerpo anti-RET policlonal c19 (Santa Cruz Biotechnology) a 4°C durante 16h. Posteriormente se añadieron 50 μ L de proteína A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology) y se incubó durante 3h a 4°C para

inmunoprecipitar RET. El producto resultante se lavó 5 veces en tampón de lisis, centrifugando a 2.000G durante 5 minutos y se resuspendió en 25 μ L de tampón de carga. Las muestras se cargaron en un gel de acrilamida al 8%.

La electroforesis de las muestras se realizó en condiciones reductoras y desnaturalizantes a 23mA durante 2,5h en tampón de electroforesis. La transferencia a una membrana de PVDF se llevó a cabo durante 3h a 250mA en tampón de transferencia a 4°C. Tras bloquear la membrana durante 1h a temperatura ambiente con TTBS 5% leche desgrasada, se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-Fosfotirosina (Santa Cruz Biotechnology) 1:500 en TTBS 5% leche durante 16 horas a 4°C. La hibridación con el anticuerpo secundario conjugado con biotina Anti-mouse (Jackson IR) 1:10.000 en TTBS 5% leche, se realizó durante 1h a 37°C. Una vez que se había separado el anticuerpo primario anterior con solución de *striping* (β -mercapto-etanol 100mM, SDS 2%, Tris 62,5mM pH 6,7), la detección de RET total se llevó a cabo sobre esta misma membrana utilizando el anticuerpo policlonal anti-RET H300 (Santa Cruz Biotechnology) 1:1000 e incubando durante 16h a 4°C y anticuerpo secundario policlonal Anti-rabbit (Cell Signalling) 1:1000, incubando durante 1h a 37°C.

Tras revelar la película fotográfica se calculó la cantidad de RET fosforilado con respecto a RET total y se halló la media y desviación típica de cinco experimentos independientes. Para determinar si existieron diferencias significativas de fosforilación entre silvestre y mutante se aplicó la prueba estadística T-Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

C.2.5. Análisis molecular de la variante c*587 T>C del gen RET en nuestra cohorte de pacientes HSCR

El alelo polimorfo c*587C (rs3026785) se encuentra en desequilibrio de ligamiento con la variante c.2508T (836S) considerada como alelo de protección en HSCR en población italiana (Griseri et al., 2000; Lantieri et al., 2006). Estudios recientes sugieren que esta variante, además, tiene un efecto funcional en la estabilidad del mRNA (Griseri et al., 2007). Con el fin de evaluar la implicación de dicha variante en HSCR en población española se genotiparon un total de 183 pacientes HSCR esporádicos y 190 individuos control mediante tecnología Taqman.

Se empleó el ensayo para genotipación a gran escala C__15768366_10 (Applied Biosystems).

Con los resultados de la genotipación, se realizó un estudio de asociación de dicha variante a HSCR comparando las frecuencias alélicas y genotípicas entre casos y controles. Para comprobar si existieron diferencias significativas aplicamos el test estadístico de la χ^2 de Pearson.

Asimismo, se analizó la presencia de la variante c*587T>C en el contexto del haplotipo de riesgo para HSCR de RET en nuestros pacientes, comprobándose mediante el test estadístico de la χ^2 de Pearson si había diferencias significativas en la presencia de dicho haplotipo de riesgo entre los portadores de los distintos alelos de la variante analizada.

C.2.6. Análisis molecular de variantes de secuencia del gen RET en pacientes DNI B

Se han analizado un total de 11 SNPs, distribuidos a lo largo de toda la secuencia de *RET* en 23 pacientes DNI B y 30 pacientes DNI B+HSCR y sus respectivos padres, con el fin de evaluarlos como posibles factores de susceptibilidad para el desarrollo de esta patología. También se incluyeron en el estudio 100 controles sanos. Los 11 SNPs se eligieron en base a resultados obtenidos por nuestro grupo con anterioridad en pacientes HSCR esporádicos (Borrego et al., 1999, 2003a; Fernandez et al., 2005). Se seleccionó una variante localizada en el dominio promotor de la transcripción del intrón 1 del gen (rs2435357), al igual que otros 3 SNPs en el extremo 3' de dicho intrón (rs2505533, rs2505532 y rs2565206) y uno en el intrón 19 (rs2075912) por haber estado diferencialmente distribuidas en HSCR frente a controles en varias poblaciones (Borrego et al., 2003a; Burzynski et al., 2004; Fernández et al, 2005; Emison et al., 2005). También se incluyó en el análisis una variante en el extremo 3'UTR del gen (rs3026785) que había mostrado una menor transmisión en pacientes HSCR (Griseri et al., 2007). Finalmente se seleccionaron 5 SNPs en la región codificante del gen (rs1800859, rs1800860, rs1799939, rs1800861, rs180062) ya que algunos de ellos habían sido asociados previamente a distintas enfermedades como HSCR, cáncer medular de tiroides esporádico o cáncer papilar de tiroides (Borrego et al., 1999, 2000; Ruiz et al., 2001).

Para la genotipación de los SNPs empleamos la tecnología Taqman. Las variantes evaluadas y las referencias de los ensayos diseñados y suministrados por Applied Biosystem se recogen en la Tabla C..

Tabla C.4 Variantes de secuencia de *RET* evaluadas como factores de susceptibilidad para HSCR

Gen	SNP	bd SNP ID	Applied Biosystems ID
RET	c.73+9277T>C	rs2435357	C__16017524_10
	c.74-1463 T>C	rs2505533	C__16253581_10
	c.74-1370C>T	rs2505532	C__3204328_10
	c.74-126G>T	rs2565206	C__3204331_10
	V125V	rs1800859	C__7566350_10
	A432A	rs1800860	C__3204348_10
	G691S	rs1799939	C__3204350_10
	L769L	rs1800861	C__7566349_20
	S836S	rs1800862	C__7566348_10
	c.3187+47C>T	rs2075912	C__15768390_10
	c*587T>C	rs3026785	C__15768366_10

Con los resultados de la genotipación de los polimorfismos, se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas para los grupos de pacientes DNI B, DNI B+HSCR y para controles. También se trazaron los haplotipos que comprendían dichos polimorfismos a partir del análisis de segregación sobre los genotipos de los pacientes y sus padres. Para el estudio de casos y controles comparamos las distribuciones alélicas, genotípicas y haplotípicas entre ambos grupos de pacientes y controles aplicando el test estadístico χ^2 de Pearson o el test de Fisher con dos colas. También se compararon los resultados de ambos grupos de pacientes con los datos disponibles en nuestro grupo en pacientes HSCR (Borrego et al., 1999, 2000, 2003a; Fernandez et al., 2005). Aplicamos TDT a partir de los datos de los pacientes y sus padres, tanto para el análisis de distribución alélica como haplotípica.

C.2.7. Rastreo mutacional del gen *NTRK3* en la cohorte HSCR.

Caracterización molecular de los cambios identificados

Nuestro grupo había obtenido con anterioridad resultados positivos al evaluar la implicación del gen de la Neurotrofina 3 (*NTF3*) en HSCR (Ruiz-Ferrer et al., 2008). Además se conoce el papel de la ruta de las neurotrofinas en el desarrollo embrionario del SNE gracias a modelos animales, así como su localización diferencial en intestino normal vs intestino agangliónico en humanos

(Newgreen y Young, 2002). Por este motivo nos planteamos realizar el rastreo mutacional de la secuencia codificante del gen que codifica para su receptor, *NTRK3*, en pacientes HSCR, con el fin de evaluar su posible implicación en la aparición de esta patología. Para ello incluimos en el estudio 143 pacientes HSCR, 124 de los cuales eran esporádicos, y los restantes 19 familiares, pertenecientes a 10 familias distintas.

Mediante la técnica de dHPLC se analizó la región codificante completa, las uniones intrón-exón y las regiones intrónicas flanqueantes para este gen. Las reacciones de PCR se realizaron de forma individual utilizando oligonucleótidos diseñados con el programa Primer3.

Tabla C.5 Cebadores y condiciones de amplificación y dHPLC de los exones de *NTRK3*

Exón	Cebadores	TaH	pb	T ^a HPLC	% Tampón B
1	5' GAAGGATTTTGCATCTGATCG 3' CCGGAGTCACCTGGAATG	61	599	60.8 / 61.7	53.9
2	5' TAGCTCATCGGGGATCAAAG 3' AAGAAGACCTGGGGGAGAAA	61	299	61.8 / 63	54.7
3	5' TATCCCTCTGCCACTTGAGC 3' TTCCTGCCCCAAGAGTACC	61	182	60.2 / 61.7	49.7
4	5' GCATTATTTGTGCCAGACTTG 3' TCCACCCATTACCAGCACTT	60	177	59.4 / 62.5	49.3
5	5' GGTCCCCCTTGTCTCATAG 3' AGGTAACGTCCAGCACCATC	63	320	62 / 63.1	55.3
6	5' TACTGGGCAAGGCAAGAAGT 3' CACTCCCTAGCCTCCTGATG	63	288	60.8 / 61.9	54.4
7	5' AGGTAGCAGAGCCATCCTTG 3' CCTCTCCAGCCTCCTATGC	61	269	58.7 / 62	53.7
8	5' GAAGGCTACTGCAGGAGGTG 3' ATCCATACACCTCCGATCCA	62	397	60.9 / 64	57
9	5' CATGGTGAATGGGAGAGATCA 3' GCCAGGGATGATGTGGAATA	60	225	55.5 / 56.8	52
10	5' CCTGGCTTTTCAGAGGATGTT 3' TTTTCAGACTTCATTTGTGTTGC	60	261	60.1 / 62	53.4
11	5' CTGTTCTTATCTGGGCACACAC 3' GGAAACATTACTGCTTTTGATCAA	61	251	59.3 / 60	53.1
12	5' GTTGGGGGTTGTCTGTGG 3' GTTCCAGAACCCCAGGTACA	63	351	62.2 / 63.8 / 64.2	56
13	5' TGTCTCCCTGTGTACCAAAA 3' CATTGACCTCGGAGCAAAGT	61	377	60.5 / 61	55.7
14	5' TGGTAACCCAGTGGTGTGTG 3' ATTTCTGGCTCCAGGGAAAA	60	350	60.2 / 62	56
15	5' GGCCTTTCTCCTTGATCTCC 3' TGGGCATGGGTGTGTATATG	61	424	60.3 / 62.5	57.5
16	5' AAGGCCTTCCTTTTCTGAGG 3' CCAGAGGCAGACCCATGTAT	63	237	53.0 / 54.2	52.5
17	5' ATTCTGGCCATCTGGTCACT 3' TCCAAGTTCTGGGCTGAGAT	63	279	60.5 / 61	54.1
18	5' GGGAAAGTTGTTGCTTTTTGC 3' TTTGCCAAACTGCCTTACAG	62	470	59.8 / 60	58.2

El programa general de amplificación de los fragmentos es: (95°-5')->[(95°-30')->(TaH°-30')->(72°-30')]x35->(72°-7'). La tabla C.5 muestra la secuencia de los cebadores utilizados, la temperatura de hibridación específica para cada fragmento (TaH), el tamaño de los fragmentos amplificados (pb), la temperatura del horno del sistema WAVE DNA Fragment Analysis (T^a dHPLC) y el porcentaje de Tampón B de la fase móvil (% Tampón B).

Aquellas muestras que presentaron un perfil distinto por dHPLC se analizaron mediante secuenciación directa bidireccional y se llevó a cabo el alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas con la secuencia de referencia de *NTRK3* (RefSeq NM_001012338). Una vez caracterizados los cambios de secuencia, se analizó su presencia en los familiares mediante análisis por dHPLC, así como en un grupo constituido por 150 controles sanos.

C.2.8. Estudio de la alteración del proceso de splicing por variantes intrónicas en NTRK3

Para evaluar la posible perturbación del proceso de maduración del mRNA por la presencia de variantes de secuencia en la región intrónica del gen *NTRK3* (c.324-25C>T, c.1294-21delTCC y c.1889-37G>C), procedimos a estudiar la expresión de dicho gen en linfocitos de sangre periférica en los pacientes portadores de dichas variantes mediante RT-PCR. Con este fin, se procedió a la extracción del RNA total de dichos individuos.

Para detectar un posible fallo en el proceso de maduración del mRNA, más concretamente del proceso de corte y empalme de exones o *splicing*, se diseñaron dos parejas de cebadores específicas de cDNA de *NTRK3*. Una de ellas para la amplificación de la región codificante que comprende los exones del 1 al 4 y la otra para los exones del 8 al 17. Se procedió a la retrotranscripción y amplificación del cDNA a partir de 3µg de RNA de cada paciente en paralelo con los controles positivo y negativo tal y como se explica en los apartados C.2.1.6 y C.2.1.3, con la particularidad de que la concentración de Cloruro magnésico en el proceso de amplificación fue 3mM. Los cebadores utilizados así como el tamaño del fragmento esperado y las condiciones de amplificación están representados en la tabla C.6.

Se comprobó, mediante electroforesis, si el tamaño del fragmento amplificado en los pacientes HSCR era el esperado y se comparó con individuos control no portadores de los cambios de secuencia correspondientes. Además el producto de la PCR se sometió a un análisis posterior por secuenciación directa bidireccional y se llevó a cabo el alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas con la secuencia de referencia del cDNA de *NTRK3* (RefSeq BT007291.1).

Tabla C.6 Cebadores y condiciones de amplificación del estudio de maduración del ARNm de *NTRK3*

Fragmento	Cebadores	pb	TaH	TiE
NTRK3 ADNc Exones 1-4	5' AAGTGTAGTTTCTGGCGGATTTTCT	387	53	30
	3' GTTACTTGACAGGTTTATATAACGCAA			
NTRK3 ADNc Exones 8-17	5' GTGGAATACTACCAAGAGGGAGAGATT	1174	65	60
	3' TCCATACATCACTCTCTGTAGTGA			

C.2.9. Análisis molecular de variantes de secuencia del gen NTRK3 en pacientes HSCR

Se han analizado un total de 3 SNPs, distribuidos a lo largo del gen *NTRK3* en 137 pacientes HSCR esporádicos y sus respectivos padres, con el fin de evaluarlos como posibles factores de susceptibilidad para el desarrollo de esta patología. Estas variantes se seleccionaron por estar anotadas como TagSNPs en la base de datos HapMap y ser, por lo tanto, variantes que definen haplotipo en dichos genes (<http://www.hapmap.org/whatishapmap.html>).

Para la genotipación de los SNPs empleamos la tecnología Taqman. Las variantes evaluadas y las referencias de los ensayos diseñados y suministrados por Applied Biosystem se recogen en la Tabla C.7.

Tabla C.7 Variantes de secuencia de *NTRK3* evaluadas como factores de susceptibilidad para HSCR

Gen	SNP	bd SNP ID	Applied Biosystems ID
NTRK3	c.464+9369A>G	rs7179806	C__29313802_10
	c.1585+11842T>G	rs4887361	C__32379358_10
	A496A	rs2229910	C__15884895_10

Con los resultados de la genotipación de los polimorfismos, se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas para los grupos de pacientes y controles. También se trazaron los haplotipos que comprendían dichos polimorfismos a partir del análisis de segregación sobre los genotipos de los pacientes y sus padres. Para el estudio de casos y controles comparamos las distribuciones alélicas, genotípicas y haplotípicas entre pacientes y controles aplicando el test estadístico χ^2 de Pearson o el test de Fisher con dos colas. TDT a partir de los datos de los pacientes y sus padres, tanto para el análisis de distribución alélica como haplotípica.

C.2.10. Rastreo mutacional de los genes EDNRB y EDN3 en la cohorte HSCR y DNI B. Caracterización molecular de los cambios identificados

Nos planteamos realizar el rastreo mutacional de la secuencia codificante de los genes *EDNRB* y *EDN3* en pacientes HSCR con el fin de identificar nuevas mutaciones asociadas a la enfermedad y reportar la incidencia de éstas en población española. Para ello utilizamos 196 pacientes HSCR, de los cuales, 176 fueron esporádicos, y los restantes 20 familiares, pertenecientes a 12 familias distintas.

De la misma manera realizamos este rastreo en 24 pacientes DNI B para evaluar la posible implicación de *EDNRB* y *EDN3* en la aparición de esta patología.

Mediante la técnica de dHPLC se analizó la región codificante completa, las uniones intrón-exón y las regiones intrónicas flanqueantes para ambos genes. Las reacciones de PCR se realizaron de forma individual utilizando oligonucleótidos diseñados con el programa Primer3. Se diseñó una pareja de cebadores para el rastreo de un exón específico de la isoforma *EDNRB* Δ 3 (Tsutsumi et al., 1999), isoforma que no había sido evaluada previamente en el contexto de HSCR. Las condiciones químicas empleadas fueron las generales, con las siguientes excepciones:

- Exón 5'UTR *EDNRB*, con 2mM de Cloruro Magnésico y 0,7 μ L de DMSO.
- Exón 1A *EDNRB*, con 2mM de Cloruro Magnésico y 0,5 μ L de DMSO.
- Exón 1B *EDNRB*, con 3mM de Cloruro Magnésico.
- Exón 4 *EDNRB*, con 2,5mM de Cloruro Magnésico.
- Exón 5 *EDNRB*, con 2mM de Cloruro Magnésico.
- Exón 6 *EDNRB*, con 3mM de Cloruro Magnésico.

- Exón 7 *EDNRB*, con 2mM de Cloruro Magnésico.
- Exón 1 *EDN3*, con 2mM de Cloruro Magnésico y 1,2μL de DMSO.
- Exón 2 *EDN3*, con 0,8μL de DMSO.

El programa general de amplificación de los fragmentos es: (95°-5')->[(95°-30')->(TaH°-30')->(72°-30')]x35->(72°-7').

La tabla C.8 muestra la secuencia de los cebadores utilizados, la temperatura de hibridación específica para cada fragmento (TaH), el tamaño de los fragmentos amplificados (pb), la temperatura del horno del sistema WAVE DNA Fragment Analysis (Tª dHPLC) y el porcentaje de Tampón B de la fase móvil (% Tampón B).

Tabla C.8 Cebadores y condiciones de amplificación y dHPLC de los exones de *EDNRB* y *EDN3*

Gen	Exón	Cebadores	TaH	pb	Tª HPLC	% Tampón B
<i>EDNRB</i>	5'UTR	5' TCGGTATCCGAGGAATTTTG 3' CTCAAATGGAGTGGGCAAGT	61	345	58.3 / 61.8 / 64	55.9
	1*	5' GGGTTCATTTGAAGAGCGTAG 3' AACCGAAGCCCCAGAATAAG	64	470	58.5 / 62.9	58.2
	1A	5' AGCTGACCCAAGTGTCTGT 3' CACAAGGCAGGACACAACC	60	428	63.5 / 65.2	57.5
	1B	5' ATGACGCCACCCACTAAGAC 3' TTCTCATCTCCCCGTCTCC	56	418	60.4 / 63.2	57.4
	2	5' AACCCCTAACAGAGCTTCG 3' GCTGGCATACTTAGTTTTATTGAA	55	254	53.8 / 60.3	53.2
	3	5' TTGTATTTAAGCTGGCATACTT 3' GGGGAACAGGGGAAAAATAG	55	320	53.1 / 56.7 / 58	55.3
	4	5' TGTTCAAGTAAGTGTGGCCTGA 3' CAAGAAAAAGGAAATATGCTCTGG	59	432	53 / 55.3	57.6
	5	5' TGCTATGAGTAAAATGAGCCATC 3' AAGATCGATGGAAACACTTCTGA	57	254	55.8 / 56.3 / 60	53.2
	6	5' TTTCTTACAAAAGCACAGAAGC 3' TTTTGAAAGCTTATTTGAGCCATA	58	257	56.1 / 57	53.3
	7	5' AAGGGCCCAAGAACTCCTAA 3' TTTGTTTTGGCAAATGTTTCA	55	328	54 / 57.2 / 58	55.5
<i>EDN3</i>	1	5' GGTGCGCCTGTGAGTGTG 3' CGGGCTTTTCTGGCTTCT	57	395	65.8 / 66.4	57
	2	5' CAGTCCAGCCCCTCTGG 3' CCCTGGGTCCTTTTGTGTG	65	483	61.2 / 63 / 65	58.3
	3	5' CCCCCTCCTCAGGTGTTT 3' GCTGGGGTGGAGTGAGGT	64	403	61 / 62.5	57.1
	4	5' TCTCGCTCCACACCCTTG 3' TCAGCACCTCCTTTCTCTGG	55	396	58.7 / 60.5	57
	5	5' AATTTGACACCGAAAAACCA 3' CAGAGCTACAAGGGATGCAAG	55	396	57.9 / 59.5	57
	3'UTR	5' AGTTCCAATCAGGGAACAGG 3' TGTAAAGTGGGGACTCTTTGG	55	407	55.1 / 57.5	57.2

Aquellas muestras que presentaron un perfil distinto por dHPLC se analizaron mediante secuenciación directa bidireccional y se llevó a cabo el alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas con la secuencia de referencia de *EDNRB* (RefSeq NM_000115) y *EDN3* (RefSeq NM_207032). Una vez caracterizados los cambios de secuencia, se analizó su presencia en los familiares mediante análisis por dHPLC, así como en un grupo constituido por 150 controles sanos.

C.2.11. Análisis molecular de variantes de secuencia de los genes de *EDNRB* y *EDN3* en pacientes DNI B y en pacientes HSCR

Se han analizado un total de 6 SNPs, distribuidos por los genes *EDNRB* y *EDN3* en 23 pacientes DNI B, 30 pacientes DNI B+HSCR, 137 pacientes HSCR esporádicos y sus respectivos padres, con el fin de evaluarlos como posibles factores de susceptibilidad para el desarrollo de esta patología. También se incluyeron en el estudio 100 controles sanos. Se seleccionaron 3 SNPs por cada uno de los genes, *EDNRB*: rs302711, rs5349, rs4885491; y *EDN3*: rs6064764, rs171969, rs260741. Estas variantes se seleccionaron por estar anotadas como TagSNPs en la base de datos HapMap.

Para la genotipación de los SNPs empleamos la tecnología Taqman. Las variantes evaluadas y las referencias de los ensayos diseñados y suministrados por Applied Biosystem se recogen en la Tabla C.9.

Tabla C.9 Variantes de secuencia de *EDNRB* y *EDN3* evaluadas como factores de susceptibilidad para HSCR

Gen	SNP	bd SNP ID	Applied Biosystems ID
EDNRB	c.484-4125C>T	rs3027111	C__15769865_10
	I187I	rs5349	C__11706896_10
	c.*1985 G>A	rs4885491	C__30504349_10
EDN3	c.365+7474	rs6064764	C__30590919_10
	c.366-3935C>G	rs171969	C__2506280_1_
	c*236C>G	rs260741	C__2506292_10

Con los resultados de la genotipación de los polimorfismos, se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas para los grupos de pacientes DNI B, DNI B+HSCR y para controles. También se trazaron los haplotipos que comprendían dichos polimorfismos a partir del análisis de segregación sobre los genotipos de los

pacientes y sus padres. Para el estudio de casos y controles comparamos las distribuciones alélicas, genotípicas y haplotípicas entre cada grupo de pacientes y controles aplicando el test estadístico χ^2 de Pearson o el test de Fisher con dos colas. Aplicamos TDT a partir de los datos de los pacientes y sus padres, tanto para el análisis de distribución alélica como haplotípica.

**C.2.12. Rastreo mutacional del gen *SOX10* en la cohorte HSCR.
Caracterización molecular de los cambios identificados**

La asociación de mutaciones en el gen *SOX10* con la aparición de formas sindrómicas de HSCR es bien conocida y ha sido documentada en numerosas ocasiones. Sin embargo no se han encontrado mutaciones en este gen responsables de los casos no sindrómicos de esta enfermedad, a pesar del rastreo llevado a cabo en una cohorte de pacientes de origen francés (Pingault et al., 1998). Con el objetivo de evaluar la implicación de *SOX10* en HSCR aislado se realizó el rastreo mutacional de la región codificante de este gen en 195 pacientes HSCR no sindrómico. También se incluyó en el presente estudio un paciente con WS4 o Síndrome de Shah-Waardenburg, que se caracteriza por la presencia de HSCR junto a otros rasgos característicos, como sordera y alteraciones pigmentarias en piel, pelo y ojos. De estos pacientes, 176 eran esporádicos, y los restantes 20 familiares, pertenecientes a 13 familias distintas.

Mediante la técnica de dHPLC se analizó la región codificante, las uniones intrón-exón y las regiones intrónicas flanqueantes de *SOX10*. Las reacciones de PCR se realizaron de forma individual utilizando oligonucleótidos diseñados con el programa Primer3. Las condiciones químicas empleadas son la general que se explica en el apartado C.2.1.3 con las siguientes excepciones:

- Exón 1, con 3,5mM de Cloruro Magnésico y 0,5 μ L de DMSO.
- Exón 2A, con 2mM de Cloruro Magnésico y 2 μ L de DMSO.
- Exón 2B, con 2,5mM de Cloruro Magnésico y 1,2 μ L de DMSO.

El programa general de amplificación de los fragmentos es: (95 $^{\circ}$ -5')->[(95 $^{\circ}$ -30')->(TaH $^{\circ}$ -TiH')->(72 $^{\circ}$ -30')]x35->(72 $^{\circ}$ -7').

La tabla C.10 muestra la secuencia de los cebadores utilizados, la temperatura de hibridación específica (TaH), el tiempo de hibridación específico (TiH), el tamaño de los fragmentos amplificados (pb), la temperatura del horno del

sistema WAVE DNA Fragment Analysis (T^a dHPLC) y el porcentaje de Tampón B de la fase móvil (% Tampón B).

Tabla C.10 Cebadores y condiciones de amplificación y dHPLC de los exones de *SOX10*

Exón	Cebadores	TaH	TiH	pb	T ^a HPLC	% Tampón B
1	5' CTCCCCCTCCTCCTTCC 3' AACGGGGTTTAGAGGAGAGC	67.5	15	375	64.2	56.6
2A	5' GTGCCACGTCCTGTCTC 3' CTGAGCACCTGGCTGACG	63	60	400	65 / 67.2	57
2B	5' AAGGTCAAGAAGGAGCAGCA 3' AGACAGTCCCGCTCTGAGGT	65	15	373	66.1	56.5
3	5' GAGTGCTCTGGCATTACG 3' CACCCTCAGCTCTGTCATCA	65	15	358	64 / 65.6	56.2
4A	5' CACCTGCCTCTAACCTGCTT 3' CATTGGGCGGCAGGTACTION	65	30	275	61.4 / 64.2	53.9
4B	5' TTTGATGTGGCTGAGTTGGA 3' GCCGAGTAGAGGCCAGAG	65	30	398	62.2 / 63.2 / 64.5	57
4C	5' TCAGCCCTCAGGACCCTATT 3' GGTCATCAGGGCAGTGAGC	65	15	350	64.2	56

Aquellas muestras que presentaron un perfil aberrante por dHPLC se analizaron mediante secuenciación directa bidireccional y se llevó a cabo el alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas con la secuencia de referencia de *SOX10* (RefSeq NM_006941). Una vez caracterizados los cambios de secuencia, se analizó su presencia en los familiares mediante análisis por dHPLC, así como en un grupo constituido por 150 controles sanos.

C.2.13. Estudio funcional de las mutaciones en el gen *SOX10*

En el rastreo de gen *SOX10* detectamos dos mutaciones (c.112_131del y c.153del) en dos pacientes HSCR, uno de ellos en asociación con SW4. Para evaluar el impacto de ambas mutaciones en la funcionalidad de la proteína llevamos a cabo dos experimentos independientes. Por una parte comprobamos la localización celular de ambas proteínas mutantes por inmunodetección y, por otra, su capacidad de transactivación mediante un ensayo de activación del gen reportero de la luciferasa.

C.2.13.1. Clones utilizados y mutagénesis dirigida.

Para la expresión de la proteína SOX10 se utilizaron los plásmidos de expresión pECE y pCMV-Myc, que permiten su expansión en cultivos bacterianos y su expresión en células de mamíferos en cultivo. El clon pECE-SOX fue facilitado por Nadège Bondurand (Laboratorio Dra. Bondurand, Hôpital Henri Mondor, Creteil, Francia). Este clon procede de la subclonación, en el sitio *EcoRI*, del cDNA de *SOX10* humano (GeneBank AJ001183) de pCMV-HuSOX10 (Bondurand et al., 2000). Alternativamente, y debido a la naturaleza molecular de las mutaciones detectadas, decidimos generar una proteína recombinante con la unión de Myc al extremo 5' de SOX10. De esta manera pudimos detectar la proteína mediante unión a anticuerpo independientemente de la secuencia de la proteína mutante. Para generar el clon pCMVMyc-SOX10, se amplificó el cDNA de *SOX10* humano (GeneBank AJ001183) por PCR utilizando los cebadores 5'-TTGCTAAGAATTCATGGCGG-AGGAGCAGGATATC-3' y 5'-AATAATGCGGCCGCCTTCTCCTCTGTCCAGCCTG-3' y pECE-SOX10 como molde. El producto de PCR fue posteriormente clonado en el plásmido pCMV-Myc (Clontech) tras digestión con *EcoRI* y *NotI*.

Los vectores necesarios para el ensayo de activación del gen de la luciferasa, pECE-SOX10-E189X, pECE-PAX3, pECE-EGR2, pGL3-MITFdel1718, y pGL3-Cx32 fueron facilitados por la Dra. Bondurand. El sistema de expresión de luciferasa consiste en la clonación de la región promotora del gen MITF y Cx32 en el plásmido pGL3-basic luciferase reporter vector (Promega) (Bondurand et al., 2000, 2001).

Se introdujeron las mutaciones c.112_131del y c.153del en los plásmidos pECE-SOX y pCMVMyc-SOX, de manera independiente, por mutagénesis dirigida utilizando las siguientes parejas de cebadores: c.112_131del, 5'-GGCCCGACGGCGGCGGCCAGCCCGGGGCCAGGCG-3', 5'-CGCCTGGCCCCGGGCTGGCCGCCGCGTCGGGCC-3'; c.152del, 5'-GCCAGGCGAGCTGGCAAGGTCAAG-3', 5'-CTTGACCTTGCCAGCTCGCCTGGC-3'. Las condiciones de PCR fueron las recomendadas por el fabricante, con las siguientes excepciones: 5%DMSO, 40ng DNA molde y 400ng de cada cebador.

C.2.13.2. Localización celular de las proteínas SOX10 silvestre y mutantes

Se comprobó el impacto de ambas mutaciones en la localización celular de la proteína, mediante inmunodetección. Para la inmunodetección de SOX10 se

expresaron en células en cultivo ambas proteínas mutantes, así como la proteína silvestre y la proteína mutante E189X como control. Alternativamente realizamos la transfección con la construcción de la proteína recombinante Myc-SOX10 tanto silvestre como con ambas mutaciones.

Los anticuerpos utilizados en el presente trabajo y sus diluciones fueron las siguientes: Anticuerpos primarios, anti-SOX10 policlonal SOX10-N20 (goat; Santa Cruz) 1:50; anti-Myc monoclonal c-Myc (mouse; BD Biosciences) 1:100. Anticuerpos secundarios policlonales, anti-goat AlexaFluor 568 (Invitrogen) 1:500, anti-mouse AlexaFluor 568 (Molecular Probes) 1:100.

C.2.13.3. Ensayo de la capacidad de transactivación de los mutantes de SOX10

Se comprobó la capacidad de las dos mutaciones encontradas en SOX10, de promover la transcripción mediante un ensayo de activación del gen reportero de la luciferasa. Para ello se utilizaron los promotores de *MITF* y *Cx32*, que contienen sitios de unión a SOX10 de forma monomérica o dimérica respectivamente (Bondurand et al., 2000, 2001). Se contranfectaron ambos promotores junto con SOX10 silvestre, c.112_131del SOX10 o c.153del SOX10, solos o en combinación con sus cofactores (PAX3 o EGR2, respectivamente). También se realizó la contrasfección de ambos promotores junto con PAX3 o EGR2 solos o en combinación con E189X SOX10 como controles. El ensayo se realizó en tres experimentos independientes, replicando cada una de las condiciones, para calcular el promedio y la desviación típica de la señal luciferasa.

También se realizó un ensayo de competición entre los distintos mutantes de SOX10 y la proteína silvestre. Para ello se transfectaron cantidades crecientes (0.150, 0.300 y 0.600 μg) de los distintos mutantes del plásmido pECE-SOX10 (E189X, c.112_131del SOX10 o c.153del) con una cantidad fija del plásmido silvestre (0,150 μg), junto con el gen reportero de la luciferasa bajo la acción del promotor de *Cx32*. El ensayo también se realizó en tres experimentos independientes, replicando cada una de las condiciones.

C.2.14. Análisis molecular de variantes de secuencia del gen *SOX10* en pacientes HSCR

Se han analizado un total de 3 SNPs, distribuidos a lo largo del gen *SOX10* en 137 pacientes HSCR esporádicos y sus respectivos padres, con el fin de evaluarlos como posibles factores de susceptibilidad para el desarrollo de esta patología. Estas variantes se seleccionaron por estar anotadas como TagSNPs en la base de datos HapMap.

Para la genotipación de los SNPs empleamos la tecnología Taqman. Las variantes evaluadas y las referencias de los ensayos diseñados y suministrados por Applied Biosystem se recogen en la Tabla C.11.

Tabla C.11 Variantes de secuencia de *SOX10* evaluadas como factores de susceptibilidad para HSCR

Gen	SNP	bd SNP ID	Applied Biosystems ID
SOX10	c.428+1517 C>T	rs3026648	C__15767892_10
	c.84-1697 G>C	rs3026645	C__15767880_10
	H309H T>C	rs139884	C__2487416_20

Con los resultados de la genotipación de los polimorfismos, se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas para los grupos de pacientes y controles. También se trazaron los haplotipos que comprendían dichos polimorfismos a partir del análisis de segregación sobre los genotipos de los pacientes y sus padres. Para el estudio de casos y controles comparamos las distribuciones alélicas, genotípicas y haplotípicas entre pacientes y controles aplicando el test estadístico χ^2 de Pearson o el test de Fisher con dos colas. Aplicamos TDT a partir de los datos de los pacientes y sus padres, tanto para el análisis de distribución alélica como haplotípica.

C.2.15. Rastreo mutacional de los genes *SEMA3A* y *SEMA3D* en la cohorte HSCR. Caracterización molecular de los cambios identificados

Los resultados preliminares obtenidos en el seno del Consorcio internacional para la enfermedad de Hirschsprung, al cual pertenecemos, en el estudio de asociación realizado en 233 pacientes S-HSCR esporádico y sus padres, mostraron asociación de la región 7q21.11 (en la que se encuentran los genes *SEMA3A* y *SEMA3D*) con la enfermedad (Arnold et al., 2009b). Por este motivo nos

planteamos el rastreo mutacional de la región codificante de ambos genes con el fin de evaluar su posible implicación en HSCR. Para ello utilizamos 196 pacientes HSCR, de los cuales, 176 eran esporádicos, y los restantes 20 familiares, pertenecientes a 13 familias distintas.

Tabla C.42 Cebadores y condiciones de amplificación y dHPLC de los exones de *SEMA3A*

Exón	Cebadores	TaH	pb	Tª HPLC	% Tampón B
1	5' GTGTTGCCATGAGGTCTTGA 3' GTTTGATGATTTGGGGTTGG	61	356	55,9-57,6	56.2
2	5' AAATGCACACATTTTGGTTCC 3' TTTTGATTTATTGCATCCATTG	55	496	54,2-56,3	58.5
3	5' ACTTCAGTTGCCCAATGTC 3' TTCTAACCCCTTCCCCACAC	55	274	56.1	53.9
4	5' AGCATGCCTAGCACCTAGA 3' TGAACCACAAGCAAATAAACTG	55	293	57.5	54.5
5	5' CACTTGATTTATTTTGGCATCTC 3' AGGCCATTTTAAGATCCTATTCC	55	453	54.3	57.9
6	5' TGATGCAGAGAGCATTTTCAG 3' CCATCATGAAGTCACCACCA	57	388	56,6-58,6	56.8
7	5' ATCCAGTAACGCATCTGCAA 3' GGGAAAATGACATCCTTCTCAG	57	471	56	58.2
8	5' GAACGATTCGACCACAAATG 3' TTTTATGGAATGGCAAAGTCTG	57	359	58	56.2
9	5' AATGACTTTGGAGGGCACAG 3' TCACCCAAGAGTACACAACAGC	61	408	54.7	57.2
10	5' GAAAAATCCCAAACATTATTGC 3' TCATGGAAAATCTTTGTCTTGC	50	438	56-58	57.7
11	5' CCATACCTGGCCTGCACTAC 3' TTCAACTGCACAGAGGGTTG	57	450	56.3	57.9
12	5' GGAAGACCGATATCAAAGGTTT 3' GGGGGAAAGACGTACAACCTG	53	258	57.5	53.3
13	5' CATTGCTTCTTGTGGACACTG 3' TCAAAAACATGAGGGCAATG	50	359	57	56.2
14	5' CCATTTTAAACTGCCATCTTGTC 3' TTCAAACCTTGAATCAGATAGGA	50	398	56,3-60,3	57
15	5' TGGATCTTGTTTCCCATTTTG 3' GCCTGGTCTTAGCAGGTTGA	53	329	54	55.5
16	5' TCCAACCTGGCAATAACTTGTC 3' TGAGCGATTGATTGGTTTCAG	53	378	57.9	56.6
17A	5' CAGACACGGAGTTTCAGAGC 3' AGATTGGGGTGGTTGATGAG	53	358	56,8-58,3	56.2
17B	5' CCAATAGCATGACACCTAGCC 3' AGCTGAATTTCCACCATTG	57	371	58.9	56.5

Mediante la técnica de dHPLC se analizó la región codificante completa, las uniones intrón-exón y las regiones intrónicas flanqueantes de los genes *SEMA3A* y *SEMA3D*. Las reacciones de PCR se realizaron de forma individual utilizando

oligonucleótidos previamente diseñados con el programa Prime3. Las condiciones químicas empleadas fueron las generales, con las siguientes excepciones:

- Exón 6 *SEMA3A*, con 2mM de Cloruro Magnésico.
- Exón 8 *SEMA3A*, con 2mM de Cloruro Magnésico.
- Exón 2 *SEMA3D*, con 3mM de Cloruro.
- Exón 7 *SEMA3D*, con 2,2mM de Cloruro Magnésico y 0,25 μ M de cada cebador.
- Exón 8 *SEMA3D*, con 3mM de Cloruro Magnésico.
- Exón 10 *SEMA3D*, con 0,4 μ L de DMSO.
- Exón 11 *SEMA3D*, con 3mM de Cloruro Magnésico.
- Exón 15 *SEMA3D*, con 3mM de Cloruro Magnésico.
- Exón 16 *SEMA3D*, con 2,5mM de Cloruro Magnésico y 0,4 μ L de DMSO.

El programa general de amplificación de los fragmentos es: (95 $^{\circ}$ -5')->[(95 $^{\circ}$ -30')->(TaH $^{\circ}$ -TiH')->(72 $^{\circ}$ -30')]x35->(72 $^{\circ}$ -7').

Las tablas C.12 y C.13 muestran la secuencia de los cebadores utilizados, la temperatura de hibridación específica para cada fragmento (TaH), el tiempo de hibridación específico de cada fragmento (TiH), el tamaño de los fragmentos amplificados (pb), la temperatura del horno del sistema WAVE DNA Fragment Analysis (T^a dHPLC) y el porcentaje de Tampón B de la fase móvil (% Tampón B).

Aquellas muestras que presentaron un perfil aberrante por dHPLC se analizaron mediante secuenciación directa bidireccional y se llevó a cabo el alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas con la secuencia de referencia de *SEMA3A* (RefSeq NM_006080) y *SEMA3D* (RefSeq NM_152754). Una vez caracterizados los cambios de secuencia, se analizó su presencia en los familiares mediante análisis por dHPLC, así como en un grupo constituido por 150 controles sanos.

Tabla C.53 Cebadores y condiciones de amplificación y dHPLC de los exones de *SEMA3D*

Exón	Cebadores	TaH	TiH	pb	T ^a HPLC	% Tampón B
1	5' TCTTCCTGTGTCAGTTTGCTG	63	60	365	54.3 / 55.8	56.4
	3' TGATGCCAAAACATTTACAG					
2	5' TTGGCCCTTTTATGCTGTATG	59	30	478	52.5 / 56.1	58.3
	3' AAGCAAAACAAAACGGGAGA					
3	5' CCAGAAGATTCACAAAAATGGA	60	30	458	55.3 / 56,4	58
	3' CATGGCTTTTGGTAAGATAGAGA					
4	5' TGCCTCGTTTGCTACAACAG	60	15	398	54.6 / 56	57
	3' TGCCTGGCCATATATGTTTC					
5	5' CAAGGGAGACCAAAACATGG	62	15	479	53.8 / 56.7	58.3
	3' GCTGTGGCCTTCCTTTAGTG					
6	5' CATCTTTGGTGTGTCATGCTGTG	62	30	376	57.7	56.6
	3' GGTTTTGGAGATTTTCTTAGTGG					
7	5' CATTCCCACATCTGGCTTA	60	60	483	54.6 / 56.1	58.3
	3' TTGGCTTAAACCTTGCCAAA					
8	5' GGACTCAATATCTGGGTTCAAGTG	59	30	368	55.3 / 57.7	56.4
	3' CTCCTGTAAGGTTTGCTCAGG					
9	5' CCAATTGGAACTACCTTGAG	61	15	375	53.3 / 54.6	56.6
	3' ACAAACGCAGGGACAAAAAG					
10	5' AAATTTGTCCACAGCACCTG	60	30	393	57.6	56.9
	3' TTCAATGAAGGATGAAAATGC					
11	5' TTCCATATTGACTCTGTTGTCCA	59	30	492	55.7 / 57.4	58.5
	3' TTTTAAGAAATGCTGACAAGGTT					
12	5' AAGGCATTTAAAGAGAAGTGAGG	53	15	268	57.1 / 58.2	53.7
	3' AAGGGTGCCCTATAACAAGC					
13	5' ATTTTGAAGAAAATAGCAAACA	53	15	382	54.6	56.7
	3' TCAATTTCTCCCAAGGCAAG					
14	5' TGTTTACAATGGGCAGGACA	62	15	476	58	58.3
	3' GCATCTGTTTTACCCTCCTTC					
15	5' GCATAGTACTGCATCTGCCACT	62	15	292	59.2	54.5
	3' CACATGCATTACACAAAATGGAG					
16	5' ATTCTTTCCCATGGCATCT	60	30	427	56.2 / 57.3	57.5
	3' CGAATACATTTGTGTGAAGTTGG					
17A	5' TGTAGCCTGTTTTCATTTGCTC	59	30	394	56.9 / 58	56.9
	3' TTCTCTGTCTCCGCTTCTCC					
17B	5' AAATACCCAGAGGGCAGAGC	55	30	369	59.1 / 60.8	56.4
	3' CAAAACCTCCATGGGAAGCAT					

C.2.16. Análisis molecular de variantes de secuencia de los genes *SEMA3A* y *SEMA3D* en pacientes HSCR

Se han analizado un total de 3 SNPs, distribuidos a lo largo de los genes *SEMA3A* y *SEMA3D* en 137 pacientes HSCR esporádicos y sus respectivos padres, con el fin de evaluarlos como posibles factores de susceptibilidad para el desarrollo de esta patología. Estas variantes se seleccionaron por estar anotadas como TagSNPs en la base de datos HapMap.

Para la genotipación de los SNPs empleamos la tecnología Taqman. Las variantes evaluadas y las referencias de los ensayos diseñados y suministrados por Applied Biosystem se recogen en la Tabla C.14.

Tabla C.64 Variantes de secuencia de *SEMA3A* y *SEMA3D* evaluadas como factores de susceptibilidad para HSCR

Gen	SNP	bd SNP ID	Applied Biosystems ID
SEMA3A	c.112+15079G>A	rs17302032	C__33665415_10
	c.667+8467G>A	rs1404473	C__8314410_10
	T717T	rs797821	C__2657343_10
SEMA3D	c.151+1878C>A	rs173647278	C__2635889_10
	c.495+1644C>A	rs12673176	C__2635877_10
	c.1908+1334G>A	rs2286184	C__2635842_10

Con los resultados de la genotipación de los polimorfismos, se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas para los grupos de pacientes y controles. También se trazaron los haplotipos que comprendían dichos polimorfismos a partir del análisis de segregación sobre los genotipos de los pacientes y sus padres. Para el estudio de casos y controles comparamos las distribuciones alélicas, genotípicas y haplotípicas entre pacientes y controles aplicando el test estadístico χ^2 de Pearson o el test de Fisher con dos colas. Asimismo aplicamos e TDT a partir de los datos de los pacientes y sus padres, tanto para el análisis de distribución alélica como haplotípica.

C.2.17. Rastreo de deleciones/duplicaciones en los genes *SOX10*, *EDNRB*, *Gfr α 1*, *NRTN* y *PHOX2B*

En nuestro grupo habíamos evaluado con anterioridad la implicación de CNVs de varios genes en HSCR. Para ello se utilizó el kit comercial MLPA-Hirschsprung test kit P169 (MRC-Holland), que contiene 41 sondas para detectar alteraciones en el número de copias de los exones de 4 genes asociados a HSCR (*RET*, *GDNF*, *EDN3* y *ZFHX1B*). Para completar este estudio sobre la implicación de los CNVs en HSCR, nos planteamos la evaluación de otros genes asociados a HSCR (*SOX10*, *EDNRB*, *Gfr α 1* y *NRTM*) que no habían sido incluidos en el kit comercial. La selección de estos genes se realizó en base a su implicación en la formación del SNE y la asociación de mutaciones a la aparición de HSCR tanto aislado como sindrómico (Tam y García-Barceló, 2009). Más específicamente, se seleccionó *EDNRB*, el segundo gen más importante en HSCR, ya que tiene una incidencia de

mutaciones en HSCR muy superior la de *EDN3*, *GDNF* o *ZFH1B* (Kusafuka et al., 1996), incluidos en el kit comercial. Ya que *RET* y *GDNF* están también incluidos en el kit comercial de MLPA para HSCR, decidimos incluir a *NRTN* y *GFR α 1* debido a su participación en la misma ruta de señalización y a que se habían asociado con anterioridad a HSCR (Doray et al., 1998; Borrego et al., 2003b). Además, y debido a la implicación de deleciones en *SOX10* y *PHOX2B* en patologías humanas y síndromes que con frecuencia incluyen a HSCR, tales como WS4 y CCHS respectivamente (Bondurand et al., 2007; Amiel et al., 2008), también decidimos incluir este gen en el presente trabajo.

Las alteraciones en el número de copias de los genes *EDNRB*, *Gfr α 1*, *NRTN* y *PHOX2B* se analizaron mediante MLPA, siguiendo el protocolo del apartado C.2.1.8. Para ello se diseñaron sondas específicas para todos los exones de estos genes siguiendo las recomendaciones de MRC Holland (Schouten et al., 2007). También se diseñaron sondas específicas de cromosomas controles en genes que no han sido asociados a HSCR con anterioridad, y en los que no se han descrito CNVs, para usarlas como sondas control. Dichas sondas debieron tener una dosis génica normal en el paciente para dar el resultado como válido. Los oligonucleótidos-sonda fueron suministrados por Sigma-Aldrich y su secuencia puede encontrarse en la tabla C.15.

Además, como control positivo de delectión se incluyó en el estudio un paciente portador de una delectión en *GFRA1* en heterocigosis, que había sido previamente caracterizada por southern blot y pérdida de heterocigosidad (Borrego et al., 2003b). Este individuo además no sólo nos sirvió como control positivo, sino también para confirmar la validez de nuestro método para la detección de deleciones en los genes analizados.

Tabla C.15 Sondas empleadas en el rastreo de deleciones/duplicaciones mediante MLPA de los genes *EDNRB*, *NRTN*, *GFR α 1* y *PHOX2B*

	Exón		Oligo Sonda	pb
Mix 1	EDNRBex5	OSD	GTGGCCAAAACCGTCTTTGCGCTG OSI GTCCTTGTCTTTGCCCTCTGCTGGCTT	93
	GFR α 1ex4	OSD	GGAGGATTCCCATATGAACCGTTAACAG OSI CAGATTGTCAGATATATTCCGGGTGGTC	100
	GFR α 1ex9	OSD	GAGGAAGTTCAATGGCTCCGATGTGACCGTGTGGCAG OSI CCAGCCTTCCCAGTACAGACCACCTGCTC	108
	EDNRBex1	OSD	TCTACAAGAACAAGTGCATGCGAAACG OSI GTCCCAATATCTTGATCGCCAGCTTGCCATCAATCGCCATTCTGA	112
	GFR α 1ex2	OSD	CAACGACTAGAGAGGCCACCATGTTCTGCGCACC OSI GATGGAGCTGAACCTTGGGCGGCCAGTACTGCCTTGAAGGTCTCACGGCT	127
	GFR α 1ex5	OSD	CAGGCACTTGAGGATTTCCAGGTAGGACCCTCTAGTTGCAG OSI GAAAACAAGGTGAGGCTGCCACTGGTTCTATAATACAATGGAGACG	131
	GFR α 1ex1	OSD	CCTAGCGCAGATAAAGTGAAGCCGAAAG OSI GGAAGGAGGGGGCGGGGACACCATTTGCTATAGACGTAGCTGTGAGTACCAACCGAATGACAATC	135
	NRTNex2	OSD	CGAATTAGAGATTTAACTTCTCCCTCGCAGACCGTGCACCTC OSI CTGCAGGGGGCCCGGATGCGATGGAGCTGTTAATACGACTCACTATAGGAGTA	139
Mix 2	GFR α 1ex9.3	OSD	GGTTCAGGCAACACAGAGACAAAG OSI CATCTTCAGGGGGAGCAGGTAGAGG	91
	GFR α 1ex3	OSD	GGAGAAGAAGTGCCTGCGCATTTACTGGAG OSI CATGTACCAGAGCCTGCAGGGTAC	96
	EDNRBex1*	OSD	TCTGGCGGTGATTGATGGGAAG OSI GGATGAATGAATAAAAGTACTTGTCTGATGGCACCC	100
	GFR α 1ex6	OSD	GGAACTGCCTGGATGCAGCGAAGGCCTG OSI AACCTCGACGACATTTGCAAGAAGTACCCGGTAT	108
	EDNRBex4	OSD	TGGCATGCAGATTGCTTTAAATGATCAC OSI CTAAGCAGGTAAGAAAATACAAATATTGAGAGGGACACGGCC	113
	EDNRBex6	OSD	CGATGCTATTCACATAACCCAATTGCTCTGTATTTGGTGAG OSI GTGAGCAAAGATTCAAAAAGTCTCTTGGAGGAAGTCGAGGAGTAC	130
	GFR α 1ex11	OSD	CCAACTGTGCGCGTGTGATAAGGTTCCGTTCCCGCCACTGCTGGTCTGGTGGTAACC OSI GCTCTGTCCACCCTATTATCTTTAACAGAAACA	136
	GFR α 1ex9.2	OSD	CCAATTGACCACCTATGGGCCAGTCC OSI CCAGTCAGGTCAAAGAAGAGGGTTTACGTAGACCTCAGTTCAGTCTGCTGTTGCTCTATACTCAC	140
Mix 3	EDNRBex2	OSD	GGCAGAGGACTGGCCATTTGGAG OSI CTGAGATGTGTAAGCTGGTGCCTTT	90
	GFR α 1ex7	OSD	TGCCAGCCAGAGTCAAGGTCTGTGAG OSI CAGCTGTCTAAAGGAAAAGTACGCTGA	95
	EDNRBex7	OSD	GCAGTCGTGCTTAAAGTTCAAAG OSI CTAATGATCACGGATATGACAACCTTTGCTGAGTG	99
	GFR α 1ex9.4	OSD	GTGTCCACTTGTGTTTACGCAG OSI CTGACTTTACTGGACATTATTCAGACCAGTGGTTGGGTGCGCTCG	108
	GFR α 1ex10	OSD	GCTGAAATCCAATGTGTGCGGCAATACACAC OSI CTCTGTATTTCCAATGTAAGTATGGGCGTGGACTCGCAT	112
	EDNRBex3	OSD	CGACAGCAGTAGAAATGTTTTGATTTGGGTG OSI GTCTCTGTGGTCTGGCTGTCCCTGAAGAGGTTTTGTGTACGGACCTAAAGTTC	128
	GFR α 1ex8	OSD	CCATACATCACCGATTCTCGCAGAAGAGCCTCAGTGTGGCCCATGGTGTGACTG OSI CAGCAACAGTGGGAACGACCTAGAAGAGTGTCTG	132
	NRTNex1	OSD	CGTTCAAAGTCAAAGGCCCACTGAGTC OSI CTGGCCAGCGCCCTGTGCCGTTGGCTGACGAGAAGTACGGAATCGAATCTATAGTGACCTAT	136
Mix 4	PHOX2Bex1A	LPO	CCTCAATTCCTCTGCCTACGAGTC RPO CTGTATGGCTGGGATGGACACC	88
	PHOX2Bex1B	LPO	CCAGTGGCTTCCAGTATAACCCGATAAGGAC RPO CACTTTTGGGGCCACGTCGGCT	96
	PHOX2Bex2	LPO	CTGTCATACTCTAGTTCCTTACAAACTCTTAC RPO GGACCACGGCGCCTCAACGATGCAAGCGACAT	108
	PHOX2Bex3A	LPO	TCTTCTTTCTCCCTGCTTACCGTCTCTC RPO CTTCCGCTTGGGCCAGGTGTGGTCCAGAATTTACTAA	112
	PHOX2Bex3B	LPO	CGTCTATCTTCGCTCAAAGACCAACG RPO GTGCCAAAGCCGCTTGTGAGGAGCAGT	100
Genes de Referencia	TOR1A	OSD	GCACCGGCAAAAATTTGTCAGCAAGATCAT OSI CGCAGAGAATATTTACGAGGGTGGTCTGAAC	104
	EPO	OSD	GCCTCAGCTGTCCACTCCGAACAATCACTG OSI CTGACACTTTCCGCAAACTCTTCCGAGTCTAGATGTTCCAACAA	117
	SS18	OSD	CGACAGCATTACGAAGCACAGCAGCCACCTATGGGAATGATG OSI GGTCAGTTAACCAAGGCAATCATATGATGCGATATGC	122

Para la detección de alteraciones de la dosis génica en el gen *SOX10*, utilizamos una variación de la técnica QMF-PCR previamente publicada (Bondurand et al., 2007). Para esta técnica se incluyeron cebadores para la amplificación de 3 de los 4 exones del gen *SOX10* y para dos fragmentos externos a este gen en ambas direcciones, uno de ellos específico de una región promotora de la transcripción de *SOX10* (Enhancer E5) hacia 5' y otra específica del gen *POLF2R* hacia 3'. Además se incluyeron dos parejas de cebadores para la amplificación de dos fragmentos control, uno en el cromosoma 22 y otro en el cromosoma X.

Tabla C.76 Cebadores empleados en el rastreo de deleciones/duplicaciones en *SOX10*. Se han indicado el volumen de cada pareja de cebadores añadidos a la mezcla y el tamaño de cada fragmento

	Fragmento	Cebadores	pb	Mix
Genes de Referencia	DSCR1	5' GCGACGAGGACGCATTCCAA	238	8
		3' GTCCTTGTGCGATCACCACA		8
	F9	5' AAATGATGCTGTTACTGTCTA	214	96
		3' GAAGTTTCAGATACAGATTTTC		96
SOX10	Exón 2	5' AAGGTCAAGAAGGAGCAGCA	373	80
		3' AGACAGTCCCCTCTGAGGT		80
	Exón 3	5' GGAGTGCTCTGGCATTACAG	363	32
		3' CTTGCCCCACCTCAGCTCT		32
	Exón 4A	5' GGAAGTTCAGTGCGCCAC	286	8
		3' GCGGCAGGTAAGTGGTCCAAC		8
	Exón 4B	5' CCACACTACACCGACCAGCC	326	8
		3' GGGTGGTGGCGACAGGGC		8
Marcadores externos a SOX10	Enhancer E5	5' ACACGACGGCAGATGCTCGT	335	8
		3' CCTCGGAGCCCAGTGAATTA		8
	POLF2R	5' GATGACGTTTCTAGGTGG	309	24
		3' TGTTCTAAGGATCTGTAGG		24

Los cebadores utilizados para esta técnica fueron suministrados por Sigma-Aldrich y para homogenizar el grado de amplificación de todos los fragmentos se ajustó la cantidad de cada pareja de cebadores en el mix (Tabla C.16), más tarde se añadieron 2,5µL de mix de cebadores a cada reacción de amplificación. Para considerar el resultado de un paciente como válido, ambos fragmentos control tuvieron que tener la dosis esperada según el sexo de dicho paciente.

El rastreo de deleciones/duplicaciones se realizó mediante QMF-PCR y MLPA respectivamente, en 208 pacientes HSCR, de los cuales 188 eran esporádicos, mientras que los 20 restantes eran casos familiares pertenecientes a 13 familias distintas. También incluimos en el estudio a 100 individuos control.

D. RESULTADOS

D.1. Análisis molecular y funcional de los genes que codifican para los ligandos de RET (GDNF, NRTN, ARTN y PSPN) en pacientes HSCR

D.1.1. Ampliación del rastreo mutacional de la secuencia codificante de los genes GDNF, NRTN, ARTN y PSPN en pacientes HSCR

El papel del proto-oncogén *RET* (OMIM 164761) en HSCR convierte a los genes que codifican para sus ligandos en candidatos para el estudio de su posible implicación en el desarrollo de la enfermedad. Por ello, nuestro grupo ya había analizado la secuencia codificante de *GDNF* (OMIM 600837), *NRTN* (OMIM 602018), *ARTN* (OMIM 603886) y *PSPN* (OMIM 602921), así como todas sus uniones intrón-exón, en 106 pacientes de nuestra cohorte HSCR mediante dHPLC, con el fin de identificar variantes de secuencia que pudieran estar implicadas en la aparición del fenotipo HSCR (Ruiz-Ferrer, 2007). Como resultado de aquel estudio se identificaron 3 mutaciones en *GDNF* previamente descritas en asociación con HSCR (R93W, R143R y D150N) y dos nuevas mutaciones, una en *NRTN* (F127L) y otra en *PSPN* (R91C), siendo esta última la primera mutación en este gen asociada a la enfermedad (Tabla D.1). A la vista de los resultados obtenidos en el rastreo realizado por nuestro grupo, en el presente trabajo decidimos aumentar el número de pacientes rastreados en 111, siendo 106 de ellos esporádicos y 5 familiares.

Además de los polimorfismos previamente descritos, que ya habían sido detectados en nuestros pacientes HSCR, se observó la presencia, en heterocigosis, de 6 variantes que no habían sido detectadas con anterioridad en nuestros pacientes, todas ellas encontradas en pacientes esporádicos y que resultaron estar ausentes en población control (Tabla D.1). Dos de estas variantes se localizaron en la región correspondiente a la proteína madura de *GDNF* (A98S y P100P), mientras que otras dos se localizaron en *NRTN* (A67T y A96S) detectándose en el mismo paciente, que heredó ambas variantes de su padre. También detectamos una variante intrónica nueva localizada en el gen *PSPN* (c.150-18C>T). Por último hallamos la variante R72H en *ARTN*. De entre estos 6 cambios, 5 fueron nuevos y sólo A96S-*NRTN* se había descrito con anterioridad en asociación con HSCR (Doray et al., 1998). Todos los datos relativos al género, fenotipo y herencia de estas mutaciones, así como de las mutaciones detectadas en el primer rastreo realizado por nuestro grupo, se encuentran en la tabla D.1.

Tabla D.1 Mutaciones detectadas en el rastreo mutacional de los genes que codifican para los ligandos de RET (*GDNF*, *NRTN*, *PSPN* y *ARTN*) en nuestros pacientes HSCR.

Genes	Sustitución Nucleotídica	Sustitución Aminoacídica	Género	Origen	Fenotipo	Localización en la proteína	Nueva/ Previamente descrita
<i>GDNF</i>	c.277C>T	R93W	Hombre	Padre	Segmento corto	Proteína madura	Angrist et al, 1996; Salomon et al, 1996
			Hombre	Madre	Segmento corto		
			Hombre	Padre	Segmento largo		
			Mujer	Madre	Segmento largo		
			Hombre	Madre	Segmento corto		
c.300A>G	P100P	Hombre	Not Available	Segmento corto	Nueva		
c.429G>A	R143R	Mujer	Padre	TCA	Ivanchuck et al, 1996; Hofstra et al, 1997; 2000		
c.449G>A	D150N	Hombre	Padre	Segmento corto	Salomon et al, 1996; Hofstra et al, 1997; 2000		
<i>NRTN</i>	c.199G>A	A67T*	Hombre	Madre	Segmento corto	Propeptido	Nueva
	c.286G>T	A96S*	Hombre	Padre	Segmento corto	Proteína madura	Doray et al, 1998
	c.381C>T	F127L	Hombre	Padre	Segmento corto	Proteína madura	Nueva
<i>PSPN</i>	c.150-18C>T		Hombre	Padre	Segmento corto		Nueva
	c.271C>T	R91C	Hombre	Madre	Segmento corto	Proteína madura	Nueva
<i>ARTN</i>	c.215G>A	R72H	Mujer	Madre	Segmento corto	Propeptido	Nueva

*: Variantes detectadas en el mismo paciente.

Con el fin de realizar una primera aproximación sobre el posible impacto de estas mutaciones en el correcto funcionamiento de la proteína, y por lo tanto dilucidar su posible implicación en la aparición del fenotipo HSCR en dichos pacientes, realizamos el análisis *in silico* empleando distintas herramientas bioinformáticas. En este análisis no se incluyeron aquellas variantes que ya habían sido previamente publicadas en asociación con el fenotipo HSCR (R93W, R143R y D150N, en *GDNF*; A96S en *NRTN*). En este sentido, la variante intrónica detectada en *PSPN* no mostró tener ningún efecto biológico sobre el proceso de transcripción

o de maduración del mensajero, aunque no podemos descartar completamente su implicación en HSCR sin un estudio funcional más adecuado, ya que los programas de predicción de sitios de *splicing* y de unión a factores de transcripción no son totalmente fiables.

Predicted bonds	
66 - 124	ALSGPCQLWSL - HGGPCCRTRY
93 - 152	VIFRYCAGSCP - LSAAACGCGGX
97 - 154	YCAGSCPARGAR - AAACGCGGXXX

Predicted bonds	
66 - 124	ALSGPCQLWSL - HGGPCCRTRY
91 - 154	EKVIFCYCAGS - AAACGCGGXXX
93 - 152	VIFCYCAGSCP - LSAAACGCGGX
97 - 123	YCAGSCPARGAR - AHGGPCCRPTR

Figura D.1 Resultados de la predicción de formación de puentes disulfuro en PSPN mediante DIANNA. Proteína silvestre en la parte superior de la imagen y mutante (R91C) en la parte inferior. Se han resaltado los enlaces que desaparecen (azul) en la proteína mutada, así como los que se generan (rojo) al aparecer una nueva cisteína en la secuencia proteica.

El resto de variantes *missense* se sometieron a las herramientas Polyphen y SIFT para evaluar su impacto en la estructura de la proteína. De esta manera, basándonos en las propiedades físico-químicas de los residuos aminoacídicos y su estado de conservación entre varias especies, sólo la mutación R91C de *PSPN* fue pronosticada como potencialmente deletérea. Además, la inclusión de una nueva cisteína en la proteína podría inducir cambios en la formación de puentes disulfuro. De hecho, la herramienta DiANNA predice que la presencia de C91, no sólo inducirá la formación de un nuevo puente disulfuro con el residuo C154, sino que también la formación/destrucción de otros puentes disulfuro completamente distinto de los presentes en la proteína silvestre (Figura D.1). La ausencia de otras predicciones positivas puede deberse a que la tasa de falsos negativos de los programas Polyphen y SIFT es superior al 20% (Ng y Heinikoff, 2002; Ramensky, 2002), por lo que en los casos negativos llevamos a cabo el alineamiento de las secuencias proteicas procedentes de distintas especies mediante la herramienta Clustal. Sólo en el caso de F127L-*NRTN* pudimos encontrar un alto grado de homología en la región codificante de dicha proteína entre las distintas especies, lo que podría estar indicando la importancia de dicha región en el correcto funcionamiento de la proteína.

D.1.2. Estudio funcional de las mutaciones encontradas en nuestra serie de pacientes

Aquellas mutaciones *missense* nuevas en los ligandos de RET detectadas en nuestra serie de pacientes, fueron evaluadas para comprobar su impacto en la correcta expresión y secreción de dichos ligandos. Para evaluar el posible impacto de las variantes A67T, A96S y F127L en *NRTN*; R91C en *PSPN*; y R72H en *ARTN* sobre los niveles de expresión o sobre la correcta secreción al medio extracelular de dichas proteínas, se generaron vectores de expresión para *NRTN*, *PSPN* y *ARTN* tanto silvestres como mutantes.

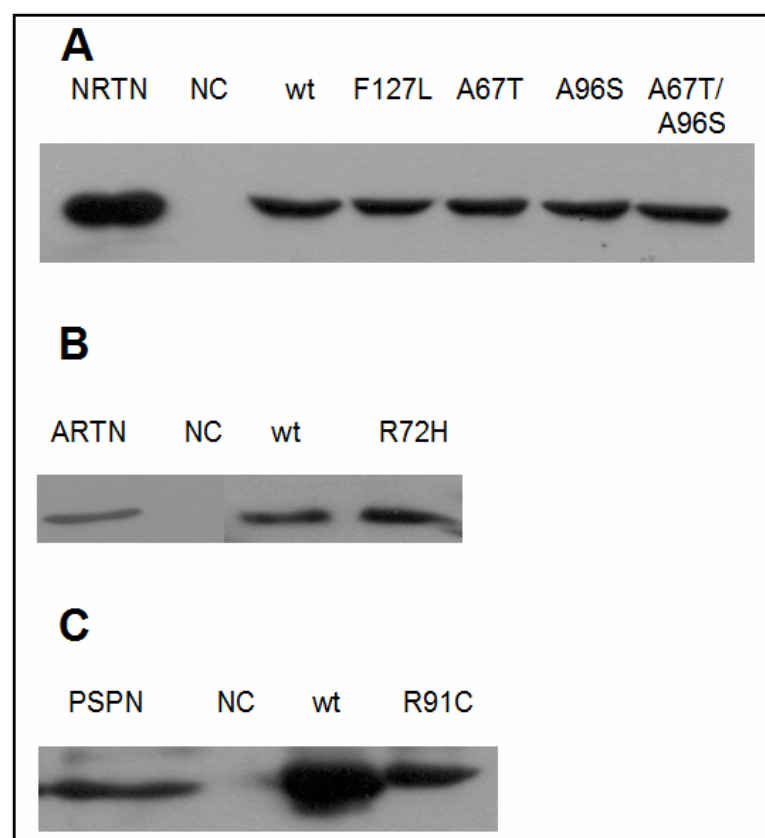


Figura D.2. Análisis mediante western blot de la expresión de los ligandos de RET tanto wt como mt, en el que se observa una disminución de la expresión del mutante R91C-*PSPN* con respecto al wt.

Se transfectaron células HEK293 de manera transitoria con los vectores silvestres (WT) y mutantes (MT) y el subsiguiente análisis mediante western blot del medio condicionado, reveló la presencia de los respectivos ligandos maduros tanto WT como MT con el peso molecular esperado al comparar con los estándares correspondientes, al contrario de lo que ocurrió en el medio procedente de las

células no transfectadas (Figura D.2). Pudimos observar que las proteínas mutantes NRTN y ARTN se generaron a un nivel comparable con las silvestres (Figura D.2 A y B), indicando que estas alteraciones no afectaban de manera significativa al nivel de expresión, al plegamiento, o al procesamiento de la proteína. Sin embargo, el análisis del mutante R91C-PSPN mostró una reducción significativa en el nivel de expresión del péptido maduro al comparar la proteína mutante con la silvestre (Figura D.2 C).

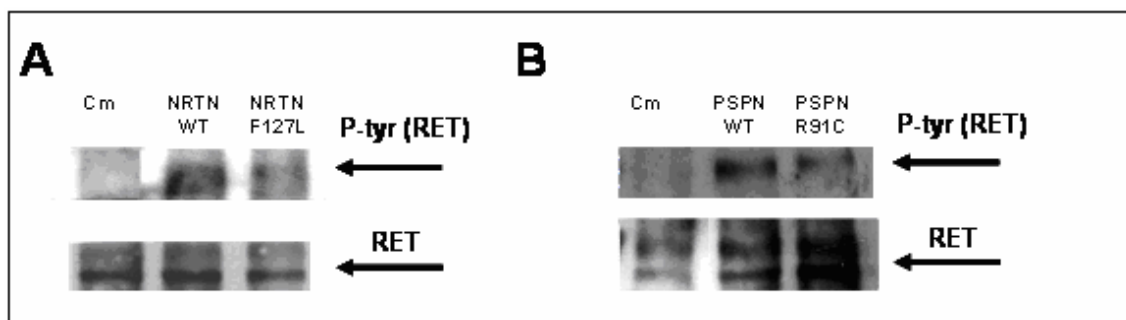


Figura D.3 Las proteínas mutantes F127L-NRTN y R91C-PSPN reducen la fosforilación de RET en las células SK-N-MC transfectadas de manera estable con RET. Las células fueron tratadas con NRTN y PSPN tanto mutante como silvestre (WT). El concentrado de medio procedente del cultivo de células no transfectadas se usó como control negativo (Cm). La detección de RET se llevó a cabo mediante anticuerpos anti-fosfotirosina (P-Tyr) y anti-RET (RET). Un ensayo representativo muestra RET total y fosforilado en células tratadas con NRTN (A) y PSPN (B).

Por otra parte, se analizó el impacto en la funcionalidad de aquellas mutaciones que afectaban a la región madura de los ligandos de RET, mediante la evaluación de su capacidad de promover la fosforilación de dicho receptor. En este sentido se seleccionaron las variantes A96S (*NRTN*), F127L (*NRTN*) y R91C (*PSPN*), que se localizan en la proteína madura y por lo tanto podrían afectar a la habilidad de dichos ligandos para inducir la fosforilación de RET, descartándose todas aquellas variantes localizadas en el propéptido. Se expresaron las proteínas, tanto silvestres como mutantes, en el medio de cultivo de células HEK293 transfectadas de manera transitoria. Para comprobar la capacidad de las proteínas silvestres y mutantes de activar al receptor RET, se cuantificó de manera relativa la fosforilación de los residuos de tirosina de RET en las células SK-N-MC que expresaban dicho receptor. Además, estas células fueron cotransfectadas con un vector de expresión de GFR α 4 en el caso del ensayo para PSPN, ya que éste es el receptor específico de PSPN y se comprobó mediante RT-PCR que estas células no expresaban dicho correceptor. De manera interesante, pudimos comprobar que el nivel de fosforilación de RET decrecía de forma significativa en presencia de la proteína mutante F127L-NRTN al compararla con NRTN silvestre. De la misma

manera, al realizar el estudio funcional de la mutación de PSPN, se observó una reducción significativa de la fosforilación de RET al comparar la proteína R91C-PSPN con la persefina silvestre (Figura D.3). Por el contrario no se observó ningún efecto sobre el nivel de fosforilación en el caso de A96S-NRTN.

Los datos del nivel de fosforilación de RET se normalizaron con respecto a la cantidad total de RET para asegurar que el efecto observado se debía a la presencia de la proteína mutante y no a una variación en los niveles de expresión del receptor. No se observó señal correspondiente a RET fosforilado en las células sin tratamiento, ni en las células tratadas con el medio concentrado que procedía de las células HEK293 no transfectadas (Ruiz-Ferrer et al., 2010).

D.2. Análisis molecular de la región 3' UTR en pacientes HSCR

El alelo c*587C (rs3026785) se encuentra en total desequilibrio de ligamiento con la variante c.2508T (836S) considerada como alelo de protección en HSCR en población italiana (Griseri et al., 2000; Lantieri et al., 2006). Estudios recientes sugieren que esta variante, además, tiene un efecto funcional en la estabilidad del mRNA (Griseri et al., 2007). Por todo ello, nos planteamos el análisis de esta variante en nuestra serie de pacientes HSCR, ya que dicho polimorfismo nunca había sido evaluado en población española en el contexto de HSCR.

Tras realizar un estudio clásico de casos y controles a partir de 183 pacientes HSCR y 190 controles, observamos que la frecuencia alélica de la variante c.*587C>T en ambos casos no difiere de la reportada en otras poblaciones (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=3026785). La frecuencia de este polimorfismo fue muy baja y similar en los casos y los controles ($\chi^2 = 1.81$, $p=0.18$). No obstante, a pesar de la baja frecuencia, teniendo en cuenta la incidencia de HSCR y que las muestras han sido recogidas durante los últimos 15 años, podemos afirmar que el tamaño muestral es suficiente para el objetivo del presente estudio. Dado que la frecuencia de este polimorfismo en población control fue de 5.3%, para nuestro tamaño muestral de 183 pacientes, calculamos que, para un valor $\alpha=5\%$ (error estadístico tipo I) y un valor máximo de $\beta=20\%$ (error estadístico tipo II), la diferencia de frecuencia entre ambos grupos debería ser superior a 8.8% para considerar que existía asociación de dicha variante con la enfermedad. Ya que la frecuencia de este polimorfismo resultó ser muy similar en casos y controles, podemos asumir que esta variante *per se* no está relacionada con el fenotipo HSCR (Fernández et al., 2009c).

Por otra parte, como la herencia genética opera a través de la transmisión de segmentos cromosómicos, la información de los haplotipos se considera esencial para identificar tanto variantes causantes como con valor protector frente a enfermedades. Por tanto, a partir de los datos disponibles en nuestro laboratorio procedentes de estudios anteriores (Borrego et al., 1999, 2003a) analizamos la distribución de la variantes c.*587T>C en el contexto del haplotipo de *RET*. Concretamente, y debido a su especial interés, intentamos analizar en nuestra serie de pacientes y controles la distribución de c.*587T>C de acuerdo con la presencia/ausencia de c.2508C>T (S836S) y c.74-126G>T. Observamos que el alelo c.*587C se encontraba en desequilibrio de ligamiento con c.2508T, como había sido descrito (Lantieri et al., 2006; Griseri et al., 2007), y con c.74-126T. Siempre que aparece el alelo c.*587C, lo hace acompañado de una T en las posiciones c.2508 y c.74-126, aunque lo contrario no siempre se cumple. Esta observación podría estar indicando que la variante c.*587T>C, en la región 3'UTR de gen, es un evento genético más reciente que ocurre el alelo de *RET* portador de c.2508T y c.74-126T (Fernández et al., 2009c).

D.3. Evaluación de los genes implicados en las rutas de señalización de GDNF-GFR α 1-RET como genes de susceptibilidad para DNI B


Debido a que HSCR y DNI B son ambos desórdenes del SNE que se presentan asociados con cierta frecuencia, sería posible que hubiera rutas moleculares implicadas en la aparición de estas dos enfermedades. Dada la clara implicación de la ruta de señalización de RET en HSCR, queremos determinar si los genes implicados dicha ruta ejercen un papel importante en la aparición de otras alteraciones del SNE, como la DNI. Por todo ello nos planteamos realizar el rastreo mutacional de la secuencia codificante del proto-oncogén *RET* y su ligandos en pacientes DNI B.

D.3.1. Rastreo mutacional de la secuencia codificante de RET, GDNF, NRTN, ARTN y PSPN en pacientes DNI B

En el presente trabajo hemos analizado la región codificante de *RET*, *GDNF*, *NRTN*, *ARTN* y *PSPN* en 23 pacientes DNI B mediante tecnología de dHPLC. El rastreo de *RET* reveló, además de varios polimorfismos comunes, que ya habían

sido observados en un estudio anterior sobre pacientes HSCR (Ruiz-Ferrer et al., 2006), un perfil aberrante nuevo. El análisis de secuencia que se realizó con posterioridad mostró la presencia de la mutación R982C que ya había sido descrita con anterioridad como asociada a HSCR (Mulligan et al., 1994).

La mutación R982C (c.2944C>T, rs17158558), se encontró en una paciente DNI B esporádico, que había heredado el cambio de su madre no afecta, observándose también en 10 de los 300 cromosomas control rastreados, lo que corresponde a una frecuencia alélica de 3,3%. Sin embargo, y a pesar de la presencia de esta variante en población control, estudios *in silico* predicen que ésta posee potencial patogénico. En este sentido, PolyPhen predice que R982C tendrá un efecto dañino sobre la proteína. De la misma manera la herramienta SIFT considera que la sustitución de arginina por cisteína no sería tolerada por la proteína, afectando a la función de la misma. Finalmente, también utilizamos DIANNA para analizar el impacto potencial de la incorporación de una nueva cisteína a la secuencia proteica. De esta manera pudimos determinar, no sólo que la presencia de una cisteína extra en la posición 982 generaría la formación de un nuevo puente disulfuro con el residuo C656, sino que también estaría implicado en la destrucción/creación de otros puentes disulfuros con respecto a la proteína silvestre (Fernández et al., 2009a; Figura D.4).



Predicted bonds		Predicted bonds	
87 - 519	ENNWICIQEDT - GCPLSCAVSKR	87 - 630	ENNWICIQEDT - IQDPLCDELCDR
137 - 157	LREGECQWPGC - TSFPACSSSLKP	137 - 585	LREGECQWPGC - ICPQDCLRSGI
142 - 987	CQWPGCARVYF - RLMLQCWKQEP	142 - 157	CQWPGCARVYF - TSFPACSSSLKP
166 - 430	KPRELCFPETR - VCVENCQAFSG	166 - 620	KPRELCFPETR - EEKCFCEPEDI
197 - 570	PVQFLCPNISV - CPDGHCDVVET	197 - 609	PVQFLCPNISV - AGYGTNCNCFPE
216 - 478	GLPFRCAPDSL - LRRPKCAELHY	216 - 541	GLPFRCAPDSL - SFTGRCEWRQG
243 - 609	ELVAVCTVHAG - AGYGTNCNCFPE	243 - 618	ELVAVCTVHAG - PEEKCFCEPE
426 - 611	QIGKVCVENCQ - YGTNCNCFEEE	426 - 430	QIGKVCVENCQ - VCVENCQAFSG
449 - 659	SSGANCSLGV - AFCIHCYHKFA	449 - 659	SSGANCSLGV - AFCIHCYHKFA
515 - 558	AAEAGCPLSCA - RNFSTCSPSTK	478 - 611	LRRPKCAELHY - YGTNCNCFEEE
528 - 1043	KRRLECEECGG - TPLVDCNNAPL	515 - 987	AAEAGCPLSCA - CLMLQCWKQEP
531 - 620	LECEECGLGS - EEKCFCEPEDI	519 - 558	GCPLSCAVSKR - RNFSTCSPSTK
541 - 630	SPTGRCEWRQG - IQDPLCDELCDR	528 - 1043	KRRLECEECGG - TPLVDCNNAPL
565 - 618	PSTKTCPDGHC - PEEKCFCEPE	531 - 581	LECEECGLGS - QDINICPQDCL
581 - 656	QDINICPQDCL - LLSAFCIHCYH	565 - 570	PSTKTCPDGHC - CPDGHCDVVET
585 - 794	ICPQDCLRSGI - KLYGACSQDGF	634 - 976	LCDELCRTVIA - ERPDNCSEEMY
634 - 976	LCDELCRTVIA - ERPDNCSEEMY	656 - 982	LLSAFCIHCYH - SEEMYCLMLQC

Figura D.4 Resultados de la predicción de formación de puentes disulfuro en RET mediante DIANNA. Proteína silvestre en la parte izquierda de la imagen y mutante (R982C) en la derecha.

Con respecto al rastreo de los ligandos de *RET*, no encontramos ningún cambio de secuencia que pudiera estar implicado en la aparición del fenotipo. Además de los polimorfismos descritos rs2242637 (*ARTN* Q19R; c.56A>G), rs2304198 (*PSPN* S10S; c.30C>T) y rs7255720 (*NRTN* R158R; c.474G>C), detectamos los siguientes cambios que no habían sido descritos con anterioridad: c.-104T>C y c.200-8C>T en *ARTN*, D136D (c.408T>C) en *PSPN* y T124T (c.372G>T) en *NRTN*. No se encontraron evidencias *in silico* de que ninguna de estas variantes produjera alteraciones de la transcripción o de la maduración del transcrito primario cuando se sometieron a distintos programas de predicción de sitios de *splicing* o de unión a factores de transcripción descritos en el apartado C.2.1.11.

D.3.2. Evaluación de variantes de secuencia del gen RET como factores de susceptibilidad para DNI B

Hemos realizado el análisis de la distribución alélica y genotípica de 8 SNPs de *RET* en los grupos de DNI B aislado, HSCR+DNI B, y controles (Tabla D.2). Además, ya disponíamos de los datos de genotipación para estos SNPs en nuestros pacientes HSCR (Borrego et al, 1999, 2003a; Fernández et al, 2005). Al tratarse de un análisis múltiple, el nivel de significación se ajustó de manera conveniente teniendo en cuenta el número de comparaciones. Como se muestra en la tabla D.2, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las variantes A432A y c.74-123G>T, a pesar de que se observa cierta tendencia a la significación para esta última ($p=0.019$). Por el contrario, existe una clara diferencia en la distribución observada para el resto de las variantes entre los distintos grupos (Fernandez et al., 2009a).

Merece la pena resaltar los resultados obtenidos para los dos SNPs G691S y L769L. En cuanto a G691S, podemos decir que no se encontraron alelos S691 en el grupo HSCR+DNI B, lo que da lugar a diferencias estadísticamente significativas al comparar este grupo con el grupo de DNI B (Test exacto de Fisher con dos colas, $p=0,0001280$), con el grupo de HSCR aislado ($\chi^2=7,36$, $p=0,0066747$) o con el grupo control ($\chi^2=15,42$, $p=0,0000863$) (Tabla D.3; Fernandez et al., 2009a). Por otra parte, la significación obtenida para la variante L769L se debe a una clara sobre-representación de este polimorfismo en los pacientes HSCR, como ya se había descrito con anterioridad (Borrego et al., 1999). Aparte de esto, sólo se encontró una tendencia a la sobre-presentación en homocigosis de la variante

L769L en el grupo de DNI B aislado, lo que da lugar a una diferencia en la distribución genotípica al comparar este grupo con el grupo de pacientes HSCR+DNI B ($\chi^2=6,63$, $p=0,03636496$), o con controles ($\chi^2=8,77$, $p=0,01244654$).

Estas diferencias significativas, sin embargo, no se observaron en la distribución alélica. Por el contrario, tanto la distribución genotípica como la alélica de la variante L769L resultaron significativamente distintas al comparar el grupo de HSCR+DNI B con el de controles. Con el objetivo de profundizar en estos resultados, realizamos la construcción de los haplotipos de *RET* constituidos por la combinación de los SNPs de la región codificante, como se ha descrito con anterioridad (haplotipos de la A a la L) (Borrego et al., 2000).

A pesar de que las variantes A45A y S904S no habían sido genotipadas específicamente, pudimos inferir estos datos ya que se encuentran en total desequilibrio de ligamiento con c.74-1463T>C y G691S respectivamente. No se observaron diferencias significativas al comparar la distribución haplotípica de los pacientes DNI B frente a controles ($\chi^2=7,28$, $p=0,29554021$), ni de los pacientes HSCR+DNI B frente a HSCR ($\chi^2=4,70$, $p=0,58278287$). Por el contrario, sí que encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar DNI B con HSCR ($\chi^2=22,23$, $p=0,00109942$), DNI B con HSCR+DNI B ($\chi^2=22,57$, $p=0,00095533$), y HSCR+DNI B con controles ($\chi^2=59,75$, $p<10^{-8}$) (Tabla D.3).

Con respecto a las variantes intrónicas, excepto para c.74-126G>T, en general, la distribución fue diferente al comparar DNI B *versus* HSCR, DNI B *vs* HSCR+DNI B, y HSCR+DNI B *vs* controles, pero no al comparar DNI B *vs* controles, o HSCR+DNI B *vs* HSCR (Fernandez et al., 2009a). El análisis de la distribución de los haplotipos generados a partir de las 4 variantes localizadas en el intrón 1 (haplotipos del 0 al 4) (Fernandez et al., 2005), confirmó la diferencia observada en cada variante de manera independiente. En este sentido, mientras que el haplotipo 0 (c.74-9277T, c.74-1463T, c.74-1370C, c.74-126G) es el haplotipo más frecuente tanto en HSCR como en HSCR+DNI B, el haplotipo 1 (c.74-9277C, c.74-1463C, c.74-1370T, c.74-126G) resultó ser el más prevalente en el grupo control y el haplotipo 2 (c.74-9277C, c.74-1463C, c.74-1370C, c.74-126T) en el grupo de pacientes con DNI B aislado.

Tabla D.2 Análisis de la distribución de las variantes de *RET* en los distintos grupos

IVS1+9277T>C (rs2435357)	Alelo T	Alelo C
DNI B	10	36
HSCR + DNI B	36	18
HSCR	66	52
Controles	33	165
$\chi^2=79,49, p<10^{-8} \leftarrow$		
c.74-1370C>T (rs2505532)	Alelo C	Alelo T
DNI B	33	13
HSCR + DNI B	49	5
HSCR	94	24
Controles	104	94
$\chi^2=41,73, p<10^{-8} \leftarrow$		
c.74-126G>T	Alelo G	Alelo A
DNI B	26	20
HSCR + DNI B	41	13
HSCR	91	27
Controles	128	70
$\chi^2=9,89, p=0,019$		
A432A (rs1800860)	Alelo G	Alelo A
DNI B	28	18
HSCR + DNI B	49	11
HSCR	91	27
Controles	140	58
$\chi^2=9,89, p=0,064$		
G691S (rs1799939)	Alelo C	Alelo A
DNI B	36	10
HSCR + DNI B	60	0
HSCR	102	16
Controles	152	46
$\chi^2=9,89, p=0,00023 \leftarrow$		
L769L(rs1800861)	Alelo T	Alelo G
DNI B	36	10
HSCR + DNI B	37	23
HSCR	86	32
Controles	171	27
$\chi^2=19,32, p=0,00023 \leftarrow$		
IVS19+47C>T	Alelo C	Alelo T
DNI B	39	7
HSCR + DNI B	37	21
HSCR	ND	ND
Controles	183	17
$\chi^2=27,38, p<10^{-6} \leftarrow$		

Tabla D.3 Distribución alélica y frecuencia de las variantes de *RET* en los diferentes grupos de estudio, comparando dos a dos.

Variante <i>RET</i>		DNI B vs. HSCR+DNI B (%)		DNI B vs. HSCR (%)		DNI B vs. Controles (%)		HSCR+DNI B vs. HSCR (%)		HSCR+DNI B vs. Controles	
c.73+9277T>C	T	10 (21,7)	36 (66,7)	10 (21,7)	66 (55,93)	10 (21,7)	33 (16,67)	36 (66,7)	66 (55,93)	36 (66,7)	33 (16,67)
	C	36 (78,3)	18 (33,3)	36 (78,3)	52 (44,1)	36 (78,3)	165 (83,33)	18 (33,3)	52 (44,07)	18 (33,3)	165 (83,33)
		$\chi^2=18,42, p<10^{-5} \leftarrow$		$\chi^2=14,22, p=0,0002\leftarrow$		$\chi^2=0,36, p=0,5494458$		$\chi^2=1,35, p=0,2449396$		$\chi^2=18,42, p<10^{-8} \leftarrow$	
c.74-1370C>T	C	33 (71,7)	49 (91,7)	33 (71,7)	94 (79,7)	33 (71,7)	104 (52,5)	49 (91,7)	94 (79,7)	49 (91,7)	104 (52,5)
	T	13 (28,3)	5 (8,3)	13 (28,3)	24 (20,3)	13 (28,3)	94 (47,5)	5 (8,3)	24 (20,3)	5 (8,3)	94 (47,5)
		$\chi^2=4,86, p=0,27530$		$\chi^2=0,78, p=0,3775462$		$\chi^2=4,84, p=0,0277484$		$\chi^2=2,50, p=0,1136957$		$\chi^2=24,40, p<10^{-7} \leftarrow$	
c.74-126G>T	G	26 (56,5)	41 (76,7)	26 (56,5)	94 (79,7)	26 (56,5)	128 (64,7)	41 (76,7)	91 (77,1)	41 (76,7)	128 (64,7)
	T	20 (43,5)	13 (23,3)	13 (28,3)	24 (20,3)	20 (43,5)	70 (35,3)	13 (23,3)	27 (22,9)	13 (23,3)	70 (35,3)
		$\chi^2=3,40, p=0,065274$		$\chi^2=5,90, p=0,0151657$		$\chi^2=0,74, p=0,3902346$		$\chi^2=0, p=0,9819610$		$\chi^2=1,96, p=0,1615287$	
A432A	G	28 (60,9)	49 (81,7)	28 (60,9)	91 (77,1)	28 (60,9)	140 (70,7)	49 (81,7)	91 (77,1)	49 (81,7)	140 (70,7)
	A	18 (39,1)	11 (19,3)	20 (43,5)	27 (22,9)	20 (43,5)	58 (29,3)	11 (18,3)	27 (22,9)	11 (19,3)	58 (29,3)
		$\chi^2=4,67, p=0,30719$		$\chi^2=3,61, p=0,057392$		$\chi^2=1,26, p=0,2622249$		$\chi^2=0,26, p=0,6124942$		$\chi^2=2,29, p=0,1300981$	
G691S	C	36 (78,3)	60 (100)	36 (78,3)	102 (86,4)	36 (78,3)	152 (76,8)	60 (100)	102 (86,4)	60 (100)	152 (76,8)
	A	10 (21,7)	0 (0)	10 (21,7)	16 (13,6)	10 (21,7)	46 (23,2)	0 (0)	16 (13,6)	0 (0)	46 (23,2)
		Fisher's $p=0,000128 \leftarrow$		$\chi^2=1,10, p=0,293501$		$\chi^2=0,0, p=0,9821827$		$\chi^2=7,36, p=0,0066747$		$\chi^2=15,42, p<10^{-5} \leftarrow$	
L769L	T	36 (78,3)	37 (61,7)	36 (78,3)	86 (72,9)	36 (78,3)	171 (86,4)	37 (61,7)	86 (72,9)	37 (63,8)	171 (86,4)
	G	10 (21,7)	23 (38,3)	10 (21,7)	32 (27,1)	10 (21,7)	27 (13,6)	23 (38,3)	32 (27,1)	23 (38,3)	27 (13,6)
		$\chi^2=2,61, p=0,105858$		$\chi^2=0,26, p=0,6100954$		$\chi^2=1,29, p=0,2492932$		$\chi^2=1,85, p=0,1741177$		$\chi^2=24,40, p<10^{-5} \leftarrow$	
c.3187+47C>T	C	39 (84,8)	37 (63,8)	39 (84,8)	ND	39 (84,8)	183 (91,5)	37 (63,8)	ND	37 (63,8)	183 (91,5)
	T	7 (15,2)	21 (36,2)	7 (15,2)	ND	7 (15,2)	17 (8,5)	21 (36,2)	ND	21 (36,2)	17 (8,5)
		$\chi^2=4,73, p=0,029689$		ND		Fisher's $p=0,1730269$		ND		$\chi^2=25,32, p<10^{-7} \leftarrow$	

D.4. Evaluación de *NTRK3* como gen de susceptibilidad para HSCR. Implicación de *RET* y *NTRK3* en la aparición de HSCR en un caso familiar

D.4.1. Rastreo mutacional de la secuencia codificante de *NTRK3* en pacientes HSCR

Nuestro grupo había obtenido con anterioridad resultados positivos al evaluar la implicación del gen *NTF3* (OMIM 162660) en HSCR (Ruiz-Ferrer et al., 2008). Por este motivo nos planteamos realizar el rastreo mutacional de la secuencia codificante del gen que codifica para su receptor, *NTRK3* (OMIM 191316), en pacientes HSCR, con el fin de evaluar su posible implicación en la aparición de esta patología.

Tras el análisis de la región codificante del gen *NTRK3* en 143 pacientes HSCR mediante dHPLC, encontramos un total de 16 perfiles aberrantes que, mediante análisis por secuenciación directa, revelaron 4 polimorfismos previamente descritos y 12 variantes de secuencia nuevas (Tabla D.4).

Tabla D.4 Variantes de secuencia de *NTRK3* detectadas en nuestros pacientes HSCR

Sustitución Nucleotídica	Sustitución Aminoacídica	Nueva/Previamente descrita	Frecuencia alélica en controles (%)
c.324-25C>T		Nueva	0
c.395+41G>T		Nueva	0
c.464+33A>G		Nueva	0
c.573C>T	N191N	rs1128994	18
c.678T>C	N226N	rs1863480	0,5
c.802T>C	L268L	Nueva	0
c.1293+57T>C		Nueva	0
c.1294-21delTCC		Nueva	1,1
c.1585+12G>A		Nueva	2
c.1488C>G	A496A	rs2229910	45
c.1665C>T	A555A	Nueva	1,1
c.1889-37G>C		Nueva	5,2
c.2133+44C>T		Nueva	1,1
c.1933C>T	R645C	Nueva	0
c.2175+97C>G		Nueva	0
c.*181+38G>A		rs1560975	34,5

De entre las variantes polimórficas previamente descritas, 3 se corresponden con polimorfismos relativamente comunes en la población (Haga et al., 2002), 2 de ellos localizados en la región codificante del gen, N191N (exón 4, rs1128994) y A496A (exón 12, rs2229910) y el otro en la región 3'UTR, c.*181+38G>A (rs1560975). La cuarta variante de secuencia previamente descrita es un polimorfismo extremadamente raro en nuestra población (N226N, exón 5, rs1863480) que sólo se ha encontrado en un paciente. Ésto contrasta con las otras tres variantes, presentes en heterocigosis en al menos un tercio de nuestra cohorte. Estos resultados son similares a los obtenidos en población alemana (Gimm et al., 2001).

También se encontraron 12 variantes de secuencia que no habían sido previamente publicadas. De entre ellas, la más interesante fue la mutación *missense* en el exón 14, c.1933 C>T (p.R645C) (Figura D.5). El análisis de la secuencia proteica de *NTRK3* mediante la herramienta ScanProsite reveló que el aminoácido 645 se localizaba en el dominio tirosín-kinasa de la proteína. Este cambio de secuencia se detectó en heterocigosis en dos hermanos afectados en los que la aganglionosis se extendía hasta el cólon descendente y el íleo respectivamente. Esta mutación había sido heredada del padre, que no padecía HSCR, y también estaba presente en dos familiares sanos. Hay que añadir que este cambio no se encontró en ninguno de los 300 cromosomas controles testados. El análisis de esta familia resultó especialmente interesante, ya que con anterioridad nuestro grupo había detectado una mutación en el proto-oncogén *RET* (c.1263+2T>A) en esta misma familia que habían heredado ambos pacientes de su madre sana (Figura D.11, Ruiz-Ferrer et al., 2006). Por lo tanto, los dos individuos afectados, son los únicos en la familia en los que se produce la concurrencia de mutaciones en *RET* y *NTRK3* (Fernández et al., 2009b).

Llevamos a cabo un análisis preliminar del posible papel patogénico de la mutación R645C en *NTRK3*, usando las herramientas Polyphen y SIFT, pero en ambos casos estos programas predijeron un efecto benigno de la sustitución, en base a que se trata de una posición no conservada en la secuencia al comparar distintas especies. Sin embargo, se puede especular con la posibilidad de que la inclusión de una nueva cisteína genere cambios en la estructura tridimensional de la proteína mediante la formación de nuevos puentes disulfuro. Desgraciadamente, todavía no se dispone de la estructura tridimensional resuelta de esta proteína completa, pero, usando el programa DiANNA, hemos intentado predecir el estado de los residuos cisteínicos en la proteína silvestre y mutada. De esta manera se puede ver en la Figura D.6 como la presencia de C645 no sólo implicaría la

formación de un nuevo puente disulfuro, si no que provocaría la destrucción y generación de diferentes puentes disulfuro con respecto a la proteína silvestre.

En este rastreo también se detectaron dos cambios silenciosos en el exón 6 (c.802T>C, L268L), y 12 (c.1665C>T, A555A), presentes en un caso esporádico y en dos individuos afectados de una familia múltiple (en la que existen más de un paciente afecto) respectivamente, y ausentes en controles. Se detectó una delección de 3 nucleótidos (c.1294-21delTCC) en 4 casos de HSCR esporádico, aunque también se encontró en 1 cromosoma control de los 300 analizados.

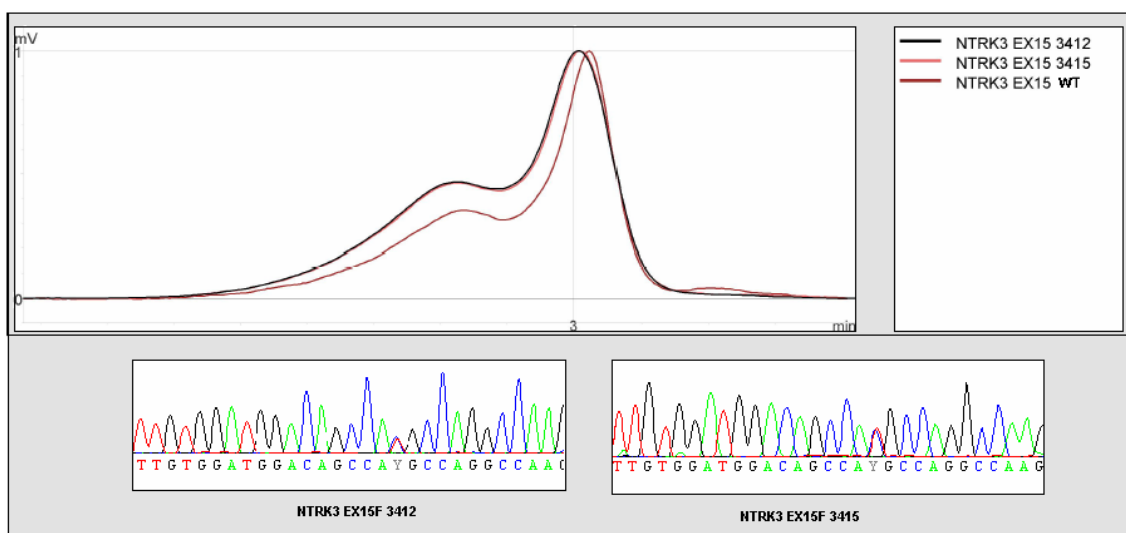


Figura D.5 Perfiles de elución de la cromatografía líquida de alta presión en condiciones desnaturalizantes y análisis de la secuencia nucleotídica en los pacientes portadores de la mutación en *NTRK3* R645C (3412 y 3415) y un control negativo (WT).

Todos los demás cambios se corresponden con sustituciones intrónicas, c.324-25C>T, c.395+41G>T, c.464+33A>G, c.1293+57T>C, c.1585+12G>A, c.1889-37G>C, c.2133+44C>T y c.2175+97C>G. Estas variantes no se detectaron en controles a excepción de c.1585+12 G>A y c.1889-37 G>C que aparecieron en un 1% y 2% de los cromosomas control analizados.



[Software](#)
[Web Supplements](#)
[Home Page](#)
[Clote Lab](#)

Predicted bonds	
6 - 164	MDVSLCPAKCS - QNFFNCSDIR
10 - 36	LCPAKCSFURI - ACPANCVCSKT
32 - 45	GSVLACPANCV - KTEINCRPPDD
38 - 189	PANCVCSKTEI - SQNLYCINADG
166 - 523	FFNCSCDIRVM - RQGHNCHKPDT
207 - 443	MNISQCDLPEI - LAAFACVLLVV
231 - 284	NAVITCNGSGS - GFTLTCAENV
320 - 607	LRLEHCIEFVV - KFYGVCGDGDG
362 - 781	EISEGCLLFNK - ERPRVCPKEVY
557 - 685	VFLAECYNLSP - LATRNCLVGAN
768 - 792	TEVIECITQGR - DVMLGCWQREP
Predicted bonds	
6 - 164	MDVSLCPAKCS - QNFFNCSDIR
10 - 36	LCPAKCSFURI - ACPANCVCSKT
38 - 45	PANCVCSKTEI - KTEINCRPPDD
166 - 189	FFNCSCDIRVM - SQNLYCINADG
207 - 320	MNISQCDLPEI - LRLEHCIEFVV
231 - 284	NAVITCNGSGS - GFTLTCAENV
362 - 781	EISEGCLLFNK - ERPRVCPKEVY
443 - 523	LAAFACVLLVV - RQGHNCHKPDT
557 - 685	VFLAECYNLSP - LATRNCLVGAN
607 - 643	KFYGVCGDGDG - VDGQPCQAKGE

Figura D.6 Resultados de la predicción de formación de puentes disulfuro en *NTRK3* mediante DIANNA. Proteína silvestre en la parte superior de la imagen y mutante en la inferior. Se han resaltado los enlaces que difieren en la proteína mutante (verde) con respecto a la silvestre (rojo).

D.4.2. Evaluación funcional de variantes intrónicas sobre la expresión de NTRK3

Se sabe que tanto las sustituciones sinónimas como las variantes intrónicas, no generan cambios en la secuencia de proteínas. Sin embargo, podrían tener un mecanismo patogénico consistente en la alteración de la estabilidad del transcrito, el proceso de maduración del mensajero o la unión entre DNA y proteínas.

Como una aproximación inicial a este problema usamos varios programas de predicción de sitios de *splicing* y de unión a factores de transcripción para determinar el posible impacto de los cambios intrónicos y silentes ausentes en población control detectados en el rastreo de *NTRK3* en nuestra serie de pacientes HSCR. De esta manera obtuvimos que tres de estas variantes (c.324-25C>T,

c.1294-21delTCC y c.1889-37G>C) formarían parte de la extensión de polipirimidinas (*Polypyrimidine Tract*, PPT), una región rica en pirimidinas localizada a continuación del extremo 3' de cada intrón, presente en eucariotas superiores e implicado en la correcta maduración del mRNA. Es posible que estas variantes de secuencia puedan provocar un cambio en la topología del pre-mRNA que hiciera que sitios de *splicing* erróneos se unieran entre sí, dando lugar a la pérdida de exones en el mRNA maduro, y por lo tanto a una proteína aberrante.

Para comprobar *in vitro* el posible efecto de estas 3 variantes intrónicas sobre el proceso de maduración del mRNA, llevamos a cabo una RT-PCR a partir del RNA total extraído de linfocitos de sangre periférica de los pacientes portadores de dichas variantes, utilizando 2 parejas distintas de cebadores según la localización de la sustitución o deleción. Para la variante c.324-25C>T se utilizaron cebadores localizados en los exones 1 y 4 que teóricamente, darían lugar a un producto de PCR de 408pb. Con respecto a c.1294-21delTCC y c.1889-37G>C, los cebadores seleccionados estuvieron localizados en los exones 8-9 y 16, generando un amplicón de 1002pb. Gracias a los resultados de la movilidad electroforética de los productos de PCR en un gel, y de la secuenciación directa, pudimos comprobar que en ninguno de los casos aparecieron productos alternativos de PCR, distintos de los esperados y observados en individuos control.

D.4.3. Análisis de variantes de secuencia en NTRK3 como factores de susceptibilidad para HSCR esporádico

Se genotiparon 3 SNPs distribuidos a lo largo del gen *NTRK3* mediante tecnología TaqMan en pacientes HSCR esporádico y en un grupo de controles. Los resultados se muestran en la tabla D.5. Tras el análisis de la distribución alélica y genotípica de estos polimorfismos no encontramos diferencias significativas entre el grupo de casos y el de controles.

De la misma manera no se encontraron diferencias significativas en la distribución de los haplotipos conformados por dichos polimorfismos. Tampoco se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos los alelos transmitidos frente a los no transmitidos desde los padres sanos a sus hijos afectados (análisis TDT).

Tabla D.5 Distribución alélica y genotípica y frecuencias de las variantes de *NTRK3* genotipadas en los pacientes HSCR y controles y su comparación.

	Variante		HSCR (%)	Controles (%)	
Distribución Alélica	c.464-9379A>G	A	210 (78,95%)	297 (78,57%)	
		G	56 (21,05%)	81 (21,43%)	
	$\chi^2=0,0$, $p=0,9864325$				
	c.1585+11842T>G	T	214 (80,45%)	286 (75,66%)	
		G	52 (19,55%)	92 (24,34%)	
	$\chi^2=1,67$, $p=0,1966258$				
	A486A	C	181 (69,05%)	250 (66,14%)	
		G	85 (31,95%)	128 (33,86%)	
	$\chi^2=0,18$, $p=0,6733453$				
	Distribución Genotípica	c.464-9379A>G	AA	78 (58,6%)	113 (59,8%)
AG			54 (40,6%)	71 (37,6%)	
GG			1 (0,8%)	5 (2,6%)	
$\chi^2=1,70$, $p=0,42640977$					
c.1585+11842T>G		TT	82 (62,1%)	105 (55,6%)	
		TG	48 (36,4%)	76 (40,2%)	
		GG	2 (1,5%)	8 (4,2%)	
$\chi^2=2,72$, $p=0,25722771$					
A486A		CC	64 (48,1%)	83 (43,9%)	
		CG	53 (39,8%)	84 (44,4%)	
		GG	16 (12,1%)	22 (11,7%)	
$\chi^2=0,70$, $p=0,70476408$					

D.5. Análisis molecular de los genes *EDN3* y *EDNRB* en nuestra cohorte de pacientes HSCR

D.5.1. Rastreo mutacional de la secuencia codificante de *EDNRB* y *EDN3* en pacientes HSCR

En el presente trabajo presentamos el rastreo de la región codificante de *EDNRB* (OMIM 131244) y *EDN3* (OMIM 131242) en nuestra serie de pacientes HSCR, ya que el análisis molecular de estos genes no se había realizado con anterioridad en población española. El rastreo de estos dos genes en 196 pacientes HSCR mediante dHPLC reveló un total de 25 variantes de secuencia en *EDNRB* y 11 en *EDN3*, 14 de ellas previamente descritas y 22 nuevas (Tablas D.6 y D.7).

Tabla D.6 Variantes de secuencia detectadas en *EDNRB* en nuestros pacientes HSCR.

Sustitución Nucleotídica	Sustitución Aminoacídica	Nueva/Previamente descrita	Frecuencia alélica en controles (%)
c.-111delC [#]		Nueva	0,48
c.-74C>T [#]		Nueva	0
c.-67C>A [#]		Nueva	0
c.43A>T [#]	K15X [#]	Nueva	0
c.42_45del	L15PfsX29	Nueva	0
c.159A>G	L53L	Nueva	0
c.167A>C	K56T	Nueva	0
c.169G>A	G57S	rs1801710	0
c.343G>A	G115R	Nueva	0
c.360C>T	S120S	Nueva	0
c.466C>T	P156S	Nueva	0
c.552C>T	S184S	rs5348	0
c.561C>T	I187I	rs5349	1
c.731C>A	T244M	Nueva	0
c.732G>A	T244T	Nueva	0,49
c.802-139A>G		Nueva	0
c.802-122T>C		rs9530703	6,7
c.831A>G	L277L	rs5351	56,5
c.914G>A	S305N	rs5352	2,25
c.928G>A	A310T	Sakai et al., 2000	0
c.951+31G>C		Nueva	0
c.951+82C>T		Nueva	0
c.952-19A>G		Nueva	0
c.1239C>G	p.S413S	Nueva	0
c.*50A>T		Nueva	0

[#]: Variantes anotadas a partir de la isoforma *EDNRB*_{Δ3}.

De las 25 variantes de secuencia encontradas en *EDNRB*, 6 se correspondieron con sustituciones en la región no codificante, c.802-139A>G, c.802-122T>C, c.951+31G>C, c.951+82C>T, c.952-19A>G y c.*50A>T, siendo c.802-139A>G (rs9530703) la única que había sido descrita como polimorfismo común. El resto de cambios intrónicos, así como la nueva variante detectada en la región 3'UTR del gen, resultaron ausentes en los 300 cromosomas control testados.

También detectamos 7 cambios sinónimos en la región codificantes de *EDNRB*, 3 de ellos previamente descritos (S184S, c.552C>T, rs5348; I187I, c.561C>T, rs5349; y L277L, c.831A>G, rs5351). Los otros 4 cambios nuevos (L53L, c.159A>C; S120S, c.360C>T; T244T, c.732 G>A; y S413S, c.1239C>G), fueron detectados en pacientes HSCR esporádicos y estuvieron ausentes en los controles testados, con excepción de T244T. No encontramos ninguna evidencia de que estas variantes sinónimas, así como las intrónicas y la localizada en la región 3'UTR, pudieran producir alteraciones a nivel transcripcional o en el proceso de *splicing* al someterlas a distintos programas bioinformáticos para este fin.

Tabla D.7 Variantes de secuencia detectadas en *EDN3* en nuestros pacientes HSCR

Sustitución Nucleotídica	Sustitución Aminoacídica	Nueva/Previamente descrita	Frecuencia alélica en controles (%)
c.-248G>A		Nueva	0,5
c.53-57C>T		Nueva	4,0
c.365+23G>A		rs11570257	4,0
c.366-56G>C		rs11570340	3,3
c.542+119C>T		rs11570341	0
c.560insA	T189NfsX63	rs11570344	0
c.572delAA	K191RfsX60	Nueva	0
c.621-80T>C		rs11570349	0
c.621-30insT		Nueva	0
c.*240delCC		rs34516274	28,5
c.*240delC		rs11475273	15,7

Mucho más interesante fue el hallazgo de 7 sustituciones *missense* en heterocigosis, dando lugar a un cambio de aminoácido en la secuencia proteica (Tabla D.8; Sánchez-Mejías et al., 2010a). Algunas de estas mutaciones han sido previamente descritas como asociadas al fenotipo HSCR, como es el caso de G57S (rs1801710), encontrada en un paciente HSCR esporádico. Esta mutación fue hallada por primera vez por Amiel et al. en un paciente que presentaba HSCR en asociación con DNI B (Amiel et al., 1996). También detectamos en un paciente HSCR esporádico la mutación A310T, descrita por Sakai et al. como mutación

causal de HSCR (Sakai et al., 2000). De la misma manera, detectamos la sustitución S350N en 4 pacientes HSCR y 5 controles, lo que nos hace pensar que, a pesar de haber sido descrita originariamente como mutación asociada a HSCR (Auricchio et al., 1996), S350N debería ser considerado como un polimorfismo raro. Las 4 sustituciones restantes son mutaciones nuevas (K56T; G115R, P156S y T244M) y completamente ausentes en controles. Toda la información relativa al género, fenotipo y herencia de la mutación se encuentra recogida en la tabla D.8. Con el fin de examinar de manera preliminar el potencial patogénico de las 4 mutaciones nuevas, usamos las herramientas PolyPhen y SIFT. Ambos programas predijeron un efecto benigno para K56T, basándose en la falta de conservación entre distintas especies de dicha posición en la secuencia proteica. De la misma manera no se predijo un efecto perjudicial para T224N por la naturaleza conservativa de la sustitución de dos aminoácidos polares entre si, además T244M se localiza en la misma posición que el polimorfismo T244N (rs5350), y no ha sido asociado a HSCR ni a ninguna otra patología. Por el contrario, la sustitución de un residuo hidrófobo de glicina y prolina por otro básico de arginina o polar de serina en las posiciones 115 y 156 respectivamente, fueron predichas como sustituciones no toleradas en la proteína, teniendo un efecto perjudicial en su función, debido al alto grado de conservación de ambas posiciones en la proteína (Figura D.7).

Tabla D.8 Mutaciones^a presumiblemente patogénicas detectadas en los genes *EDNRB* y *EDN3* en nuestros pacientes HSCR aislados

Gen	Paciente	Sustitución Nucleotídica	Sustitución Aminoacídica	Esporádico/ Familiar	Género	Transmisión de la mutación	Presencia en otros miembros de la familia
EDNRB	HSCR 19	c.43A>T ^b	K15X ^c	Esporádico	Hombre	Paterna	No
	HSCR 6	c.42_45del ^b	L15PfsX29	Esporádico	Mujer	Materna	Sí
	HSCR 140	c.167A>C ^b	K56T	Esporádico	Hombre	Materna	No
	HSCR 61	c.169G>A	G57S	Esporádico	Hombre	Paterna	No
	HSCR 194	c.343G>A	G115R	Familiar	Hombre (2)	Paterna	No
	HSCR 113	c.466C>T ^b	P156S	Familiar	Hombre (2)	Paterna	No
	HSCR 82	c.928G>A	A310T	Esporádico	Hombre	Paterna	No
EDN3	HSCR 9	c.560insA	T189NfsX63	Familiar	Hombre	Materna	Sí
	HSCR 130	c.572_573del ^b	K191RfsX60	Esporádico	Mujer	Paterna	No

a: Todas las mutaciones se detectaron en heterocigosis

b: Mutación nueva

c: Variantes anotadas a partir de la isoforma *EDNRBΔ3*

Por otra parte, también encontramos una mutación de pérdida de la pauta de lectura que consistía en la delección de 4 nucleótidos (c.42delGCTG), ausente en controles. Esta delección tiene como consecuencia la aparición de un codón de parada prematura en la posición 43 de la proteína. Como resultado, se genera una proteína truncada con todos los dominios funcionales completamente abolidos.

A	
QUERY:	...CQGPIEIKETFKYINTVVSCLVFVLG IIGNSTLLRIIYKNCMRNGPNILI...
endothelin receptor subtype B [Sus scrofa] >...	...CEGPIEIKDTFKYINTVVSCLVFVLG IIGNSTLLRIIYKNCMRNGPNILI...
endothelin receptor type B [Equus caballus]CERTIEIKETFKYINTVVSCLVFVLG IIGNSTLLRIIYKNCMRNGPNILI...
PREDICTED: endothelin receptor type B isofo...	...CQGPIEIKETFKYINTVVSCLVFVLG IIGNSTLLRIIYKNCMRNGPNILI...
endothelin receptor type B [Mus musculus] >gi 1...	...CQRNIEISKTFKYINTVVSCLVFVLG IIGNSTLLRIIYKNCMRNGPNILI...
endothelin receptor type B [Bos taurus] >gi 119...	...CDGPIEIKETFKYINTVVSCLVFVLG IIGNSTLLRIIYKNCMRNGPNILI...
endothelin B receptor [Canis familiaris]	...CEKSEIKETFKYINTVVSCLVFVLG IIGNSTLLRIIYKNCMRNGPNILI...
endothelin receptor type B [Oryctolagus cuni...	...CQRPEIKDTFKYINTVVSCLVFVLG IIGNSTLLRIIYKNCMRNGPNILI...
PREDICTED: similar to endothelin receptor ty...	...CSGQTEIKETFKYINTVVSCLVFVLG IIGNSTLLRIIYKNCMRNGPNILI...
PREDICTED: endothelin receptor type B [Gallus g...	...CTGQTEIKETFKYINTVVSCLVFVLG IIGNSTLLRIIYKNCMRNGPNILI...
endothelin receptor b1 [Dimidiochromis compressi...	...CTGPTEIRDTFKYINTVVSCLVFVVG IIGNSTLLRIIYKNCMHNPNILI...
unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	...CLGPTEIRDTFKYINTVVSCLVFVVG IIGNSTLLRIIYKNCMRNGPNILI...
endothelin receptor B [Danio rerio] >gi 9858056...	...CTDPTEIRDTFKYINTVVSCLVFVVG IIGNSTLLRIIYKNCMRNGPNILI...
endothelin receptor [Oryzias latipes]	...CVKPEIKDAFKYVNTIISCLIFVVG IIGNSTLLRIIYKNCMRNGPNVLI...
endothelin receptor B subtype 2 [Coturnix coturnix]	...CARPADIRHIFKYINTIVSCTIFIVG IIGNSTLLRIIYKNCMRNGPNVLI...
endothelin receptor type B, isoform CRA_d [Homo s...	...CQGPIEIKETFKYINTVVSCLVFVLG IIGNSTLLRIIYKNCMRNGPNILI...
hypothetical protein LOC779931 [Xenopus trop...	...CDGQTEIKDTFKYITVISCLIFIVG ITGNSALLRIIYKNCMRNGPYILI...
MGC52586 protein [Xenopus laevis]	...CVSRARIRHAFKYVTTILSCVIFLVG IVGNSTLLRIIYKNCMRNGPNVLI...
endothelin receptor type B [Xenopus tropical...	...CVSRARIRHAFKYVTTILSCVIFLVG IVGNSTLLRIIYKNCMRNGPNVLI...
B	
QUERY:	...CMRNGPNILIASLALGDLHIVIDI P INVYKLLAEDWPF GAEMCKLVVPIQ...
endothelin receptor subtype B [Sus scrofa] >...	...CMRNGPNILIASLALGDLHIIIDI P INVYKLLAEDWPF GVEMCKLVVPIQ...
endothelin receptor type B [Oryctolagus cuni...	...CMRNGPNILIASLALGDLHIIIDI P INVYKLLAEDWPF GAEMCKLVVPIQ...
endothelin receptor type B [Equus caballus]CMRNGPNILIASLALGDLHIIIDI P INVYKLLAEDWPF GVEMCKLVVPIQ...
endothelin receptor type B [Mus musculus] >gi 1...	...CMRNGPNILIASLALGDLHIIIDI P INTYKLLAEDWPF GAEMCKLVVPIQ...
PREDICTED: endothelin receptor type B isofo...	...CMRNGPNILIASLALGDLHIVIDI P INVYKLLAEDWPF GAEMCKLVVPIQ...
endothelin B receptor [Canis familiaris]	...CMRNGPNILIASLALGDLHIIIDI P ITVYKLLAEDWPF GVEMCKLVVPIQ...
endothelin receptor type B [Bos taurus] >gi 119...	...CMRNGPNILIASLALGDLHIIIDI P INTYKLLAKDWPFGVEMCKLVVPIQ...
PREDICTED: similar to endothelin receptor ty...	...CMRNGPNILIASLALGDLHIIIDI P INVYKLLAEDWPF GVEMCKLVVPIQ...
PREDICTED: endothelin receptor type B [Gallus g...	...CMRNGPNILIASLALGDLHIIIDI P ISVYKLLAEDWPF GVEMCKLVVPIQ...
endothelin receptor b1 [Dimidiochromis compressi...	...CMHNGPNILIGSLALGDLHIIIAI P INVYKLLAEDWPF GVTCLKLVVPIQ...
unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	...CMRNGPNILIASLALGDLHIIIGI P INVYKLLAEDWPF GVALCKLVVPIQ...
endothelin receptor B [Danio rerio] >gi 9858056...	...CMRNGPNILIASLALGDLHIMIDI P INVYKLLAKDWPFGVGLCKLVVPIQ...
endothelin receptor [Oryzias latipes]	...CMRNGPNVLIGSLALGDLHYIIIAI P INVYKLLAEDWPF GYICKLVVPIQ...
hypothetical protein LOC779931 [Xenopus trop...	...CMRNGPYILIASLALGDLHIIIDI P ITTYKLLAQDWPFGVEICKLVVPIQ...
endothelin receptor B subtype 2 [Coturnix coturnix]	...CMRNGPNVLIASLALGDLHYIIIAI P INVYKLLAKDWPFGVQVCKLVVPIQ...
endothelin receptor type B, isoform CRA_d [Homo s...	...CMRNGPNILIASLALGDLHIVIDI P INVYKLLAEDWPF GAEMCKLVVPIQ...
MGC52586 protein [Xenopus laevis]	...CMRNGPNVLIASLALGDLFYIIIAI P IHYKLLAEHWPF GVHICKLVVPIQ...
PREDICTED: similar to Endothelin-1 receptorCMRNGPNALIASLALGDLIYIVIDI P INVFKLLAQRPFGVFLCKLVVPIQ...

Figura D.7 Fragmento del alineamiento múltiple realizado por el programa bioinformático PolyPhen alrededor de las posiciones aminoacídicas 115 (A) y 156 (B), de la proteína EDNRB.

Cabe hacer especial mención a los resultados obtenidos en el rastreo mutacional del exón adicional en dirección 5' (Tsutsumi et al., 1999). La única diferencia entre el transcrito convencional de *EDNRB* y esta variante de splicing

(*EDNRBΔ3*) sería la presencia de 89 aminoácidos adicionales hacia el extremo amino-terminal de la proteína. Hemos detectado 3 variantes de secuencia en la región 5'UTR de dicho exón (c.-111delC; c.-74C>T y c.-67C>A). Pero sin ninguna duda, el hallazgo más interesante fue la detección de la mutación K15X (c.43A>T) en un paciente HSCR esporádico. Ninguna de estas variantes había sido descrita con anterioridad, ya que esta es la primera vez que se presenta el rastreo de este exón en una serie de pacientes HSCR en todo el mundo.

Con respecto al gen *EDN3*, 9 de las variantes detectadas consistieron en sustituciones en la región no codificante. No encontramos ninguna evidencia de que estas variantes pudieran producir alteraciones a nivel transcripcional o en el proceso de *splicing* al someterlas a distintos programas bioinformáticos.

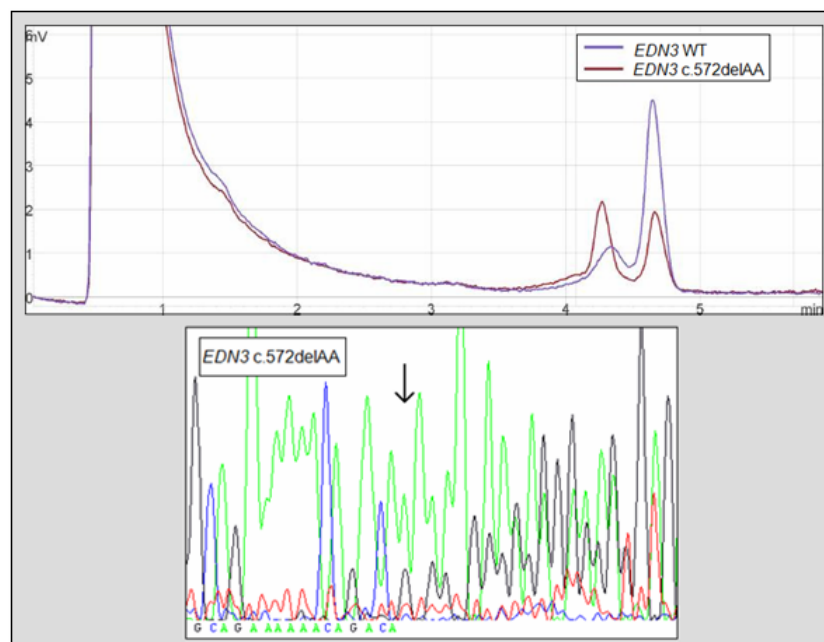


Figura D.8 Perfiles de elución de la cromatografía líquida de alta presión en condiciones desnaturalizantes y análisis de la secuencia nucleotídica en el paciente portador de la mutación en *EDN3* c.572delAA (K191RfsX60) y un control negativo (WT).

Por otra parte, se detectaron 2 mutaciones en el gen *EDN3*, una de ellas en una familia múltiple que se describe en el apartado D.3, en la que ya se había detectado la presencia de mutaciones en *RET* y *NTRK3*. La descripción detallada de esta familia y la presencia de la mutación en *EDN3* se describen en el apartado siguiente. La otra mutación en este gen se detectó en un paciente HSCR esporádico y aislado, que había heredado dicho cambio (c.572delAA) de su padre no afecto

(Figura D.8; Tabla D.8). Esta mutación, que resultó ausente en población control, se localiza en el dominio correspondiente a la preproendotelina, pero está ausente en la proteína madura una vez que ésta se somete al procesamiento por enzimas proteolíticas. Como resultado de la presencia de c.572delAA se genera una proteína aberrante de 249 residuos aminoacídicos de longitud, por la presencia de una señal de parada de la transcripción en la posición 250. Esta proteína mutante tiene un extremo carboxi-terminal con una secuencia completamente diferente, y como consecuencia, con una estructura tridimensional también distinta a partir del residuo 190, en comparación con la preproendotelina silvestre de 219 aminoácidos, tal y como predice la herramienta GARNIER (Figura D.9).

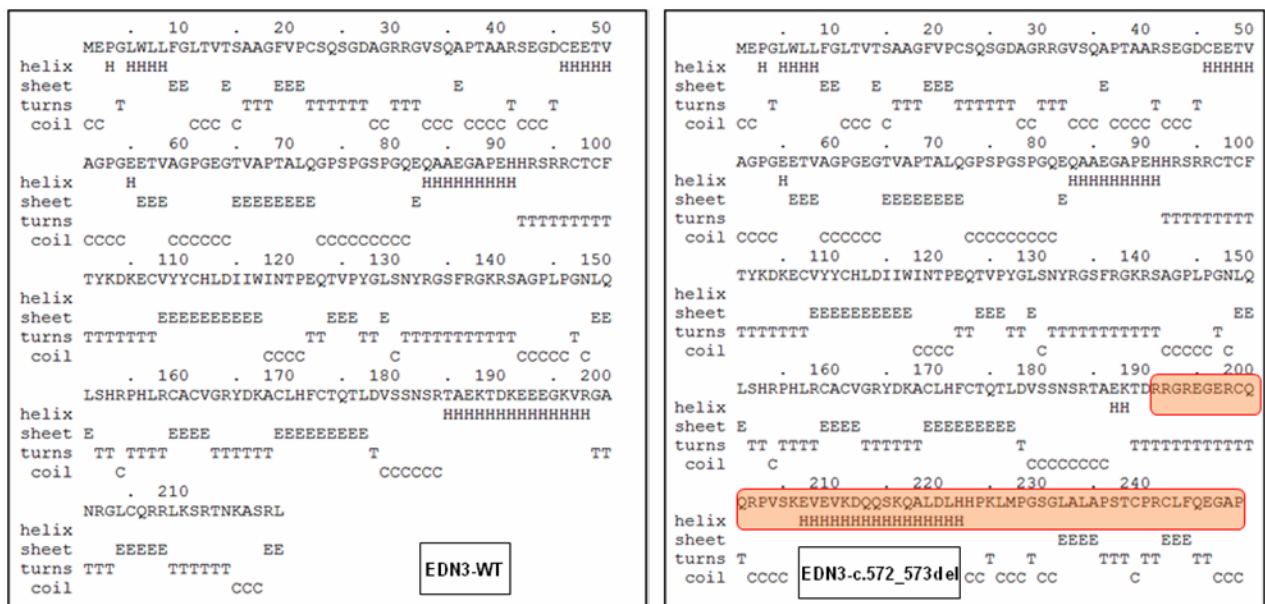


Figura D.9 Predicción de la estructura secundaria de la EDN3 a partir de su estructura primaria mediante la herramienta GARNIER. Comparación de la proteína silvestre (izquierda) con la proteína mutante K191RfsX60 (c.572_573del; derecha), la diferencia con respecto a la proteína silvestre, tanto en la estructura primaria como en la secundaria, se ha resaltado mediante un cuadro rojo.

D.5.2. Identificación de una variante en EDN3 como factor modificador del fenotipo en una familia HSCR múltiple

En este trabajo se detectó la presencia de una mutación en *NTRK3* causante de HSCR en combinación con otra mutación en *RET*, presentes en dos pacientes pertenecientes a la misma familia. Estos dos pacientes exhibieron distinto fenotipo HSCR, en uno de ellos la aganglionosis se extendía hasta el colon descendente y en el otro hasta el íleo. El hecho de encontrar dos pacientes con idéntico genotipo y

una expresión variable de la enfermedad nos hizo plantearnos la posibilidad de que existieran otros factores genéticos que estuvieran participando en la aparición de HSCR en ambos pacientes.

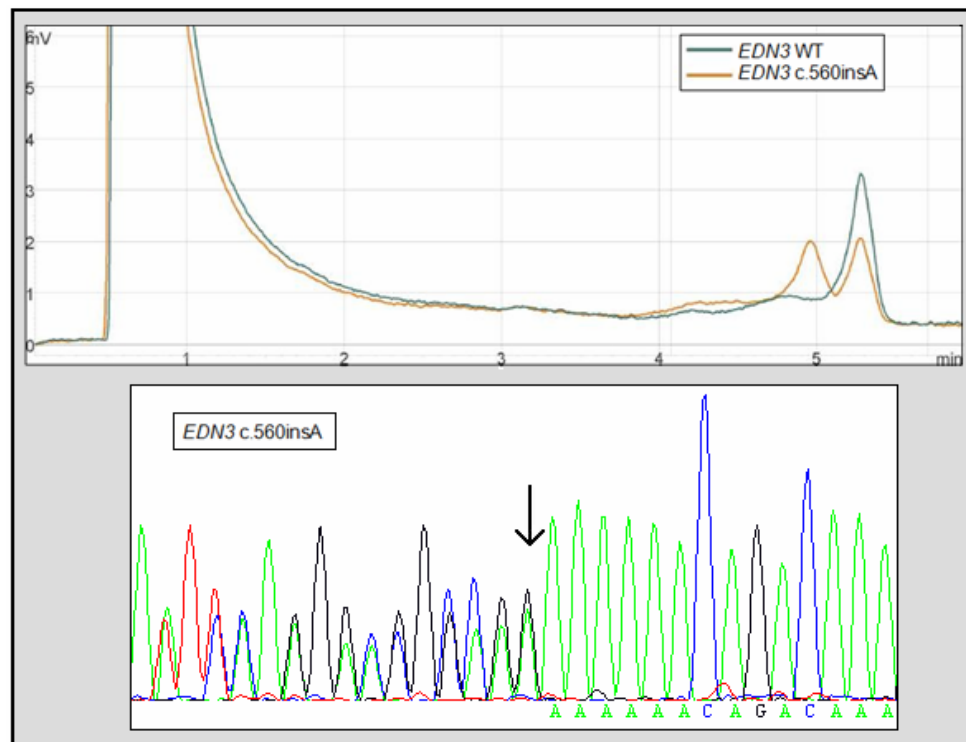


Figura D.10 Perfiles de elución de la cromatografía líquida de alta presión en condiciones desnaturalizantes y análisis de la secuencia nucleotídica en el paciente portador de la mutación en *EDN3* c.560insA (T189NfsX63) y un control negativo (WT).

Más allá de las mutaciones encontradas en los genes *RET* y *NTRK3* en estos pacientes, no se detectaron mutaciones causales en la región codificante de otros genes relacionados con HSCR (*NTN3*, *GDNF*, *ARTN*, *PSPN*, *NRTN*, *EDNRB*, *SOX10* (OMIM 602229) o *PHOX2B* (OMIM 603851)), en ninguno de estos pacientes. Sin embargo, se detectó la presencia en *EDN3* en heterocigosis de la mutación c.560insA (Figura D.10) únicamente en el paciente que presentaba el fenotipo más agresivo (ATC, Figura D.11, individuo III.2). Esta mutación fue heredada por su madre sana, y estaba presente en otros 3 familiares no afectados, aunque no se detectó en ninguno de los 150 individuos controles testados (Sánchez-Mejías et al., 2009a). La inserción encontrada se localiza en el dominio EDN3-like de la preproendotelina, en una región que se pierde durante el procesamiento proteolítico de EDN3 y, por lo tanto, no está presente en la forma madura y funcional de la proteína. Curiosamente, esta mutación había sido descrita con

anterioridad asociada a CCHS (Bolk et al., 1996), una enfermedad que en raras ocasiones se presenta en combinación con HSCR, siendo esta la primera vez que aparece asociada a Hirschsprung aislado.

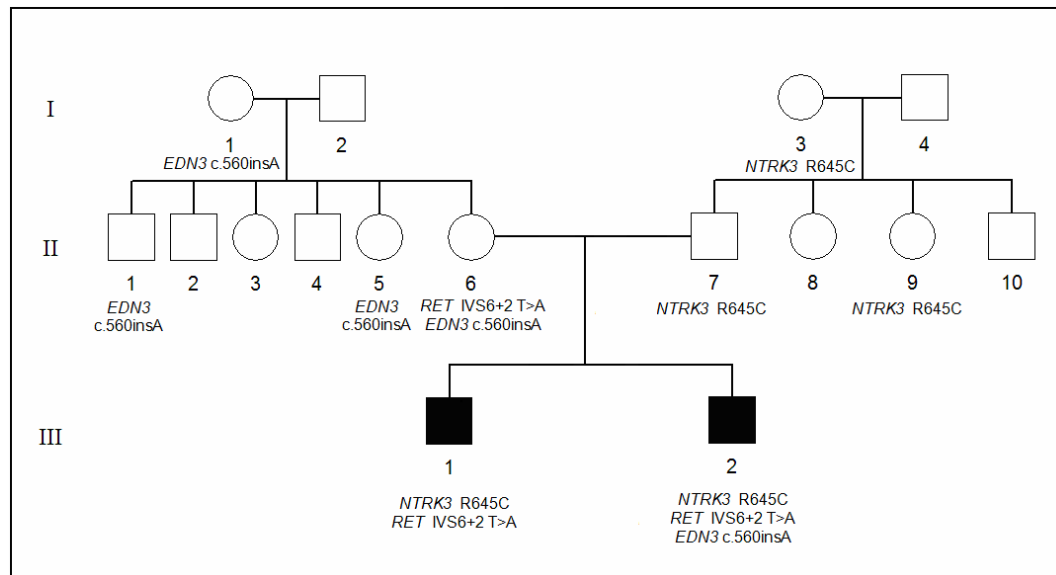


Figura D.11 Pedigrí de la familia HSCR múltiple portadora de mutaciones en *RET*, *NTRK3* y *EDN3*, en la que se muestra la segregación de las 3 mutaciones.

Al estudiar el impacto de c.560insA en la proteína, comprobamos que esta inserción generaría cambios a nivel proteico en 2 de las 3 isoformas que se conocen para EDN3. En la isoforma 1 la inserción generaría un codón de parada prematura de la traducción, dando lugar a una preproteína de 197 residuos de longitud. Por el contrario, en la isoforma 2, esta mutación lejos de generar una parada prematura de la traducción, resultaría en una proteína aberrante de 250 aminoácidos de longitud. La herramienta bioinformática GARNIER predijo que la proteína mutante tendría una secuencia en su extremo carboxi-terminal completamente distinta a la preproendotelina silvestre de 219 aminoácidos, a partir de la posición 188 hasta el final, lo que probablemente daría lugar a una estructura distinta (Figura D.12).

Como se muestra en la figura D.11 existen portadores sanos de las mutaciones en *EDN3*, *NTRK3* y *EDN3+RET* dentro de esta familia. Sin embargo, la combinación de mutaciones en *RET+NTRK3* sólo se observa en individuos afectados, apareciendo además la mutación *EDN3* únicamente en el paciente con el fenotipo HSCR más agresivo.



Figura D.12 Predicción de la estructura secundaria de la EDN3 a partir de su estructura primaria mediante la herramienta GARNIER. Comparación de la proteína silvestre (izquierda) con la proteína mutante T189NfsX63 (c.560insA; derecha), la diferencia con respecto a la proteína silvestre, tanto en la estructura primaria como en la secundaria, se ha resaltado mediante un cuadro rojo.

D.5.3. Evaluación de variantes de secuencia de los genes EDNRB y EDN3 como factores de susceptibilidad para HSCR esporádico

Se analizaron las distribuciones alélicas y genotípicas de 6 SNPs, 3 distribuidos a lo largo del gen *EDNRB* y 3 en *EDN3* en un grupo de pacientes HSCR y de controles, con el fin de evaluarlos como factores de susceptibilidad para la enfermedad de Hirschsprung. Este estudio clásico de casos y controles nos permitió realizar no sólo la evaluación de los SNPs de manera independiente sino también de los haplotipos constituidos por ellos, aportando una información mucho más rica sobre la implicación de ambos genes en HSCR.

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en la distribución de ninguna de las variantes analizadas en *EDNRB* (Tabla D.9), así como de los haplotipos generados por su combinación (Sánchez-Mejías et al., 2010a). De la misma forma, tampoco se encontraron diferencias significativas en el análisis de TDT (Sánchez-Mejías et al., 2010a). Cabe destacar, con respecto al polimorfismo c.561C>T, que no detectamos ningún alelo 561T entre nuestros pacientes HSCR con Síndrome de Down, en contra de los datos que habían sido publicado con anterioridad (Zaahl et al., 2003).

Tabla D.9 Distribución y frecuencia alélica y genotípica de las variantes de *EDNRB* genotipadas en pacientes HSCR y controles y su comparación.

		Variante	HSCR (%)	Controles (%)
Distribución Alélica	c.484-4125C>T	C	186 (84,5%)	170 (83,3%)
		T	34 (15,5%)	34 (16,7%)
	$\chi^2=0,06$, $p=0,8089450$			
	I187I	C	219 (99,5%)	202 (100%)
		T	1 (0,5%)	0 (0%)
	Fisher's $p=1$			
	c.+1985G>A	G	188 (88,7%)	172 (86%)
A		24 (11,3%)	28 (14%)	
$\chi^2=0,67$, $p=0,4131014$				
Distribución Genotípica	c.484-4125C>T	CC	79 (71,2%)	70 (69,6%)
		CT	29 (26,1%)	30 (29,4%)
		T	3 (2,7%)	2 (2%)
	$\chi^2=0,25$, $p=0,6147920$			
	I187I	CC	109 (99,1%)	101 (100%)
		CT	1 (0,9%)	0 (0)
		TT	0 (0)	0 (0)
	Fisher's $p=1$			
	c.+1985G>A	GG	82 (87,4%)	72 (72%)
		GA	24 (22,6%)	28 (28%)
AA		0 (0)	0 (0)	
$\chi^2=0,78$, $p=0,3762405$				

Obtuvimos resultados muy similares tras el análisis de la distribución alélica y genotípica en 2 de los 3 polimorfismos de *EDN3* analizados (c.366-3935 C>G, c.*231+236 G>A). Sin embargo, encontramos una asociación estadísticamente significativa del alelo c.365+7474T a HSCR al comparar tanto la distribución alélica como genotípica entre casos y controles (Distribución genotípica: (TT, 55,0% vs 40,0%; TC 31,2% vs 41,0%; CC 13,8% vs 19,0%), $\chi^2= 4,87$, $p= 0,088$; Distribución alélica: (80,5% vs 63,5%), $\chi^2= 4,90$, $p=0,027$). Un análisis posterior de los datos haplotípicos reveló que dicha diferencia se debía a una sobre-

representación de un determinado haplotipo de EDN3 (c.365+7474T, c.366-3935C, c.*231+236A) en el grupo de pacientes HSCR ($\chi^2=4,84$, $p=0,028$) (Sánchez-Mejías et al., 2010a).

D.6. Evaluación de los genes implicados en las rutas de señalización de GDNF-GFR α 1-RET como genes de susceptibilidad para DNI B

D.6.1. Rastreo mutacional de la secuencia codificante de EDNRB y EDN3 en pacientes DNI B

El rastreo mutacional de la región codificante de los genes *EDNRB* y *EDN3* en 23 pacientes con DNI B aislado reveló la presencia de 9 variantes de secuencia, 3 de las cuales no habían sido descritas con anterioridad (Tabla D.10). Tanto las variantes intrónicas como las sustituciones sinónimas, resultaron no tener ningún impacto sobre la transcripción o la maduración del mRNA según nuestras predicciones *in silico*.

El resultado más interesante del rastreo de estos dos genes, fue la sustitución conservativa de serina por asparragina en el codón 305 de *EDNRB* en 2 de nuestros pacientes en heterocigosis. Este cambio fue descrito por primera vez por Auricchio et al. en un paciente HSCR, proponiéndose como mutación causante de la enfermedad debido, por una parte, a la hipotética disrupción de un sitio putativo de fosforilación en la proteína, y por otra, a su ausencia en 50 individuos controles testados (Auricchio et al., 1996). Sin embargo, en el presente trabajo se han rastreado un total de 150 individuos control, detectándose la variante S305N en heterocigosis en 5 de ellos. Estos resultados concuerdan con los datos disponibles de frecuencia genotípica de este cambio para población Europea (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). Por lo tanto, parece más probable que este cambio se corresponda con un polimorfismo raro no asociado a HSCR, ni tampoco a DNI B.

Tabla D.20 Variantes de secuencia detectadas en el rastreo mutacional de los genes *EDNRB* y *EDN3* en los pacientes DNI B

Gen	Sustitución Nucleotídica	Sustitución Aminoacídica	Nueva/Previamente descrita	Frecuencia alélica en controles (%)
<i>EDNRB</i>	c.732G>A	T244T	Nueva	0,5
	c.802-139A>G		Nueva	0
	c.802-122T>C		rs9530703	6,7
	c.831A>G	L277L	rs5351	56,5
	c.914G>A	S305N	rs5352	2,3
<i>EDN3</i>	c.53-57C>T		Nueva	4
	c.365+23G>A		rs11570257	4
	c.621-80T>C		rs11570349	0
	c.*240delCC		rs34516274	28,5

D.6.2. Evaluación de variantes de secuencia de los genes EDNRB y EDN3 como factores de susceptibilidad para DNI B

Se genotiparon 3 SNPs de *EDNRB* y 3 de *EDN3* mediante tecnología TaqMan en los grupos de pacientes con DNI B aislado, HSCR aislado y DNI B+HSCR y en un grupo de controles. Tras el análisis de la distribución alélica y genotípica de estos polimorfismos no encontramos diferencias significativas entre el grupo de DNI B y el grupo de DNI B+HSCR, ni entre ninguno de estos dos grupos de pacientes y controles o pacientes HSCR aislados, a excepción de lo que ocurría con la distribución alélica de la variante de *EDN3* c.366-3935C>G al comparar el grupo de HSCR+DNI B con controles (Tabla D.11). Esta diferencia estadísticamente significativa se debe, más bien, a una asociación de este polimorfismo con el fenotipo HSCR por sí mismo, como veremos más adelante.

De la misma manera, tampoco se encontraron diferencias significativas en la distribución de los haplotipos conformados por dichos polimorfismos. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de TDT.

Tabla D.31 Distribución alélica (A) y genotípica (B) y frecuencia de las variantes de *EDNRB* y *EDN3* genotipadas en los distintos grupos de pacientes, comparando dos a dos.

(A)

Gen	Variante	DNI B vs. HSCR+DNI B (%)		DNI B vs. HSCR (%)		DNI B vs. Controles (%)		HSCR+DNI B vs. HSCR (%)		HSCR+DNI B vs. Controles		
EDNRB	c.484-4125C>T	C	37 (80,4)	47 (90,4)	37 (80,4)	186 (84,5)	37 (80,4)	170 (83,3)	47 (90,4)	186 (84,5)	47 (90,4)	170 (83,3)
		T	9 (19,6)	5 (10,6)	9 (19,6)	34 (15,5)	9 (19,6)	34 (16,7)	5 (10,6)	34 (15,5)	5 (10,6)	34 (16,7)
			$\chi^2=1,24, p=0,2646131$		$\chi^2=0,40, p=0,5266483$		$\chi^2=0,22, p=0,63794669$		$\chi^2=2,50, p=0,1136957$		$\chi^2=1,60, p=0,2065481$	
	I187I	C	46 (100)	50 (96,1)	46 (100)	219 (99,5)	46 (100)	202 (100)	50 (96,1)	219 (99,5)	50 (96,1)	202 (100)
		T	0 (0)	2 (3,9)	0 (0)	1 (0,5)	0 (0)	0 (0)	2 (3,9)	1 (0,5)	2 (3,9)	0 (0)
			Fisher's p=0,9836726		Fisher's p=1		No Aplicable		Fisher's p=0,0946084		Fisher's p=0,0412686	
	c.+1985G>A	G	35 (87,5)	44 (88)	35 (87,5)	188 (88,7)	35 (87,5)	172 (86)	44 (88)	188 (88,7)	44 (88)	172 (86)
A		5 (12,5)	6 (12)	5 (12,5)	24 (11,3)	5 (12,5)	28 (14)	6 (12)	24 (11,3)	6 (12)	28 (14)	
		$\chi^2=0,01, p=0,9426331$		$\chi^2=0,05, p=0,8302636$		$\chi^2=0,06, p=0,8014447$		$\chi^2=0,02, p=0,8920718$		$\chi^2=0,14, p=0,7121232$		
EDN3	c.365+7474T>C	T	32 (66,7)	34 (65,4)	32 (66,7)	154 (80,5)	32 (66,7)	127 (63,5)	34 (65,4)	154 (80,5)	34 (65,4)	127 (63,5)
		C	16 (33,3)	18 (34,6)	16 (33,3)	64 (19,5)	16 (33,3)	73 (36,5)	18 (34,6)	64 (19,5)	18 (34,6)	73 (36,5)
			$\chi^2=0,02, p=0,8924440$		$\chi^2=0,30, p=0,5866268$		$\chi^2=0,63, p=0,4262079$		$\chi^2=0,55, p=0,4588029$		$\chi^2=0,42, p=0,5149986$	
	c.366-3935C>G	C	37 (80,4)	36 (66,7)	37 (80,4)	182 (75,9)	37 (80,4)	176 (83,8)	36 (66,7)	182 (75,9)	36 (66,7)	176 (83,8)
		G	9 (19,6)	18 (33,3)	9 (19,6)	38 (24,1)	9 (19,6)	34 (16,2)	18 (33,3)	38 (24,1)	18 (33,3)	34 (16,2)
			$\chi^2=2,39, p=0,1221927$		$\chi^2=0,14, p=0,7108324$		$\chi^2=0,31, p=0,5792162$		$\chi^2=6,88, p=0,012727$		$\chi^2=7,98, p=0,004727 \leftarrow$	
	c.*231+236G>A	G	32 (69,6)	36 (66,7)	32 (69,6)	169 (76,8)	32 (69,6)	156 (83,9)	36 (66,7)	169 (76,8)	36 (66,7)	156 (83,9)
A		14 (30,4)	18 (33,3)	14 (30,4)	51 (23,2)	14 (30,4)	30 (16,1)	18 (33,3)	51 (23,2)	18 (33,3)	30 (16,1)	
		$\chi^2=0,10, p=0,7567967$		$\chi^2=1,08, p=0,2978297$		$\chi^2=2,16, p=0,1415837$		$\chi^2=2,37, p=0,1235671$		$\chi^2=8,24, p=0,040960$		

(B)

Gen	Variante	DNI B vs. HSCR+DNI B (%)		DNI B vs. HSCR (%)		DNI B vs. Controles (%)		HSCR+DNI B vs. HSCR (%)		HSCR+DNI B vs. Controles		
EDNRB	c.484-4125C>T	CC	16 (69,6)	22 (84,6)	16(69,6)	79 (71,2)	16 (69,6)	70 (69,6)	22 (84,6)	79 (71,2)	22 (84,6)	70 (69,6)
		CT	5 (21,7)	3 (11,5)	5 (21,7)	29 (26,1)	5 (21,7)	30 (29,4)	3 (11,5)	29 (26,1)	3 (11,5)	30 (29,4)
		T	2 (8,7)	1 (3,9)	2 (8,7)	3 (2,7)	2 (8,7)	2 (2)	1 (3,9)	3 (2,7)	1 (3,9)	2 (2)
			Fisher's p=0,4390289		$\chi^2=0,08, p=0,7721618$		$\chi^2=0,32, p=0,5695065$		Fisher's p=0,1915922		$\chi^2=0,25, p=0,6147920$	
	I187I	CC	23 (100)	24 (92,3)	23 (100)	109 (99,1)	23 (100)	101 (100)	24 (92,3)	109 (99,1)	24 (92,3)	101 (100)
		CT	0 (0)	2 (7,7)	0 (0)	1 (0,9)	0 (0)	0 (0)	2 (7,7)	1 (0,9)	2 (7,7)	0 (0)
		T	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
			Fisher's p=0,4914966		Fisher's p=1		NA		Fisher's p=0,0935275		Fisher's p=0,0406199	
	c.+1985G>A	GG	15 (75,5)	19 (76)	15(75,5)	82 (87,4)	15 (75,5)	72 (72)	19 (76)	82 (87,4)	19 (76)	72 (72)
		GA	5 (25,5)	6 (24)	5 (25,5)	24 (22,6)	5 (25,5)	28 (28)	6 (24)	24 (22,6)	6 (24)	28 (28)
AA		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
		$\chi^2=0,01, p=0,9381756$		$\chi^2=0,05, p=0,8302636$		$\chi^2=0,08, p=0,7838616$		$\chi^2=0,02, p=0,8843873$		$\chi^2=0,16, p=0,6876848$		
EDN3	c.365+7474T>C	TT	10 (41,7)	11 (42,3)	10(41,7)	60 (55)	10 (41,7)	42 (40)	11 (42,3)	60 (55)	11 (42,3)	42 (40)
		TC	12 (50)	12 (46,2)	12 (50)	34 (31,2)	12 (50)	43 (41)	12 (46,2)	34 (31,2)	12 (46,2)	43 (41)
		CC	2 (8,3)	3 (11,5)	2 (8,3)	15 (13,8)	2 (8,3)	20 (19)	3 (11,5)	15 (13,8)	3 (11,5)	20 (19)
			$\chi^2=0,03, p=0,8733512$		$\chi^2=3,13, p=0,0767686$		$\chi^2=1,70, p=0,19267582$		$\chi^2=2,10, p=0,14914955$		$\chi^2=0,83, p=0,36600428$	
	c.366-3935C>G	CC	14 (60,9)	12 (46,1)	14(60,9)	75 (68,2)	14 (60,9)	75 (60)	12 (46,1)	75 (68,2)	12 (46,1)	75 (60)
		CG	9 (39,1)	12 (46,1)	9 (39,1)	32 (29,1)	9 (39,1)	46 (36,8)	12 (46,1)	32 (29,1)	12 (46,1)	46 (36,8)
		GG	0 (0)	2 (7,8)	0 (0)	3 (2,7)	0 (0)	4 (3,2)	2 (7,8)	3 (2,7)	2 (7,8)	4 (3,2)
			$\chi^2=0,56, p=0,4536987$		$\chi^2=1,40, p=0,23628003$		$\chi^2=0,01, p=0,9197185$		$\chi^2=0,01, p=0,08639574$		$\chi^2=7,98, p=0,0047277$	
	c.*231+236G>A	GG	11 (47,8)	12 (46,1)	11(47,8)	66 (60)	11 (47,8)	61 (62,2)	12 (46,1)	66 (60)	12 (46,1)	61 (62,2)
		GA	10 (43,5)	12 (46,1)	10(43,5)	37 (33,6)	10 (43,5)	34 (34,7)	12 (46,1)	37 (33,6)	12 (46,1)	34 (34,7)
AA		2 (8,7)	2 (7,8)	2 (8,7)	7 (6,4)	2 (8,7)	3 (3,1)	2 (7,8)	7 (6,4)	2 (7,8)	3 (3,1)	
		Fisher's p=0,8890726		$\chi^2=1,16, p=0,285955014$		$\chi^2=1,02, p=0,3119877$		$\chi^2=1,67, p=0,19309407$		$\chi^2=1,63, p=0,2014779$		

D.7. Análisis molecular y funcional del gen *SOX10* en pacientes HSCR

D.7.1. Rastreo mutacional y de grandes deleciones de la secuencia codificante del gen *SOX10* en pacientes HSCR

La asociación de mutaciones en el gen *SOX10* con la aparición de formas sindrómicas de HSCR es bien conocida y ha sido documentada en numerosas ocasiones. Sin embargo, no se han encontrado mutaciones en este gen responsables de los casos no sindrómicos de esta enfermedad, a pesar del rastreo llevado a cabo en una cohorte de pacientes de origen francés (Pingault et al., 1998). En este trabajo hemos realizado un estudio molecular completo de *SOX10*, en una cohorte más amplia de pacientes, con el objetivo de evaluar su implicación en HSCR aislado.

Tabla D.12 Variantes de secuencia detectadas en el rastreo de *SOX10* en nuestra serie de pacientes HSCR.

Sustitución Nucleotídica	Sustitución Aminoacídica	Nueva/Previamente descrita	Frecuencia alélica en controles (%)
c.-84-55G>T		Nueva	0
c.-84-54G>A		Nueva	0
c.-20C>G		Nueva	0
c.18C>T	D6D	Nueva	4,95
c.112_132del	G38Qfs21X	Nueva	0
c.153del	G52Afs56X	Nueva	0
c.249C>T	Y83Y	Nueva	0,50
c.684C>T	P228P	Nueva	0
c.822C>T	G274G	Nueva	0
c.927T>C	H309H	rs139884	56,98
c.1257T>C	S419S	Nueva	0
c.*131G>A		Nueva	0

En el presente trabajo se analizó la región codificante de *SOX10* en 196 pacientes HSCR, mediante dHPLC, para la detección de mutaciones puntuales o pequeñas inserciones/deleciones, y mediante QMF-PCR, para detectar grandes deleciones que afectasen a uno o más exones. No detectamos ninguna anomalía en la dosis génica en nuestra serie de pacientes HSCR, pero sí que se observó la presencia de 12 variantes de secuencia en la región rastreada en nuestros pacientes (Tabla D.12; Sánchez-Mejías et al., 2010b). 10 de las 12 variantes consistieron en sustituciones sinónimas, cambios intrónicos o variantes localizadas en las regiones no traducidas del gen. Ninguna de estas variantes genera alteraciones en la secuencia proteica, y tampoco se encontraron evidencias *in silico*

de que provocasen ninguna alteración de la estabilidad del mensajero, ni en su proceso de maduración.

El hallazgo más interesante de este estudio fue la presencia de dos mutaciones nuevas en *SOX10*, c.112_131del y c.153del, en heterocigosis, en dos de nuestros pacientes (Figura D.13). Ambas mutaciones son responsables de la pérdida de la pauta de lectura en el mRNA, dando lugar a una secuencia proteica completamente diferente a partir de las posiciones 37 y 52 respectivamente. Además, ambas mutaciones introducen en la secuencia del mRNA una señal de parada prematura de la traducción en las posiciones 58 y 108 respectivamente. Como resultado, se generaran dos proteínas truncadas en las que no existe el dominio HMG de unión a DNA, ni las dos señales de localización nuclear que posee este dominio, ni el dominio de transactivación en la región carboxi-terminal (Figura D.14), todos ellos esenciales para el correcto funcionamiento de la proteína. Una de estas dos mutaciones (c.112_131del) se detectó, como una mutación *de novo*, en una paciente WS4. Por el contrario, la mutación c.153del se encontró en un paciente con HSCR aislado.

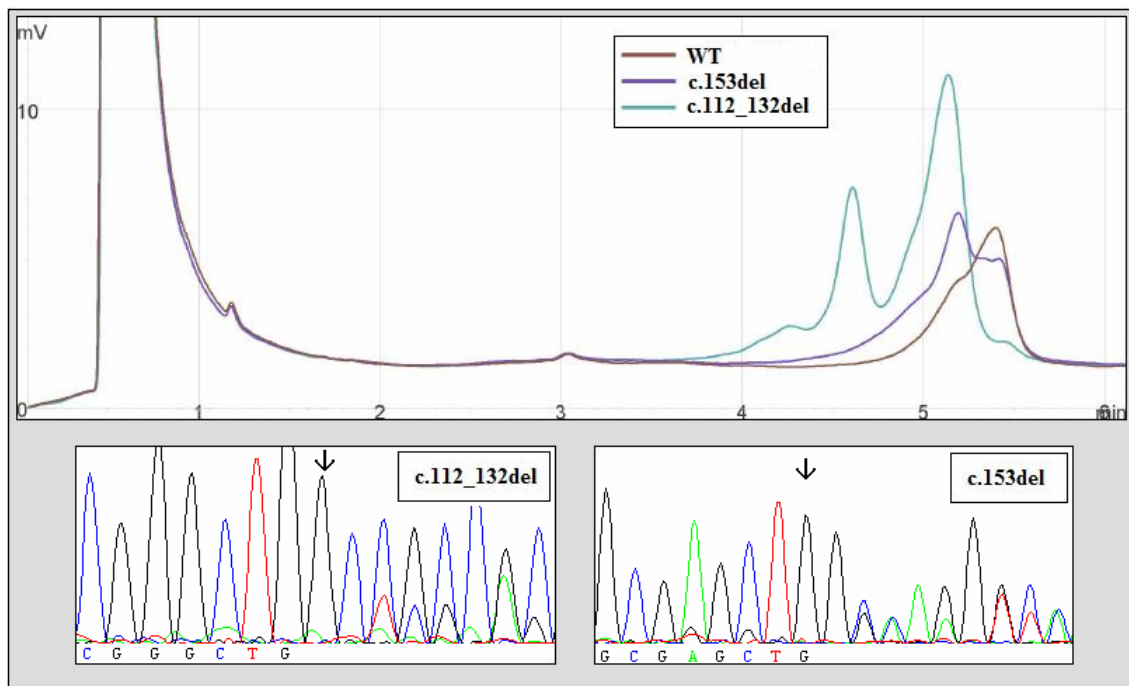


Figura D.13 Perfiles de elución de la cromatografía líquida de alta presión en condiciones desnaturizantes y análisis de la secuencia nucleotídica en los pacientes portadores de las mutaciones en *SOX10* c.112_132del (G38Qfs21X) y c.153del (G52Afs56X), junto a un control negativo (WT). La flecha señala el primer nucleótido de la secuencia que es delecionado.

Debido a que ésta es la primera vez que se reporta una mutación truncante en *SOX10* en un paciente que no presenta ninguna manifestación fenotípica más

allá de la aganglionosis del colon, se llevó a cabo una inspección detallada de los datos clínicos de este paciente. Este examen no detectó ninguna otra alteración fenotípica, asociadas a mutaciones en *SOX10*, tales como, alteraciones pigmentarias, heterocromía del iris, sordera, pseudo-obstrucción intestinal crónica, coloboma del nervio óptico, lesiones en los nervios, neuropatía periférica desmielinizante o leucodistrofia central desmielinizante (Inoue et al., 2004; Verheij et al., 2006). La mutación fue heredada de su madre sana y en el paciente no se habían encontrado otras mutaciones puntuales en otros genes de susceptibilidad para HSCR, como *RET*, *GDNF*, *NRTN*, *PSPN*, *ARTN*, *EDNRB*, *EDN3*, *NTF3*, *NTRK3* o *PHOX2B* (Sánchez-Mejías et al., 2010b).

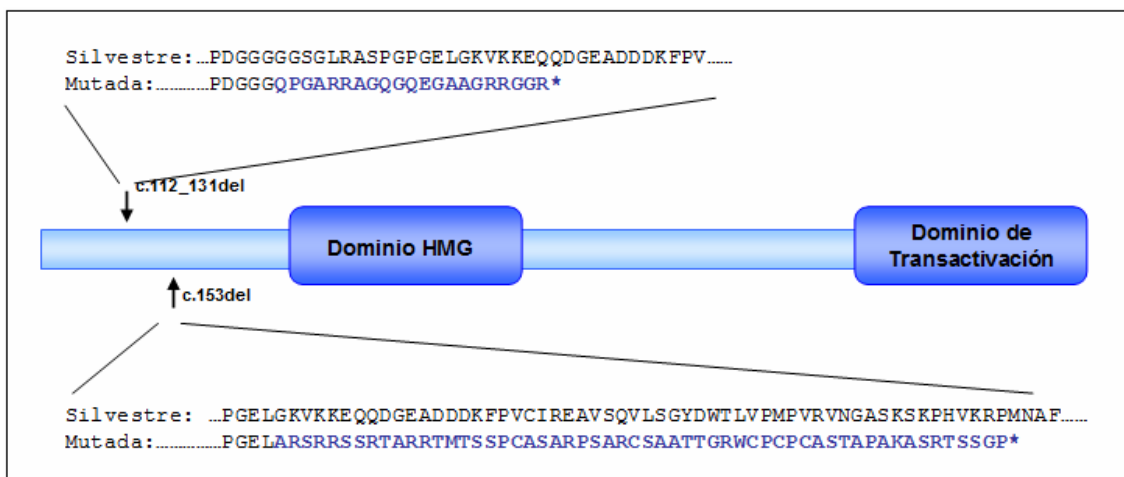


Figura D.14 Representación de la proteína SOX10 incluyendo en dominio HMG y el dominio de transactivación, que muestra las secuencias de las dos mutaciones de pérdida de la pauta de lectura, encontradas en un paciente WS4 y otro con HSCR aislado respectivamente.

D.7.2. Estudio funcional de las mutaciones encontradas en nuestra serie de pacientes

Con el objetivo de comprobar las consecuencias funcionales de las dos mutaciones de *SOX10* que se presentan en este trabajo, (c.112_131del y c.153del) lo primero que hicimos fue comprobar la localización celular de ambas proteínas mutantes y compararla con la proteína silvestre. Para ello introdujimos ambas mutaciones, de manera independiente, en el cDNA de *SOX10* y llevamos a cabo experimentos de inmuno-fluorescencia sobre células HeLa transfectadas de forma transitoria con cada una de las construcciones de *SOX10* silvestre y mutante. Los resultados revelaron una localización celular aberrante para ambas proteínas

Resultados

mutantes que se encuentran tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula, en contraposición con lo observado para la proteína silvestre, cuya localización se restringe únicamente al núcleo (Figura D.15; Sánchez-Mejías et al., 2010b). Debido al reducido tamaño de ambas proteínas mutantes, y con el objetivo de evitar un posible fallo en el reconocimiento de las proteínas aberrantes por el anticuerpo usado, replicamos el experimento utilizando una construcción myc-SOX10 y se obtuvieron los mismos resultados (Figura D.15). La presencia de proteínas mutantes en el núcleo, además de en el citoplasma, podría esperarse debido al pequeño tamaño de las mismas. Se sabe que las proteínas por debajo de 40kDa cruzan los complejos proteicos que conforman los poros nucleares mediante difusión pasiva (Görlich et al., 1996). La predicción de masa molecular, realizada mediante el programa Compute pI/Mw de Expasy, para nuestras proteínas mutantes fue de 5,76 y 10,67 kDa respectivamente (2,5 kDa adicionales en el caso de myc-SOX10), explicando la presencia de ambas en el núcleo.

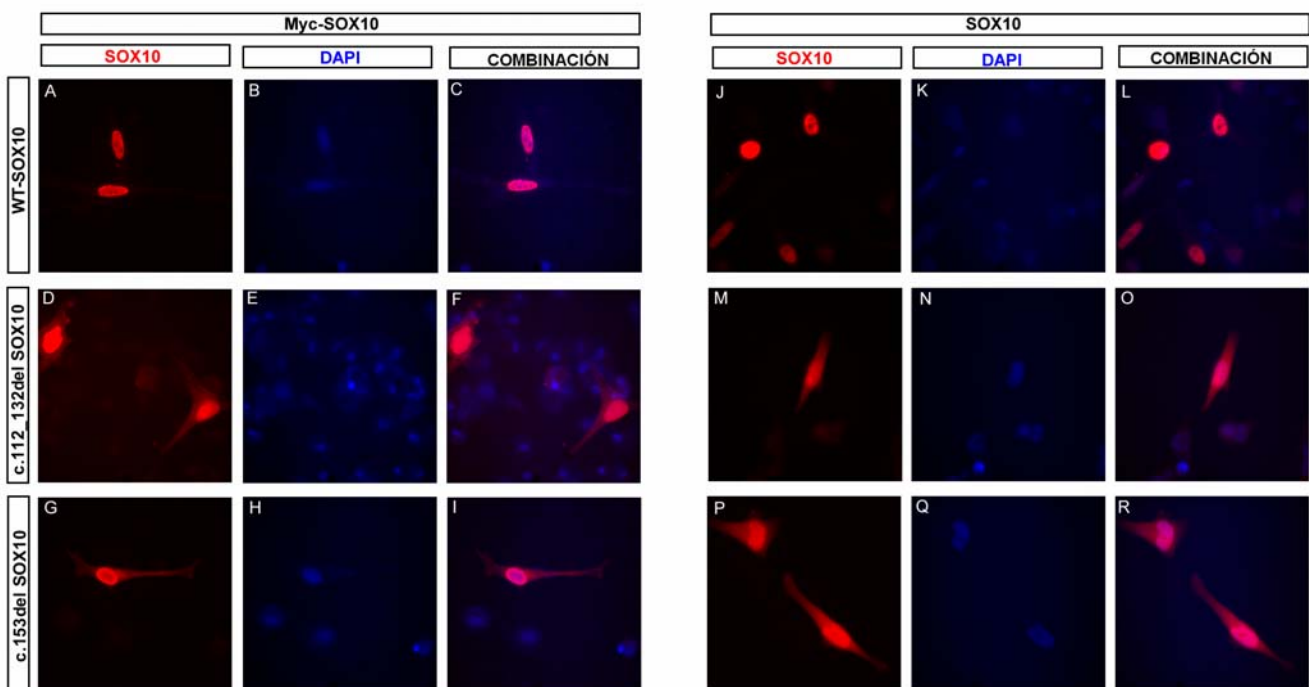


Figura D.15 Localización subcelular de la proteína SOX10 tanto silvestre (WT) como mutantes (c.112_132del y c.153del) en células HeLa transfectadas de manera transitoria con los vectores de expresión de Myc-SOX10 y SOX10. La señal roja se corresponde con SOX10, y la fluorescencia de DAPI se corresponde con el núcleo en azul

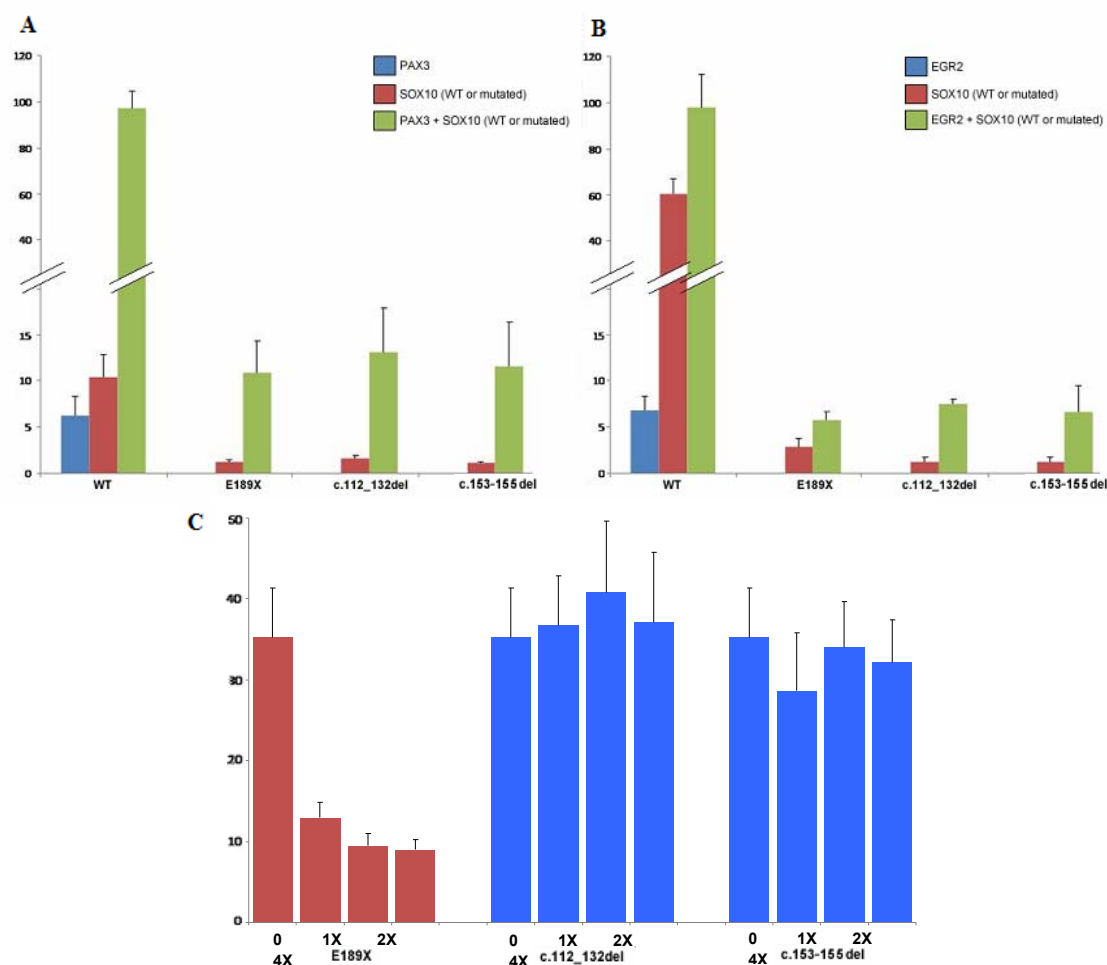


Figura D.12 Capacidad de transactivación de las proteínas SOX10 silvestre y mutantes. El gen reportero de la luciferasa bajo la acción del promotor de MITF (pMITF) (A) o de GJB1 (pCx32) (B) fue transfectado en células HeLa en combinación con las proteínas SOX10 silvestre (WT) o mutantes (c.112_132del, c.153del y E189X), y/o PAX3 (A) o ERG2 (B). El ensayo de competición se llevó a cabo incrementando la cantidad (1X, 1X y 4X) de plásmido SOX10 mutante (E189X, c.112_132del, o c.153del), que se mezcló con una cantidad fija de plásmido SOX10 silvestre y se cotransfectó con el gen reportero de la luciferasa bajo la acción del promotor GJB1 (C). La activación del gen reportero se presenta como número de veces que aumenta la inducción del gen con respecto a la inducción del vector vacío (pECE), que se considera el nivel basal de expresión. El resultado representa la media \pm SEM obtenida en 3 ensayos independientes, cada uno de ellos realizado por duplicado.

Para confirmar que la presencia de las proteínas mutantes en el núcleo no era funcional, analizamos la capacidad de transactivación de ambas proteínas mutantes en dos promotores que habían demostrado contener sitios de unión a SOX10 en su forma monomérica y dimérica, MITF y Cx32 respectivamente (Bondurand et al., 2000; 2001), mediante ensayo de expresión del gen de la luciferasa. La contranfección de cualquiera de los dos promotores junto con la construcción c.112_131del, c.153del, o silvestre de SOX10 y/o los cofactores de

SOX10 (PAX3 y EGR2 según el caso), reveló que ambas mutaciones son incapaces de transactivar a esta construcción, tanto de manera independiente como en sinergia con su cofactor, ya que la activación del promotor se redujo drásticamente (Figura D.16A y B). Para determinar la habilidad de las distintas proteínas mutantes de interactuar con SOX10 silvestre y modificar su funcionalidad, realizamos un ensayo de competición contranfectando SOX10 silvestre y mutantes junto con la construcción del gen reportero. Como ya había sido descrito con anterioridad, el mutante E189X hizo decrecer la actividad transcripcional de la proteína silvestre de manera dosis dependiente (Inoue et al., 2004; Figura D.16C). Sin embargo, las dos mutaciones que se presenta en este trabajo no mostraron dicho efecto (Figura D.16C). La ausencia de un efecto negativo dominante en estos mutantes podría explicar porque están asociadas a un fenotipo menos agresivo.

D.7.3. Evaluación de variantes de secuencia del gen SOX10 como factores de susceptibilidad para HSCR esporádico

Se seleccionaron un total de 3 SNPs para llevar a cabo la evaluación de polimorfismos/haplotipos como factores de susceptibilidad para HSCR. Dos de ellos (c.428+1517 C>T, c.-84-1697 G>C) eran TagSNPs descritos para este gen, mientras que el tercero, H309H (rs139884), fue el único SNP detectado en el rastreo mutacional de la región codificante de este gen. Posteriormente se analizó la distribución alélica y genotípica de estos 3 SNPs en los grupos HSCR y control (Tabla D.13). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de ninguna de estas variantes, o de los haplotipos generados que las comprendían. De la misma manera, no se obtuvieron diferencias significativas en el análisis por TDT.

Cabe destacar la tendencia hacia la sobre-representación del alelo H309 (c.927T) al comparar tanto la frecuencia alélica como la genotípica en casos frente a controles, aunque no se alcanzó significación estadística (Distribución genotípica: (TT, 39% vs 32%; TC 52% vs 49%; CC 9% vs 19%), $\chi^2= 4,75$, $p= 0,093$; Distribución alélica: (65% vs 57%), $\chi^2= 3,05$, $p=0,080$).

Tabla D.13 Distribución y frecuencia alélica y genotípica de las variantes de *SOX10* genotipadas en pacientes HSCR y controles y su comparación.

	Variante		HSCR (%)	Controles (%)	
Distribución Alélica	c.-84-1697G>C	G	206 (94,5%)	166 (95,4%)	
		C	12 (5,5%)	8 (4,6%)	
	$\chi^2=0,16$, $p=0,6851640$				
	c.428+1517C>T	C	213 (99,5%)	181 (99,9%)	
		T	1 (0,5%)	1 (0,1%)	
	Fisher's $p=1$				
	H309H	T	144 (64,9%)	98 (57%)	
		C	78 (11,3%)	74 (43%)	
$\chi^2=2,54$, $p=0,1106529$					
Distribución Genotípica	c.-84-1697G>C	GG	106 (99,1%)	90 (98,9%)	
		GC	1 (0,9%)	1 (1,1%)	
		CC	0 (0%)	0 (0%)	
	$\chi^2=0,16$, $p=0,6768355$				
	c.428+1517C>T	CC	97 (89%)	79 (90,8%)	
		CT	12 (11%)	8 (9,2%)	
		TT	0 (0%)	0 (0%)	
	Fisher's $p=1$				
	H309H	TT	50 (39,4%)	28 (32,6%)	
		TC	66 (52%)	42 (48,8%)	
		CC	11 (8,6%)	16 (18,6%)	
$\chi^2=4,01$, $p=0,13496039$					

D.8. Evaluación de los genes *SEMA3A* y *SEMA3D* como genes de susceptibilidad para HSCR

D.8.1. Rastreo mutacional de la secuencia codificante de *SEMA3A* y *SEMA3D* en pacientes HSCR

Con el fin de evaluar *SEMA3A* (OMIM 603961) y *SEMA3D* (OMIM 609907) como genes de susceptibilidad en HSCR, se realizó el rastreo mutacional de los 17 exones, y sus secuencias intrónicas flanqueantes, en 196 pacientes HSCR, mediante dHPLC. En total se han encontrado 39 variantes de secuencia en *SEMA3A* y 17 en *SEMA3D* (Tablas D.14 y D.15), de los cuales 28 y 11 respectivamente se localizaron en la región intrónica de dichos genes. De los 18 cambios en la región codificante sólo 6 se corresponden con sustituciones aminoacídicas que no han sido descritas con anterioridad. Uno de ellos es un polimorfismo K701Q (rs7800072) en *SEMA3D* y los 10 restantes fueron sustituciones sinónimas que en la mayor parte de los casos se correspondieron con polimorfismos descritos en población control. No encontramos evidencias de que ninguna de las variantes sinónimas o localizadas en la región intrónica, produjeran ninguna alteración en el proceso de transcripción, maduración o traducción, al someterlas a distintas herramientas bioinformáticas.


El hallazgo más interesante de este rastreo fue la detección en heretocigosis de 3 mutaciones en *SEMA3A* y 3 en *SEMA3D*, que no habían sido descritas con anterioridad (Tabla D.16). De entre ellas, 3 de estas mutaciones se localizaron en el dominio SEMA de las proteínas, A131T y V435I en *SEMA3A* y E198K en *SEMA3D*, un dominio funcional altamente conservado entre especies y entre las distintas proteínas de la familia de las semaforinas. La mutación A131T fue detectada en dos familias HSCR esporádico independientes y estaban ausentes en población control. De manera interesante, el análisis de segregación de una de estas familias reveló que la mutación A131T fue heredada por la madre mientras que de su padre heredó la mutación en *RET* R313W (Núñez-Torres et al, 2010). Una mutación que afecta a este mismo aminoácido (R313Q), fue descrita como asociada a HSCR (Seri et al., 1997). En cuanto a la variante V435I, además de detectarse en 3 de nuestros pacientes, resultó estar presente en nuestra población control. Curiosamente, uno de los pacientes portador de V435I, también lo fue de la mutación en *RET* A373V (Ruiz-Ferrer et al., 2006). La mutación E198K en *SEMA3D* se detectó en un paciente HSCR esporádico, y en su padre sano y resultó ausente en nuestra población control.

Tabla D.14 Variantes de secuencia detectadas en *SEMA3A* en nuestros pacientes HSCR.

Sustitución Nucleotídica	Sustitución Aminoacídica	Nueva/Previamente descrita	Frecuencia alélica en controles (%)
c.112+52del		Nueva	0
c.112+52 C>G		Nueva	0
c.112+63 T>C		rs13231702	0
c.113-110 A>C		rs12671857	52,2
c.113-42 G>C		rs17241389	0
c.201T>C	S67S	Nueva	1
c.267A>G	Q89Q	Arnold et al., 2009	0
c.270+96A>G		Nueva	0
c.333+84T>A		Nueva	0
c.333+92G>T		rs6955597	0,3
c.334-24delTT		Nueva	0
c.391G>A	A131T	Nueva	0
c.453+24A>G		rs1990044	47,9
c.547+167G>A		rs2527039	15,8
c.548-45C>T		Nueva	0
c.548-67T>C		Nueva	1
c.548-79G>C		Nueva	0
c.548-92 T>C		Nueva	0
c.668-199_201del		Nueva	2,5
c.668-138A>T		Nueva	0
c.668-20 C>T		rs2272221	10,5
c.668-14 T>A		rs2272222	2,2
c.705T>C	S235S	rs34541339	6,8
c.732C>T	Y244Y	Nueva	0
c.811-139C>T		Nueva	0
c.945C>T	N315N	Nueva	0
c.1140+46C>G		Nueva	0
c.1302T>C	I434I	Nueva	15
c.1303G>A	V435I	Arnold et al., 2009	3
c.1361-52T>A		rs10250165	23,8
c.1361-14A>G		rs3735513	14,7
c.1453-9delA		Nueva	0
c.1495+132A>C		rs17246251	61,5
c.1563G>C	G521G	rs10487865	0
c.1652-85insTA		Nueva	0
c.1653-6C>T		rs701320	84
c.1792A>G	S598G	Nueva	0
c.1860+30A>G		rs7809708	26,5
c.2151A>G	T717T	rs797821	32,5

Las otras 3 sustituciones no sinónimas detectadas en el presente trabajo están localizadas en el dominio funcional Ig-Like de la proteína. Este dominio es fundamental para la funcionalidad de la proteína, ya que es el dominio de unión al receptor. Se predice que la presencia de la sustitución S598G en *SEMA3A*, adyacente a una cisteína que forma uno de los puentes disulfuro en la proteína (ScanProSite), provocaría la pérdida completa de este enlace, según el programa

informático DiANNA (Figura D.15), y por lo tanto la proteína no se plegará correctamente. Esta mutación aparece *de novo* en una paciente con HSCR esporádico en la que concurre la presencia de la mutación en *RET* W543R y resultó ausente en población control. Sin embargo la variante P615T de *SEMA3D*, presente en 4 pacientes HSCR, también fue detectada en población control, aunque en una frecuencia muy inferior a los casos HSCR, por lo que no podemos descartar que este cambio tenga algún impacto en la funcionalidad de la proteína, tal y como predice la herramienta Polyphen. Por último detectamos la presencia de la mutación R634Q de *SEMA3D* en 2 pacientes de manera independientes, que resultó estar ausente en población control.



[Software](#)
[Web Supplements](#)
[Home Page](#)
[Clote Lab](#)

Disulfide bond scores		
Cysteine sequence position	Bond	Score
535 - 649	ARDPYCAWDGS-SGNYLCHAVEH	0.58077
535 - 722	ARDPYCAWDGS-TMDEFCEQVWK	0.0107
542 - 567	WDGSACSRYP-DPLTHCSDLHH	0.01042
542 - 597	WDGSACSRYP-STFLECSPKSQ	0.01037
542 - 649	WDGSACSRYP-SGNYLCHAVEH	0.0104
542 - 722	WDGSACSRYP-TMDEFCEQVWK	0.01038
567 - 597	DPLTHCSDLHH-STFLECSPKSQ	0.01131
567 - 649	DPLTHCSDLHH-SGNYLCHAVEH	0.03112
567 - 722	DPLTHCSDLHH-TMDEFCEQVWK	0.01212
597 - 649	STFLECSPKSQ-SGNYLCHAVEH	0.81329
597 - 722	STFLECSPKSQ-TMDEFCEQVWK	0.01037
649 - 722	SGNYLCHAVEH-TMDEFCEQVWK	0.0104

Disulfide bond scores		
Cysteine sequence position	Bond	Score
535 - 649	ARDPYCAWDGS-SGNYLCHAVEH	0.61153
535 - 722	ARDPYCAWDGS-TMDEFCEQVWK	0.01071
542 - 567	WDGSACSRYP-DPLTHCSDLHH	0.01042
542 - 597	WDGSACSRYP-STFLECGPKSQ	0.01037
542 - 649	WDGSACSRYP-SGNYLCHAVEH	0.01039
542 - 722	WDGSACSRYP-TMDEFCEQVWK	0.01038
567 - 597	DPLTHCSDLHH-STFLECGPKSQ	0.01097
567 - 649	DPLTHCSDLHH-SGNYLCHAVEH	0.0502
567 - 722	DPLTHCSDLHH-TMDEFCEQVWK	0.01121
597 - 649	STFLECGPKSQ-SGNYLCHAVEH	0.11964
597 - 722	STFLECGPKSQ-TMDEFCEQVWK	0.01037
649 - 722	SGNYLCHAVEH-TMDEFCEQVWK	0.0104

Figura D.13 Resultados de la predicción de formación de puentes disulfuro para las cisteínas presentes en SEMA3A mediante DIANNA. Proteína silvestre en la parte superior de la imagen y mutante en la inferior. Se ha resaltado el enlace que implica a los residuos 597 y 649, que forman uno de los puentes disulfuro de la proteína y que se pierde con la mutación S598G (rojo).

Tabla D.45 Variantes de secuencia detectadas en *SEMA3D* en nuestros pacientes HSCR.

Sustitución Nucleotídica	Sustitución Aminoacídica	Nueva/Previamente descrita	Frecuencia alélica en controles (%)
c-151-158_154del		Nueva	1
c.376-32G>A		Nueva	0
c.496-12T>C		Nueva	0
c.589+37G>A		rs17159594	0
c.590-33T>A		Nueva	3,5
c.718+26T>C		Nueva	0
c.636C>T	D212D	Nueva	0
c.592G>A	E198K	Nueva	0
c.861+67_71del		rs56131427	4,8
c.1545+91G>A		rs7780132	28,3
c.1546-9 G>A		Nueva	0
c.1578C>T	L526L	rs17559084	43,8
c.1703+28G>C		rs6468008	27
c.1843C>A	P615T	Nueva	0,5
c.1901A>G	R634Q	Nueva	0
c.1906+147T>C		Nueva	0
c.2103G>T	K701Q	rs7800072	35,8

Tabla D.5 Mutaciones presumiblemente patogénicas detectadas en los genes *SEMA3A* y *SEMA3D* en nuestros pacientes HSCR aislados.

Gen	Sustitución Nucleotídica	Sustitución Aminoacídica	Género	Transmisión de la mutación	Presencia en otros miembros de la familia
SEMA3A	c.391G>A	A131T	Hombre	Paterna	No
			Hombre	Materna	No
	c.1303G>A	V435I	Hombre	Materna	Si
			Hombre	Materna	Si
			Mujer	Paterna	No
c.1792A>G	S598G	Hombre	Paterno	No	
SEMA3D	c.592G>A	E198K	Hombre	Paterno	No
			Hombre	Paterno	No
	c.1843C>A	P615T	Hombre	Materna	No
			Mujer	Materna	Si
			Hombre	Materna	No
	c.1901A>G	R634Q	Hombre	Paterno	No
			Mujer	Materna	No

Cabe destacar la presencia del haplotipo de riesgo de *RET* ya sea en homocigosis o heterocigosis, en todos los pacientes en los que se detectaron sustituciones no sinónimas en cualquiera de los dos genes rastreados. Sin embargo, aparte de las mutaciones detectadas en el proto-oncogén *RET*, estos pacientes no portaron mutaciones en ninguno de los genes asociados a HSCR que habían sido analizados con anterioridad (*GDNF*, *PSPN*, *NRTN*, *ARTN*, *EDNRB*, *EDN3*, *NTRK3*, *NTF3*, *SOX10* y *PHOX2B*).

D.8.2. Evaluación de variantes de secuencia de los genes SEMA3A y SEMA3D como factores de susceptibilidad para HSCR esporádico

Se analizaron las distribuciones alélicas y genotípicas de 6 SNPs, 3 distribuidos a lo largo del gen *SEMA3A* y 3 en *SEMA3D* en un grupo de pacientes HSCR y de controles, con el fin de evaluarlos como factores de susceptibilidad para HSCR. Mediante este estudio de casos y controles pudimos también evaluar la posible asociación de los haplotipos constituidos por estos SNPs con HSCR. Los datos generados, junto con los resultados de genotipado de los padres de dichos pacientes, también nos permitieron realizar un test de desequilibrio de transmisión o TDT.

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en la distribución de ninguna de las variantes analizadas en *SEMA3A* y *SEMA3D*, así como de los haplotipos generados que las comprenden (Tabla D.17). De la misma forma, tampoco se encontraron diferencias significativas en el análisis de TDT en el caso de *SEMA3D*. Por el contrario, en el análisis de TDT de los haplotipos generados a partir de los polimorfismos de *SEMA3A* se obtuvo como resultado una distribución significativamente distinta entre alelos transmitidos y no transmitidos. De esta manera observamos una sobretransmisión de los haplotipos (c.112+15079A, c.667+8467G, c.2151A) y (c.112+15079G, c.667+8467A, c.2151G), y una transmisión por debajo de la esperada en el caso del haplotipo (c.112+15079G, c.667+8467G, c.2151A), que en los tres casos alcanzaba la significación estadística ($\chi^2= 5,04$, $p= 0,024$; $\chi^2= 5,93$, $p= 0,015$; $\chi^2= 12,67$, $p= 0,0007$).

Tabla D.67 Distribución y frecuencia alélica y genotípica de las variantes de *SEMA3A* y *SEMA3D* genotipadas en pacientes HSCR y controles y su comparación.

		Variante	HSCR (%)	Controles (%)	
SEMA3A	Distribución Alélica	c.112+1507G>A	G	185 (69,5%)	147 (70%)
			A	81 (30,5%)	63 (30%)
		$\chi^2=0,17, p=0,6768355$			
		c.667+8467G>A	G	192 (70,6%)	154 (73,3%)
			A	80 (29,4%)	56 (26,7%)
		$\chi^2=0,44, p=0,5066904$			
	T717T	A	155 (57,8%)	140 (66,1%)	
		G	113 (42,2%)	72 (33,9%)	
	$\chi^2=3,36, p=0,0667324$				
	Distribución Genotípica	c.112+1507G>A	GG	65 (48,9%)	49 (46,7%)
			GA	55 (41,3%)	49 (46,7%)
			AA	13 (9,8%)	7 (6,6%)
		$\chi^2=1,17, p=0,6768355$			
		c.667+8467G>A	GG	69 (50,7%)	52 (49,5%)
GA			54 (39,7%)	50 (47,6%)	
AA			13 (9,6%)	3 (2,9%)	
$\chi^2=1,11, p=0,57319579$					
T717T		AA	43 (32,1%)	49 (46,2%)	
		AG	69 (51,5)	42 (39,6)	
	GG	22 (16,4)	15 (14,2)		
$\chi^2=5,09, p=0,07863989$					
SEMA3D	Distribución Alélica	c.151+1878C>A	C	243 (90)	183 (88)
			A	27 (10)	25 (12)
		$\chi^2=0,49, p=0,4821045$			
		c.495+1644C>T	C	202 (75)	165 (77)
			A	66 (25)	49 (23)
		$\chi^2=0,20, p=0,6580053$			
	c.1960+1334G>A	G	212 (79)	166 (78)	
		A	56 (21)	48 (22)	
	$\chi^2=0,17, p=0,6840941$				
	Distribución Genotípica	c.511+1878C>A	CC	108 (80)	79 (76)
			CA	27 (20)	25 (24)
			AA	0 (0)	0 (0)
		$\chi^2=0,56, p=0,4821045$			
		c.495+1644C>T	CC	77 (57)	61 (57)
CA			48 (36)	43 (40)	
AA			9 (7)	3 (3)	
$\chi^2=2,13, p=0,34444240$					
c.1906+1334G>A		GG	84 (63)	64 (60)	
		GA	44 (33)	38 (35)	
	AA	6 (4)	5 (5)		
$\chi^2=0,21, p=0,90015325$					

D.9. Rastreo de grandes deleciones en los genes *EDNRB*, *GFRA1*, *NRTN* y *PHOX2B* en pacientes HSCR

Aunque la presencia de deleciones de gran tamaño que afecten a genes implicados en HSCR no es significativa para explicar la aparición del fenotipo, exceptuando grandes reordenamientos cromosómicos (Lyonnet et al., 1993; Yin et al., 1996), nuestro grupo ya había analizado la presencia de CNVs en algunos genes asociados a HSCR siendo los resultados obtenidos negativos (Nuñez-Torres et al., 2009). Este análisis se realizó mediante el kit comercial de MRC-Holland que sólo incluye los genes *RET*, *ZFX1B* (OMIM 605802), *EDN3* y *GDNF*. Sin embargo, debida a la gran importancia que han demostrado tener los CNVs en la patogénesis de varias enfermedades humanas (Henrichsen et al., 2009), llevamos acabo el análisis molecular de los genes *EDNRB*, *GFRA1* (OMIM 601495), *NRTN* y *PHOX2B*, que no habían sido previamente analizados mediante MLPA, con el fin de evaluar, de una manera más exhaustiva, la posible implicación de anomalías en la dosis génica en la patogénesis de HSCR.

Para llevar este proyecto a cabo diseñamos sondas de MLPA específicas para la región codificante de los 4 genes a analizar, ya que no existen sondas comerciales para dichos genes, y 3 sondas controles correspondientes a regiones cromosómicas en las que no existen CNVs, siguiendo las recomendaciones de MRC-Holland. Uno de los objetivos de este trabajo, por tanto, fue la validación de la técnica de MLPA para el análisis de estos genes mediante las sondas que habíamos diseñado, ya que no existen sondas comerciales para dichos genes. La validación de la técnica fue totalmente satisfactoria, obteniendo perfiles con la homogeneidad esperada para sondas diseñadas por usuario que permitieron la homogenización y comparación de los picos de manera adecuada.

Se analizaron 208 pacientes HSCR, y encontramos una deleción que afectaba a los exones 1a, 2a, 3 y 4 de la isoforma NM_005264 y exones 2b, 3 y 4 la isoforma NM_145793 del gen *GFRA1* (Figura D.18). La deleción fue detectada en heterocigosis en un paciente HSCR aislado y esporádico, que heredó dicha deleción de su padre no afecto. (Figura D.19; Familia 2; Sánchez-Mejías et al., 2010c). Existen dos polimorfismos de número de copias en dicho gen (Variant_48004 y Variant_48418) en la base de datos DGV, *Database of Genomic Variants*). El primer CNV consiste en la deleción de 36Kb aproximadamente. Esta deleción afecta a la región del cromosoma 10 que contiene a los exones 7, 8, y 9 del gen *GFRA1*. Por el contrario, el segundo de ellos, se localiza en la región 3'UTR del gen, no existiendo

ningún otro CNV en la región cromosómica en la que se encuentra este gen. Ésta es la segunda vez que nuestro grupo detecta la presencia de esta delección en un paciente independiente del que se había descrito con anterioridad (Borrego et al., 2003b). No se detectaron mutaciones puntuales potencialmente patogénicas en otros genes relacionados con HSCR como: *RET*, *GDNF*, *PSPN*, *NRTN*, *ARTN*, *EDNRB*, *EDN3*, *NTRK3*, *NTF3*, *SOX10* o *PHOX2B*.

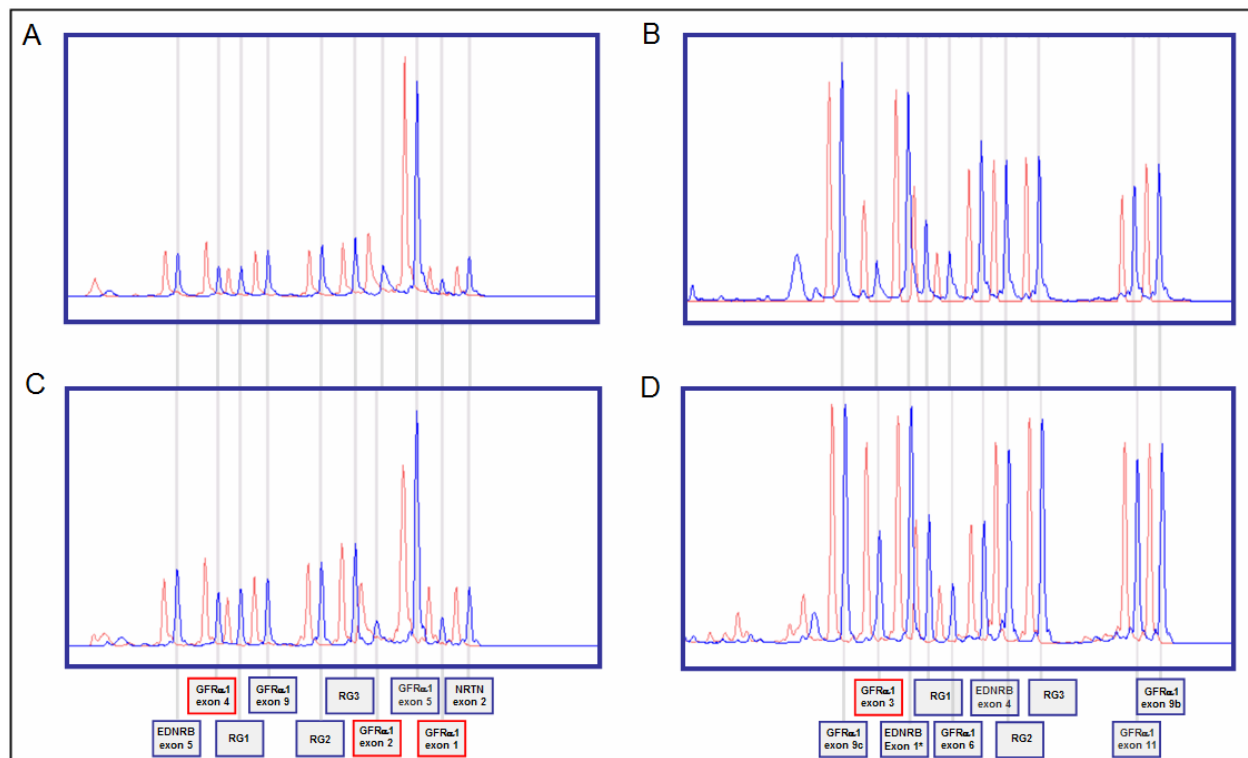


Figura D.18 Perfiles de MLPA obtenidos en individuos control (rojo) y pacientes HSCR (azul). Se muestran dos mezclas de sondas diferentes (A y C mix 1; B y D mix 2). Para estos pacientes HSCR (Familia 1, A y B; Familia 2 C y D), se observó un descenso en la dosis de los exones 1, 2, 3 y 4 de *GFRα1*, resaltados mediante cuadros rojo.

Para realizar una primera aproximación sobre el efecto que tendría esta delección en la expresión del gen, utilizamos las herramientas bioinformáticas InterProScan de EBI y Transec de EMBOSS. De esta manera comprobamos que la isoforma NM_005264 sin la región delecionada podría transcribirse a partir de un ATG alternativo, generándose así una proteína idéntica a la WT a partir del residuo aminoacídico 211 hasta el final (Figura D.20), que conserva uno de los dominios GDNF/GAS1 de los 3 que tiene la proteína WT. Sin embargo, no encontraríamos en esta proteína aberrante 2 de los dominios GDNF ni el péptido señal en el extremo amino terminal (Figura D.20). Además, aunque la delección está acotada en su extremo 3', no lo está en el 5' que es donde se encuentran las señales de inicio de transcripción y traducción. Por lo tanto, no podemos saber si también se pierden

estas señales y por consiguiente la expresión de la proteína aberrante. En cualquier caso, dicha proteína tendrá probablemente una funcionalidad muy limitada, aunque esto habrá que comprobarlo con los estudios funcionales adecuados.

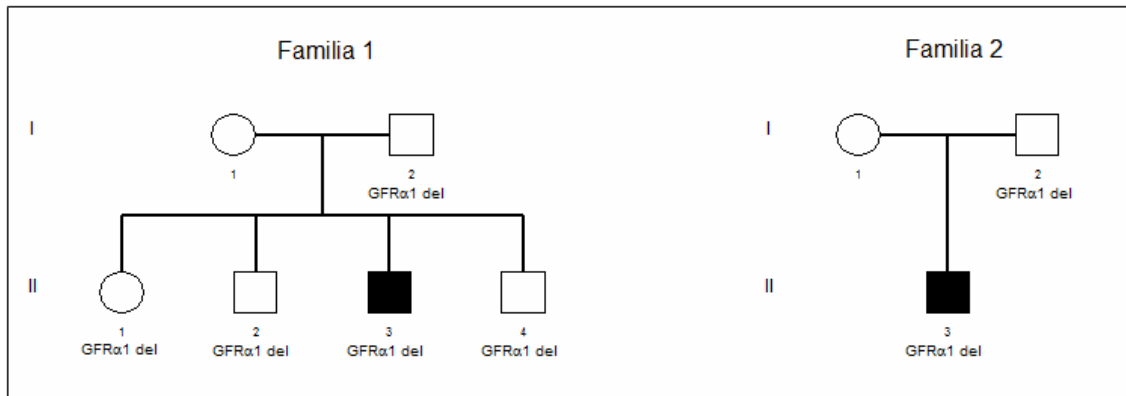


Figura D.19 Pedigrí de las dos familias HSCR que portan la delección en el gen *GFRA1* (c.(?-555)_431+?del) en heterocigosis. La Familia 1, es en la que se detectó esta delección por primera vez.

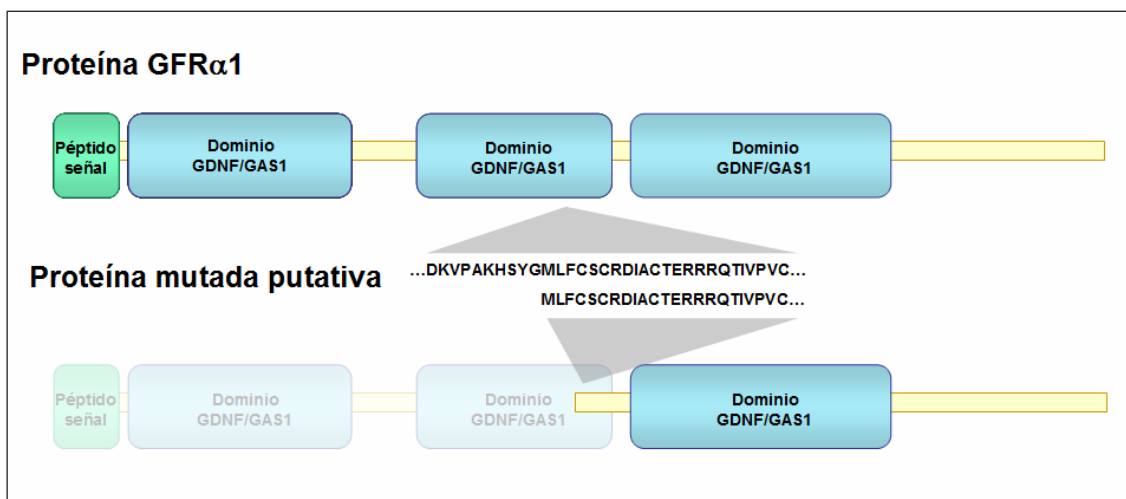


Figura D.20 Representación de la proteína GFRα1 en la que se muestran sus dominios funcionales, y la comparación con la posible proteína que podría traducirse a partir de la copia del gen mutada. Esta proteína mutada tendría delecionados el péptido señal y 2 de los 3 dominios funcionales GDNF/GAS1.

E. DISCUSSION

E.1. Consecuencias funcionales de las alteraciones proteicas encontradas en los ligandos de RET en nuestra serie de pacientes HSCR

La relevancia de la vía de señalización dependiente de RET en el desarrollo del SNE y el papel primordial de dicho receptor en la patogénesis de HSCR, sugieren que los genes que codifican la familia de ligandos GDNF son también excelentes candidatos para esta enfermedad. Sin embargo, la mayor parte de mutaciones que ya han sido descritas en *GDNF* y la única mutación descrita en *NRTN*, co-segregan con mutaciones en *RET* y/o con otras alteraciones genéticas, sugiriendo que dichas mutaciones podrían no ser suficientes para causar HSCR (Angrist et al., 1996; Ivanchuk et al., 1996; Salomon et al., 1996; Hofstra et al., 1997, 2000; Doray et al., 1998). Además, los ensayos funcionales presentados hasta la fecha sobre mutaciones en los ligandos de RET no han demostrado su patogénesis. Más concretamente, por ejemplo, las consecuencias funcionales de las mutaciones conocidas en la región madura de *GDNF* demuestran que no existen efectos significativos sobre la fosforilación de RET, incluso cuando hay una reducción en la afinidad por GFR α 1 (Eketjäll e Ibanez, 2002; Borghini et al., 2002). Teniendo en cuenta todos estos datos, es posible pensar que las mutaciones detectadas en *GDNF* y *NRTN* podrían actuar como moduladores genéticos que contribuyen a la aparición del fenotipo interaccionando con otros *loci* de susceptibilidad.

En el presente trabajo hemos evaluado los cuatro genes que codifican para los ligandos de RET como genes de susceptibilidad para HSCR. Dos de las nuevas variantes detectadas se localizan en la región correspondiente al pro-péptido de *NRTN* (A67T) y *ARTN* (R72H), por lo que su efecto sobre las proteínas maduras tras el procesamiento proteolítico debe ser analizado con cautela. Dichas regiones son muy importantes para el correcto plegamiento de la proteína y un procesamiento proteolítico eficiente, por lo que variantes de secuencia en esta región podría generar una pérdida en la cantidad de proteína madura que es secretada al medio extracelular (Suter et al., 1991; Bolk et al., 1996). Además, la variante A96S en *NRTN*, que ya había sido descrita, da lugar a la sustitución del primer aminoácido de la proteína madura, lo que podría afectar al sitio de corte de la proteína y por lo tanto a su correcto procesamiento proteolítico. Sin embargo, el impacto de cambios de secuencia en esta región ya ha sido investigado para otras proteínas secretadas por la célula sin que se hayan encontrado efectos sobre el nivel de expresión ni sobre la funcionalidad de la proteína madura. De hecho, nuestro estudio funcional sobre el posible impacto de estas 3 variantes en la expresión y procesamiento

proteolítico, parece indicar que no existe un efecto perjudicial al menos *in vitro*. En cualquier caso, no pensamos que estas sustituciones afecten de manera severa a la expresión de la proteína, su correcto procesamiento o a su actividad biológica, y si tuvieran algún efecto sobre la proteína, éste sería sutil y por lo tanto estaría por debajo del límite de detección nuestro ensayo *in vitro*.

Uno de los resultados más interesantes que se habían obtenido en la primera fase del estudio de mutaciones realizado con anterioridad en nuestro laboratorio fue la identificación de las mutaciones nuevas F127L en *NRTN* y R91C en *PSPN*, al que se suma la detección de la variante A96S en *NTRN* en la presente tesis. En este trabajo, hemos llevado a cabo un ensayo funcional *in vitro* demostrando que las mutaciones F127L en *NRTN* y R91C en *PSPN* reducen de manera significativa la capacidad de *NRTN* y *PSPN* de inducir fosforilación en las tirosinas de RET (Ruiz-Ferrer et al., 2010). Además, la presencia de la mutación R91C en *PSPN*, provoca una reducción en el nivel de proteína liberada al medio extracelular, probablemente debido a que la presencia de una cisteína adicional en la proteína afecte al correcto plegamiento de la misma, teniendo consecuencias sobre su procesamiento proteolítico. La comparación de las secuencias proteicas de factores neurotróficos gliales derivados de la cresta neural procedentes de distintas especies ha revelado que las sustituciones detectadas se localizaban en la misma región que dichas proteínas, afectando a residuos altamente conservados de la lámina- β perteneciente a uno de los dominios críticos para la unión ligando/receptor (Chen et al., 2000; Baloh et al., 2000). Nosotros proponemos que las sustituciones aminoacídicas detectadas podrían reducir la afinidad de unión a RET y disminuyendo por tanto su nivel de dimerización y como consecuencia el nivel de fosforilación al comparar con los ligandos silvestres. Cabe destacar que, en el caso de R91C en *PSPN*, la reducción del nivel de fosforilación de RET fue aún más acusada, a pesar de que la cantidad de proteína que se empleó para estimular a RET fue la misma que en el caso de *NRTN*. Esto podría deberse a que la introducción de un nuevo residuo de cisteína podría generar nuevos puentes disulfuro en las proximidades de un motivo cisteínico en la proteína (Baloh et al., 2000). Esto alteraría de manera más severa la estructura tridimensional de la proteína mutante madura, teniendo un mayor impacto sobre la activación del receptor RET. Finalmente, sugerimos que las consecuencias de las mutaciones F127L y R91C en *NRTN* y *PSPN* respectivamente, podrían ser una reducción de la activación de la ruta de señalización dependiente de RET, dando lugar a un defecto sobre la proliferación, migración y/o diferenciación de las células derivadas de la cresta neural en el intestino en desarrollo y por lo tanto, a la aganglionosis colónica típicamente observada en HSCR.

Las mutaciones detectadas en *GDNF*, *NRTN*, *ARTN* y *PSPN* tienen una penetrancia incompleta ya que están presentes en miembros no afectados dentro de la familia. Este hecho es perfectamente compatible con el modelo aditivo de herencia que ha sido previamente propuesto para HSCR, en el que la expresión de la enfermedad parece depender de la contribución de distintos genes que actúan de forma multiplicativa modulando la penetrancia de mutaciones o la expresión de la enfermedad en individuos afectados. Nuestros resultados sugieren que las mutaciones identificadas en este trabajo podrían contribuir al fenotipo final, interaccionando con otras mutaciones en otros genes. De hecho, todos los pacientes portadores de mutaciones en los ligandos de RET son también portadores de la mutación enhancer en el intrón 1 de *RET* (Emison et al., 2005) en heterocigosis. Siguiendo este mismo modelo de herencia aditiva, es importante añadir que la mutación A96S en *NRTN* co-segrega con la mutación nueva A67T en este mismo gen. Presumiblemente ninguna de estas mutaciones causarán HSCR por sí mismas, pero la concurrencia de ambas en el mismo paciente junto con otros eventos mutacionales en otro *loci* podrían contribuir a la aparición del fenotipo. Sin embargo, y debido a la presencia de ambas mutaciones en el mismo alelo, debe existir algún otro factor que explique la aparición del fenotipo en el paciente y no en su padre portador del alelo mutado.

En resumen, los hallazgos más interesantes en el presente trabajo han sido la identificación de dos mutaciones nuevas en los genes *NRTN* y *PSPN* como posibles causantes de HSCR. Los ensayos *in vitro* muestran que la activación de RET se ve reducida en estos mutantes. Además de describir por primera vez la asociación de una mutación en *PSPN* con HSCR, hemos confirmado la implicación de *NRTN* en esta enfermedad. Por otra parte, hemos descrito una mutación en *ARTN* que podrían estar potencialmente implicadas en la aparición de HSCR, aunque los resultados de los estudios funcionales que hemos llevado a cabo en nuestro laboratorio no permiten confirmar esta hipótesis (Ruiz-Ferrer et al., 2010).

E.2. Evaluación de la implicación en HSCR de la región 3'UTR del gen *RET*

En el caso de una enfermedad compleja como HSCR, la susceptibilidad a padecerla es una variable poligénica, que en último caso depende de la combinación al azar de variantes genéticas favorables y desfavorables para la ocurrencia de la enfermedad. Por lo tanto, la expresión fenotípica dependerá tanto del efecto de alelos de susceptibilidad como de alelos que confieran protección

frente a HSCR. En este sentido, se ha establecido claramente la existencia de un haplotipo de *RET* que parece ser responsable de la mayor parte de casos HSCR esporádicos (Borrego et al., 2003; Fernandez et al., 2005; Amiel et al., 2008). Parece que la causa molecular de este fenómeno es la presencia de una variante de *RET* (c.73+9277T>C, rs2435357) asociada a dicho haplotipo, en un dominio promotor de la transcripción dentro del intrón 1, que reduce la expresión del gen *in vitro* (Emison et al., 2005). Por el contrario, existen SNPs de *RET* que parecen estar sub-representados en pacientes HSCR al compararlos con controles, como S836S (c.2508C>T, rs1800862), G691S (c.2071C>A, rs1799939) y S904S (c.2712C>G, rs1800863) (Borrego et al., 1999; Griseri et al., 2000; García-Barceló et al., 2003b), aunque el mecanismo que habría detrás de un posible efecto protector aún no se ha esclarecido.

Los resultados obtenidos al evaluar la variante de *RET* del extremo 3'UTR c*587T>C (g.128496T>C, rs3026785) como posible factor de protección en el contexto de HSCR, parecen descartar esta hipótesis (Fernandez et al., 2009c). A pesar de las pruebas genéticas aportadas por otros grupos de investigación, como puedan ser el desequilibrio de ligamiento entre c*587C y los alelos que confieren protección frente a HSCR c.2508T y c.73-126T (Borrego et al., 2003a; Lantieri et al., 2006; Fugazzola et al., 2008), o el efecto funcional del alelo c*587C sobre la estabilidad del mensajero de *RET* (Griseri et al., 2007), no encontramos diferencias significativas entre la distribución de este polimorfismo entre el grupo HSCR y el control (Fernández et al., 2009c). Por lo tanto nuestro análisis descarta que la variante localizada en la región 3'UTR de *RET* esté implicada en la enfermedad de HSCR, ya que el posible papel de la variante c*587T>C en el control del transcrito de *RET* (Griseri et al., 2007) no se ve sustentado por la distribución alélica encontrada en pacientes HSCR que es idéntica a la de controles.

E.3. Evaluación de *NTRK3* como gen de susceptibilidad para HSCR

Las enfermedades complejas, como la enfermedad de Hirschsprung, se están convirtiendo en un campo de creciente interés en el ámbito de la investigación en genética médica. La aproximación experimental que consigue mayores avances en la investigación de este tipo de enfermedades en la actualidad, es el análisis de asociación y el análisis de ligamiento del genoma completo, con el que se pretende identificar los genes, o las regiones cromosómicas en los que se encuentran estos genes, implicados en la aparición de la enfermedad. De esta manera, y como hemos visto anteriormente, se han descrito varias regiones

cromosómicas asociadas a la enfermedad de Hirschsprung en distintas series de pacientes, como 9q31, 3p21, 10q11, 16q23, 19q12, 13q22, 21q21, 4q31-q32 (Bolk et al., 2000; Gabriel et al., 2002; Carrasquillo et al., 2002; Lin et al., 2004; Brooks et al., 2006). En ciertos casos se conoce la identidad del gen que está detrás de algunos de estos *loci*, como 10q11 y *RET* o 13q22 y *EDNRB*. Pero el resto de estas regiones del genoma no incluyen ninguno de los genes que han sido descritos hasta el momento asociados a HSCR. De hecho, para la identificación de estos genes se usaron aproximaciones experimentales totalmente distintas, que incluyen su evaluación como genes candidatos para dicha enfermedad basadas en la función del gen, o el estudio de modelos animales con fenotipos que se asemejan a HSCR. De esta manera, se pueden identificar nuevos genes responsables de la aparición de ciertas formas de la enfermedad, que no se detectarían con un estudio de asociación genómica a gran escala. Bajo este supuesto, hemos considerado el gen *NTRK3* como un buen candidato para HSCR, no sólo por las implicaciones de la ruta de señalización NTF-3/TrkC en el desarrollo del SNE durante la embriogénesis, sino por las evidencias experimentales conseguidas en modelos animales que carecen o sobre-expresan su ligando Ntf-3 (Chalazonitis 2004), y su localización diferencial en regiones gangliónicas y agangliónicas de intestinos HSCR (Hoehner et al., 1996).

Entre nuestros resultados encontramos varios cambios de secuencia intrónicos en nuestros pacientes HSCR que resultaron estar ausentes en población control. Nos planteamos la posibilidad de que éstas estuvieran relacionadas con la enfermedad por generar sitios de *splicing* alternativos. Sin embargo, la aproximación *in vitro* que realizamos para testar esta posibilidad parecía descartar esta hipótesis. A pesar de estas evidencias no podemos negar la posibilidad de que el fenómeno de degradación de mRNA (NMD-mRNA, *Nonsense-mediated mRNA Decay*) pudiera estar afectando a nuestros resultados. En este sentido, sería posible que en caso de generarse un mRNA aberrante, éste presente una mayor tasa de degradación que el RNA normal, y por lo tanto el mRNA generado a partir del alelo mutado no estaría disponible para ser detectado con la técnica elegida.

Probablemente, de los resultados presentados en la evaluación de *NTRK3* como gen de susceptibilidad para HSCR, el más interesante sea la detección de la nueva mutación R645C en el dominio tirosín kinasa de la proteína, en dos hermanos afectados (Fernandez et al., 2009b). Estos dos individuos también son portadores de una mutación en *RET* que afecta al proceso de maduración del mRNA. La unión de las neurotrofinas a sus receptores Trk, induce la dimerización de éstos y el consiguiente reclutamiento de proteínas adaptoras y enzimas que participan en el proceso de transducción de señales intracelulares, mediante distintas vías de señalización. Estas vías modificarán el patrón de expresión

genética de la célula como respuesta al medio extracelular, promoviendo en la célula distintos procesos celulares, como la supervivencia o la diferenciación, como hemos visto con anterioridad. Sería plausible que al introducirse en la proteína un nuevo residuo de cisteína, éste pueda afectar al plegamiento final del receptor mediante la generación de nuevos puentes disulfuros, como predice la herramienta DiANNA. Esto podría impedir su transporte hacia la membrana plasmática o afectar directamente los mecanismos que disparan las rutas de señalización implicadas en el desarrollo del SNE, por generar impedimentos estéricos para la unión de proteínas adaptadoras o por otros mecanismos. De hecho existen muchas enfermedades asociadas a fallos en el plegamiento de proteínas, especialmente cuando se trata de proteínas integrales de la membrana plasmática, como la fibrosis quística o la hipercolesterolemia familiar. El equilibrio fisiológico que existe entre la forma desplegada y nativa de una proteína en la célula puede verse perturbado por diversos factores. Las pequeñas alteraciones en la proteína debidas a mutaciones puntuales, o las condiciones ambientales, pueden generar pequeños cambios en la energía libre de los estados intermediarios dentro del proceso de plegamiento de la proteína. La importancia que la secuencia de aminoácidos tiene en el plegamiento de proteínas, podría explicar el posible impacto de la sustitución R645C en la funcionalidad de la proteína. Sin embargo, la herramienta bioinformática PolyPhen predice que el cambio R645C no tiene implicaciones patológicas, aunque esto puede deberse a que dicha herramienta basa parte de sus resultados en la conservación aminoacídica entre varias especies, y la posición 645 no está conservada a lo largo de la evolución, aunque sí lo está entre animales homeotermos. Existen evidencias experimentales, en el caso de HSCR, de la importancia de la temperatura ambiental en el proceso de plegamiento *in vivo* (Kjaer e Ibañez, 2003), lo que podría explicar la falta de conservación de dicha posición aminoacídica.

Las predicciones *in silico* apoyan que la distribución de los puentes disulfuro podrían ser algo diferente en la proteína mutante, con respecto a la proteína silvestre. De hecho, en la proteína mutante, C645 se uniría a C607, mientras este último residuo en la proteína silvestre se uniría a C320. De esta manera podemos pensar que la mutación R645C podría afectar a la correcta maduración de la proteína o incluso impedir el transporte a la membrana por verse alterado el proceso de glicosilación. Este mismo mecanismo patológico fue propuesto y estudiado funcionalmente para algunas mutaciones en *RET* implicadas en la aparición de HSCR (Iwashita et al., 1996; Cosma et al., 1998). Por otra parte, en la presente tesis, hemos podido comprobar que la introducción de un nuevo residuo de cisteína en una proteína tiene consecuencias funcionales sobre la proteína

madura y sobre el procesamiento de la misma (Apartados D.1 y E.1). Alternativamente podemos proponer otro mecanismo patogénico para este cambio, basado en la proximidad en la secuencia de la posición R645 con algunos residuos de tirosina (Y705, Y709, Y710) susceptibles de ser fosforilados, de acuerdo con Phosphosite®, (<http://www.phosphosite.org>), y activar la cascada de transducción de señales. Los posibles cambios estructurales que podría causar esta mutación podrían dificultar el acceso a las proteínas adaptadoras o a los efectores de señalización, afectando la cascada de señalización. Para poder confirmar el posible papel patológico de la mutación R645C en *NTRK3* se tendrán que llevar a cabo estudios funcionales adecuados que permitan dilucidar la implicación de esta mutación con la aparición de la enfermedad de Hirschsprung.

Como ocurre con las mutaciones en *RET* asociadas a HSCR, nosotros abogamos por la hipótesis de haploinsuficiencia como el mecanismo más probable para la mutación R645C de *NTRK3*. Por otra parte, el análisis de la segregación de las mutaciones en *RET* y *NTRK3* en esta familia, concuerda con un modelo de herencia recesiva para la enfermedad en esta familia, y sugiere que ambas mutaciones son necesarias aunque no suficientes para la aparición de la enfermedad. Este mismo fenómeno ha sido observado en otros genes implicados en HSCR, como *GDNF* o *NRTN* (Angrist et al., 1996; Doray et al., 1998). De esta manera, mientras *RET* y *NTRK3* podrían ser los principales genes implicados en HSCR en esta familia, es probable que exista cierta contribución de otros genes, que actúen como modificadores y puedan explicar la diferencia de fenotipo en los dos miembros afectados (*S-HSCR versus* aganglionosis total colónica). De hecho, y tal como se explica en la sección E.5 del presente trabajo, nuestro grupo pudo identificar uno de estos genes.

Ciertamente, el presente trabajo enfatiza la necesidad de continuar investigando genes candidatos para HSCR por función y apoya la naturaleza compleja de esta enfermedad, en la que defectos en más de un gen son responsables de la aparición del fenotipo.

E.4. Análisis molecular de los genes *EDN3* y *EDNRB* en nuestra cohorte de pacientes HSCR

En el presente trabajo describimos el análisis genético completo de *EDNRB* y *EDN3* en el contexto de HSCR en nuestra serie de pacientes. Aunque estos genes han sido evaluados con anterioridad en otras series de pacientes, nuestro grupo no

disponía del espectro mutacional de *EDNRB* y *EDN3* en nuestra serie. Los datos obtenidos con este estudio nos han permitido realizar un análisis más exhaustivo de las causas genéticas que dan lugar a HSCR.

Hemos obtenido distintas evidencias que nos permiten proponer las siguientes variantes nuevas de *EDNRB* como mutaciones causantes de HSCR en nuestros pacientes: L15PfsX29, K56T, G115R, y P156S (Sánchez-Mejías et al., 2010a). La delección L15PfsX29 (c.42_45del) causa una pérdida de la pauta de lectura que genera un codón de parada prematura de la traducción en la posición 44 de la proteína. Como resultado se expresaría una proteína truncada de 43 residuos aminoacídicos de longitud que carecería de los siete dominios transmembrana, esenciales para la función de la misma. En cuanto a la mutación de *EDNRB* G57S ha mostrado ser incapaz de inhibir a la adenilato ciclasa, dando lugar a fallos en la ruta de señalización dependiente de proteína G responsable de la diferenciación neural en el intestino (Fuchs et al., 2001). Con respecto a la mutación K56T, localizada contigua a la mutación G57S, pensamos que ambas podrían tener consecuencias funcionales similares para la proteína, debido a la proximidad física entre ambos residuos. Por último, la comparación de las secuencias en la región que comprendía las mutaciones G115R y P156S, mostró que en ambos casos la mutación afectaba a una posición muy conservada entre las proteínas *EDNRB* de mamífero, estando presente esta conservación también en los aminoácidos localizados alrededor de ambas posiciones. Esto es indicativo de la importancia de estas regiones en la función de la proteína. Cabe destacar que ambas mutaciones fueron detectadas en dos familias HSCR múltiplex diferentes, estando presentes en todos los miembros afectados. Además, en todos estos pacientes observamos la concurrencia de la mutación en *EDNRB* con la mutación en el dominio *enhancer-like* de *RET* (Emison et al., 2005). De esta manera *RET* también contribuirían a la susceptibilidad a HSCR en estos pacientes, apoyando de nuevo la hipótesis de que la presencia de eventos genéticos adicionales es un rasgo necesario para la aparición de aganglioneosis colónica. Además, los resultados aportan nuevas evidencias de que existe una interacción genética y funcional entre las rutas de señalización de *RET* y *EDNRB*, los dos genes de susceptibilidad más importantes en esta patología.

La presencia de estas mutaciones nunca antes descritas, junto con las mutaciones G57S y A310T, que ya habían sido asociadas a HSCR con anterioridad (Amiel et al., 1996; Sakai et al., 2000), dan como resultado una tasa de mutaciones en *EDNRB* en nuestra población del 4,1%, lo que está en consonancia

con los datos de tasas mutacionales para este gen publicados para otras poblaciones (Amiel et al., 2008).

En el presente trabajo se describe, por primera vez, el rastreo mutacional de la región adicional presente en la nueva isoforma de *EDNRB*. Uno de los hallazgos más relevantes en este sentido ha sido la detección de la mutación K15X en la variante proteica de *EDNRB* (Sánchez-Mejías et al., 2010a). Esta mutación provoca una parada prematura de la traducción por lo que la proteína resultante carecería completamente de funcionalidad. Se han descrito 3 subtipos distintos de cDNA para el gen *EDNRB* que surgen como consecuencia de un *splicing* alternativo en la región 5' del gen (Tsutsumi et al., 1998). Una de estas isoformas alternativas (*EDNRBΔ3*) codifica una secuencia proteica adicional de 89 residuos de longitud hacia el extremo 5', pero comparte el resto de la secuencia con la proteína tradicional. La especificidad de expresión de *EDNRBΔ3*, así como sus secuencias reguladoras de transcripción específicas están aún por determinar, pero existen ciertas evidencias de su expresión en el intestino delgado y el colon (Tsutsumi et al., 1998). La detección de esta mutación en un paciente HSCR esporádico nos permite pensar que *EDNRBΔ3* podría estar jugando un papel importante en la etiopatogenia de HSCR, revelando una posible implicación de esta isoforma particular en el desarrollo del SNE.

Con respecto a *EDN3*, la nueva mutación c.572_573del se detectó en un paciente HSCR esporádico que también era portador de la mutación en el dominio *enhancer-like* de *RET* en heterocigosis, pero de ninguna otra mutación puntual en la región codificante de otros genes asociados a HSCR analizados (*GDNF*, *NTNR*, *PSPN*, *ARTN*, *NTF3*, *NTRK3*, *SOX10*, *PHOX2B* y *EDNRB*) (Sánchez-Mejías et al., 2010a). El hecho de que tanto la mutación en *EDN3* como la mutación en dicho dominio de *RET* fueran heredados de su padre sano sugiere que han de existir otros genes o factores adicionales que contribuyen a la aparición de HSCR en este paciente. La presencia de la mutación c.560insA en *EDN3* en una familia HSCR múltiplex será discutida en el siguiente apartado.

Por otra parte, se considera que *EDN3* es un gen asociado a HSCR con baja frecuencia, debido al limitado número de pacientes que poseen mutaciones en este gen, especialmente cuando se trata de casos aislados. De manera interesante, se ha observado una expresión de *EDN3* reducida en el colon de pacientes HSCR, tanto en la región agangliónica como gangliónica, al comparar con controles (Kenny et al., 2000), apoyando la importancia de *EDN3* en HSCR. La ausencia de mutaciones puntuales en *EDN3* en estos pacientes con patrones de expresión aberrantes para dicho gen, animó a los autores a proponer la existencia de factores

desconocidos que estuvieran regulando la expresión del mismo (Kenny et al., 2000). Nuestros resultados de la distribución de polimorfismos en este gen, aportan un nuevo dato para explicar este fenómeno. Sería plausible que la asociación del polimorfismo rs6064764 con HSCR pudiera indicar la existencia de un desequilibrio de ligamiento con alguna variante funcional, desconocido aún, de este gen, como es bien sabido que ocurre en el caso de *RET* (Borrego et al., 2003a; Fernandez et al., 2005; Emison et al., 2005). Otra posibilidad es que el alelo c.365+7474T, que resultó estar asociado a HSCR en este estudio, pudiera actuar como variante funcional *per se*, dando lugar a una mayor predisposición a HSCR por algún mecanismo que desconocemos. En cualquiera de los casos, nuestra evaluación de *EDN3* como gen de susceptibilidad para HSCR mediante el uso de polimorfismos comunes, sugiere que este gen podría ser considerado como un gen de susceptibilidad común en HSCR esporádico con una penetrancia reducida (Sánchez-Mejías et al., 2010a), más que un gen menor para esta enfermedad tal y como se ha considerado en los últimos tiempos.

E.5. Contribución de *RET*, *NTRK3* y *EDN3* en la aparición del fenotipo HSCR en una familia múltiple

En el apartado E.3 de la presente tesis hemos propuesto que la interacción de *RET* y *NTRK3* es necesaria para causar HSCR, sin embargo cada una de ellas de manera independiente no son suficientes para generar el fenotipo, ya que ambas mutaciones, por separado, están presentes en miembros sanos de la familia. El hecho de que aparecieran juntas únicamente en los dos miembros afectados de la familia (Fernandez et al., 2009b), nos indica que es el efecto aditivo de ambas mutaciones lo que hace que se manifieste la enfermedad. En esta misma familia se detectó, además, la presencia de una mutación en heterocigosis en el gen *EDN3*, únicamente en el paciente que presentaba el fenotipo más severo.

El gen *EDN3* codifica una preproendotelina-3 de gran tamaño que es un precursor inactivo. Esta proteína inmadura da lugar a un péptido maduro de 21 aminoácidos mediante un proceso proteolítico que tiene lugar en dos pasos. Primero interviene la proteasa furina y luego la enzima convertidora de endotelina (ECE1), actuando sobre varios sitios de corte concretos. La mutación c.560insA da lugar a una aberración en una región de la proteína que es eliminada durante el proceso proteolítico, por lo que la secuencia de la proteína *EDN3* madura no se ve afectada. Esta mutación ha sido previamente descrita en un paciente que

presentaba CCHS (Bidau et al., 1997), una neurocristopatía que en raras ocasiones se ha asociado a HSCR (Amiel et al., 2008), y en dos pacientes HSCR aislado (Kenny et al., 2000). El análisis funcional de las consecuencias de la mutación c.560insA en un estudio previo no había demostrado un efecto perjudicial en la proteína, ya que cuando el cDNA mutado fue transfectado en células de ovario de hámster, los niveles de EDN3 fueron iguales al control (Bolk et al., 1996). Sin embargo, los autores de dicho trabajo ya puntualizaron que el método usado podría no resultar ser el adecuado para testar la patogenicidad de esta mutación en concreto, y que este ensayo en ningún caso podría reproducir el comportamiento *in vivo* del gen mutado, con respecto a su expresión y el correcto procesamiento de la proteína producida. Por otra parte, la presencia de esta mutación por si sola no parece tener consecuencias sobre la correcta formación del SNE, ya que existen miembros de la familia sanos portadores de la misma, lo que sugiere que la proteína mutante retiene parte de su funcionalidad o que la dosis génica no es crucial en este proceso. Sin embargo, la presencia de una cola proteica aberrante en la región final del prepropéotido podría, incluso de una manera muy sutil, afectar a la traducción del precursor de EDN3, a su plegamiento y/o al procesamiento proteolítico dando lugar a un corte menos efectivo. La ausencia de diferencias significativas en la expresión entre la copia WT del gen y la mutada en células eucariotas en cultivo, podría explicarse con el hecho de que dichas células expresan la proteína de manera artificial (Bidau et al., 1997), ya que *in vitro* las enzimas proteolíticas podrían estar trabajando en condiciones saturantes dando lugar a la misma cantidad de EDN3. Por lo tanto, podríamos postular que este cambio sutil podría alterar el desarrollo del SNE y modular la penetrancia de mutaciones en otros genes responsables de la aparición del fenotipo, o actuar como factor que modifica el fenotipo HSCR (Sánchez-Mejías et al., 2009).

Durante la formación del SNE las células derivadas de la cresta neural vagal y sacra colonizan el colon y proliferan en respuesta a GDNF mediante la transducción de señales mediada por RET. Como ya hemos visto, estos precursores migran en dirección rostro-caudal y se diferencian en neuronas entéricas y glía en respuesta a una gran variedad de factores neurotróficos que actúan en el microambiente del intestino en formación. Uno de estos factores es NTF3, que ejerce su función mediante el receptor NTRK3. NTF3 actúa de manera tardía en la formación del SNE, promoviendo la supervivencia y diferenciación de una subpoblación de precursores entéricos en neuronas y glía, y promoviendo la supervivencia de estas células diferenciadas durante la fase adulta (Chalazonitis et al., 2004). Por lo tanto, las mutaciones que comprometan la función tanto de RET como de NTRK3 en el mismo paciente podrían resultar en un fallo en la proliferación

y migración de los precursores entéricos a las regiones más distales del tracto digestivo. Esto tendría como consecuencia la ausencia de los plexos entéricos en dicha región, más aún cuando a esta situación le sumamos un fallo en la diferenciación y supervivencia de una parte de dichos precursores y las células a las que dan lugar. EDN3 actúa previniendo la diferenciación de los precursores derivados de la cresta neural (Wu et al., 1999). Bajo este supuesto, la presencia de una alteración adicional en este paciente en la ruta de señalización dependiente de EDN3 podría originar un incremento en la región agangliónica, ya que la diferenciación podría abolir la migración en un estado anterior durante la formación del SNE.

Por lo tanto el hallazgo de esta mutación en *EDN3* en una familia múltiple, en la que ya se habían identificado mutaciones en *RET* y *NTRK3* apoya de nuevo el modelo de herencia aditivo para HSCR. La presencia de esta mutación en *EDN3* en el paciente en que la aganglioneosis se extiende hasta el íleon y no en su hermano afecto con un fenotipo menos agresivo, sugiere que el gen *EDN3* podría estar actuando como factor modificador del fenotipo en esta familia en particular. También pone de manifiesto que la acumulación de variantes genéticas que predispongan a HSCR en el fondo genético del paciente tiene un mayor impacto sobre la expresión de la enfermedad.

E.6. Implicación de las rutas de señalización GDNF-Gfra1-RET y EDN3-EDNRB en la Displasia Neuronal Intestinal tipo B

Todavía no se conoce completamente la etiología de la DNI B, a pesar de las evidencias que apuntan a una base genética para esta enfermedad. En el presente trabajo hemos decidido realizar el estudio molecular de algunos genes que participan en dos de las rutas de señalización más importantes para la formación del SNE. Por una parte, hemos considerado al proto-oncogén *RET* y a los genes que codifican para sus ligandos, como candidatos para la DNI B, debido al papel central de dicho gen en HSCR y en el desarrollo del SNE. Por otra parte, hemos evaluado a los genes que participan en la ruta de señalización dependiente de EDNRB, ya que existen modelos animales para DNI B en los que se interrumpen dichos genes.

E.6.1. Evaluación de los genes RET, GDNF, NRTN, ARTN, PSPN como genes de susceptibilidad para DNI B

Tanto HSCR como DNI B son neurocristopatías que causan defectos funcionales y del desarrollo en el SNE. Además el fenotipo DNI B se encuentra asociado a HSCR en muchos casos, por lo que parece razonable considerar *RET*, que es el mayor gen de susceptibilidad en HSCR, así como los genes que codifican para sus ligandos, como candidatos para DNI B. En el presente trabajo hemos identificado 3 mutaciones germinales en *RET* entre los 30 pacientes DNI B+HSCR, lo que hace un total de 10% de frecuencia de mutaciones en este grupo, la misma que se ha reportado en pacientes de HSCR esporádico y aislado (Ruiz-Ferrer et al., 2006), lo que apoya la implicación de *RET* en la aparición de HSCR aislado, pero no necesariamente en DNI B.

Más interesante fue el hallazgo de una mutación en *RET* en un paciente con DNI B aislada. Esta mutación (R982C) fue descrita por primera vez por Mulligan et al. (Mulligan et al., 1994) en una familia MEN2A y HSCR, y en 3 de 142 cromosomas control, por lo que se consideró un polimorfismo raro. El impacto biológico de la mutación R982C fue investigado *in vitro* en el oncogén quimérico *RET/PTC2* con capacidad de transformar fibroblastos de ratones NIH3T3 y células de feocromocitoma de ratas pC12. La introducción de esta mutación no alteraba la capacidad de transformación o la fosforilación de tirosinas (Pasini et al., 1995a). No obstante, el resultado de este estudio funcional debe de interpretarse con precaución, ya que el impacto de dicha mutación en el desarrollo de DNI B *in vivo* puede ser completamente distinto al impacto *in vitro*, y por lo tanto es difícil de evaluar el efecto fisiológico exacto de esta y otras mutaciones. Nosotros postulamos que la introducción de un nuevo residuo de cisteína en el receptor RET puede afectar a su plegamiento final debido a la generación de puentes disulfuro alternativos, lo que podría dificultar su correcto transporte a la membrana o la activación de las rutas de señalización fundamentales para el desarrollo del SNE. Nuestro estudio *in silico* predice que los puentes disulfuros presentes en la proteína mutante son completamente distintos a los de la proteína silvestre, apoyando esta hipótesis. Finalmente también existe la posibilidad de que la presencia de esta mutación incremente el riesgo de desarrollar alteraciones en el SNE al interferir con la expresión de RET, en lugar de con su función (Sancandi et al., 2000). A pesar de todo, la presencia de esta mutación en individuos no afectados nos hace concluir que su papel en DNI B, si es que existe, es menor e insuficiente para explicar la aparición del fenotipo. Por lo tanto, podemos especular con la posibilidad de que

esta mutación pueda predisponer al individuo portador a padecer alteraciones en el SNE, tales como DNI B, ya sea por una pérdida de funcionalidad en la proteína generada o a la haploinsuficiencia debida al descenso de la expresión de la copia del gen mutada. Pero en cualquier caso no podemos afirmar que ésta sea una mutación causal de DNI B.

Por otra parte, con respecto al análisis de la distribución de las variantes y haplotipos de *RET* en los distintos grupos de pacientes (HSCR aislado, DNI B aislado, HSCR+DNI B) entre sí y con controles, podemos extraer varias conclusiones. La similitud en la frecuencia y distribución de la mayoría de las variantes de *RET* analizadas entre el grupo de pacientes DNI B+HSCR y HSCR aislado, nos indican que no hay diferencias esenciales entre ambos grupos. Además, la misma asociación que existe entre polimorfismos de *RET* específicos y DNI B+HSCR al comparar con controles, ha sido previamente encontrada en nuestra serie de pacientes HSCR aislados (Borrego et al., 1999; Emison et al., 2005). Esto parece indicar que para estos casos, los cambios generados para la aparición de DNI B en los pacientes con ambos fenotipos deben de ser un fenómeno secundario inducido bien, por los mismos mecanismos que dan lugar a HSCR, pero probablemente modulados por una combinación de otros modificadores genéticos, o bien por la propia obstrucción debida a HSCR, que es capaz de provocar los cambios en el SNE que se observan en DNI B de manera secundaria. La única variante que presentó una distribución diferente en los dos grupos de pacientes fue G691S (c.2071C>A), que estuvo completamente ausente en el grupo DNI B+HSCR. Esta variante se había encontrado sub-representada en pacientes HSCR vs controles en estudios anteriores (Borrego et al., 1999), sugiriendo que el alelo S691 podría tener un efecto protector frente al desarrollo de HSCR con baja penetrancia. También se podría postular que el alelo G691 podría estar confiriendo susceptibilidad a sufrir DNI B, pero únicamente en presencia de HSCR. En conjunto, estos datos refuerzan la idea de que la variante G691S de *RET* tiene un papel funcional en el desarrollo de alteraciones en el SNE, o está en desequilibrio de ligamiento con alguna otra variante que lo tiene. Aunque está hipótesis debe ser estudiada con la apropiada estrategia experimental.

Al realizar el análisis comparativo de DNI B aislado vs controles, pudimos deducir, que el *locus* c.2307 (p.769) podría estar relacionado con DNI B. Curiosamente pudimos observar que, mientras la distribución alélica en este *locus* no mostró diferencias significativas entre DNI B y controles, la distribución genotípica mostró cierta tendencia a la significación ($p=0.01$). A partir de estudios anteriores sabemos que la variante L769L y el haplotipo que lo incluye se

encuentran sobre-representados en pacientes HSCR al comparar con población sana (Borrego et al., 2003; Pelet et al., 2005). Un análisis detallado de los datos muestra que esta significación se debe a un exceso de individuos homocigotos para el alelo G en casos frente a controles. Más específicamente se detectó homocigosidad para el alelo G en 3 de 7 casos portadores de dicho alelo (42.85%) y 4 de 19 controles (21.05%). Por lo tanto, podría ser posible que el alelo c.2307G pudiera tener algún efecto, aunque sutil, en la manifestación del fenotipo DNI B, siendo necesaria su presencia en homocigosis, y probablemente en combinación con otras variantes que no se consideraron en este estudio.

Cabe destacar que las variantes L769L y c.74-1370C>T, son las únicas variantes asociadas a HSCR que no mostraron asociación con DNI B al comparar con población control. Todos los demás polimorfismos de *RET* que habían sido previamente descritos en asociación con HSCR (c.73+9277T>C, c.74-1463T>C, c.74-126G>T, c.3187+47C>T), mostraron diferencias significativas en la distribución tanto alélica como genotípica al comparar DNI B con HSCR, tal y como ocurre con HSCR vs controles. Este hecho nos lleva a una tercera y última conclusión, y es que ambas patologías parecen estar causadas por eventos moleculares distintos.

En conclusión, basándonos en los resultados derivados del rastreo mutacional de *RET* y del análisis de sus variantes y haplotipos, hemos obtenido signos de la implicación del proto-oncogén *RET* en la patogénesis de DNI B, aunque a través de mecanismos diferentes a los que dan lugar a HSCR. Desafortunadamente, los resultados que hemos obtenido no nos permiten distinguir si la aparición de la DNI B en asociación con HSCR es un evento secundario debida a la obstrucción intestinal provocada por la aganglionosis, que además dependería de la presencia de factores genéticos que predispongan al individuo, o es un evento independiente. En este último caso la aparición de DNI B tanto asociada a HSCR como aislada parece depender en cierta medida de *RET*. En cualquier caso, se necesitaran investigaciones adicionales, y en una serie de pacientes más extensa, para poder dilucidar los mecanismos específicos que dan lugar a la DNI B y clarificar, por lo tanto, su naturaleza genética.

Por otra parte, la ausencia de mutaciones en los ligandos de RET en nuestros pacientes DNI B no debe sorprendernos, ya que no sólo se trata de una serie de pacientes reducida, sino que además son raros los casos de mutaciones en estos genes en pacientes HSCR (Tam y García-Barceló, 2009), por lo tanto sería necesario realizar el rastreo en una serie mucho más extensa de pacientes para

poder obtener resultados positivos, en el caso en que los ligandos de RET jugaran un papel similar en la aparición de HSCR y de DNI B.

E.6.2. Evaluación de los genes EDNRB y EDN3 como genes de susceptibilidad para DNI B

La presencia de características histológicas propias de DNI B en el intestino de modelos animales con mutaciones en heterocigosis en *Ednrb* y *Edn3* (Boyen et al., 2002; Sandgren et al., 2002), indican que la ruta de señalización en la que participan estos genes podría jugar un papel muy importante en la DNI B, como ya lo juega en la aparición del fenotipo HSCR. Estos datos nos hicieron plantearnos el estudio molecular de ambos genes en los pacientes DNI B de los que disponemos en nuestro laboratorio. El rastreo mutacional de *EDNRB* y *EDN3* en humanos en el contexto de esta patología no ha determinado la presencia de variantes causales en estudios previos (Gath et al., 2001). Es por ello que en el presente trabajo no sólo hemos rastreado la región codificante de ambos genes, sino que también hemos realizado un estudio de asociación a partir de polimorfismos en estos genes, mediante un estudio clásico de casos y controles.

No encontramos mutaciones que pudieran estar asociadas a la aparición de DNI B aislado en los 23 pacientes rastreados, en ninguno de los dos genes. De la misma manera, no encontramos asociación con la enfermedad de ninguno de los polimorfismos genotipados, ni de sus combinaciones, aunque sí lo encontramos para el fenotipo combinado HSCR+DNI B al comparar con controles, en el caso del polimorfismo de *EDN3* (rs6064764) que resultó asociado a HSCR aislado. Este resultado viene a reforzar que, con respecto a estos genes, los pacientes con el fenotipo combinado HSCR+DNI B, se comportan básicamente de la misma manera que los pacientes HSCR aislados, tal y como ocurre con la mayor parte de polimorfismos genotipados para *RET* (sección E.9.1). La ausencia de asociación de *EDNRB* y *EDN3* con DNI B aislado, podría indicar la ausencia de una implicación real de esta ruta de señalización con DNI B. Sin embargo, al tratarse de una cohorte tan reducida de pacientes, no podemos descartar completamente esta hipótesis. De hecho, el limitado número de pacientes DNI B disponibles para hacer análisis de genética molecular, es un problema recurrente en los estudios presentados por distintos investigadores (Costa et al., 2000; Gath et al., 2001; Fava et al., 2002; Borghini et al., 2009). Esta limitación para el avance en el conocimiento de las bases moleculares, y de las causas de la aparición de DNI B, puede deberse a la

dificultad del manejo clínico de los pacientes con estreñimiento crónico, a la ausencia de un criterio diagnóstico universalmente aceptado para DNI B hasta hace unos años y a la baja incidencia de esta enfermedad. Esto, unido a la controversia que existe en torno al reconocimiento de DNI B como entidad patológica por sí misma, ha hecho que la identificación de estos pacientes y su derivación a los servicios de genética se haya retrasado. Es de esperar que nuestra cohorte se vea aumentada en los próximos años, por lo que este estudio debería de replicarse con una serie de pacientes mayor en el futuro, para determinar cuál es el papel real que juegan estos genes en la aparición de DNI B.

Existe un modelo animal para esta patología carente del gen *Spry2*, en los que se observa una hiperplasia de los nervios entéricos que provocan acalasia esofágica y pseudo-obstrucción intestinal (Taketomi et al., 2005). Otro de los modelos animales para DNI B, es el modelo murino con mutaciones en el gen *Hox11L1* que está completamente caracterizado a nivel histológico, encontrándose muchas similitudes con el fenotipo DNI B en humanos (Shirasawa et al., 1997; Hatano et al., 1997; Yamataka et al., 2001; Yanai et al., 2004). Además, el estudio histológico de este modelo animal ha permitido identificar neuronas inmaduras persistentes en el SNE de los mismos (Kato et al., 2009), dándonos una posible explicación sobre la etiopatogenia de los síntomas observados en pacientes DNI B. A la vista de estos datos, sería muy interesante realizar el estudio molecular de estos genes en una cohorte de tamaño adecuado de pacientes DNI B, ya que estudios con un número bajo de pacientes arrojaron resultados negativos en ambos casos (Costa et al., 2000; Fava et al., 2002; Borghini et al., 2009). Además, la presencia de distintos modelos animales para la misma patología, en los que se ven afectados distintos genes parece indicar que, al igual que ocurre en HSCR, la aparición de las mismas anomalías del SNE podría deberse a la presencia de múltiples factores genéticos. Por este motivo, es importante caracterizar de la forma más completa posible, el fondo genético de los pacientes DNI B, y estudiar si existe o no una interacción de varios genes en dichos pacientes para dar lugar al fenotipo.

Ya hemos descrito con anterioridad la importancia de distintas proteínas pertenecientes a la familia de BMP en el desarrollo del SNE. Cabe destacar los resultados de modelos animales carentes de *Bmp4*, que no desarrollan aganglionosis sino hipoganglionosis y reducción de tamaño de los ganglios (Goldstein et al., 2005). Este hallazgo nos hace pensar que quizá la sobre-expresión de dicha proteína pudiera generar aumento del tamaño o del número de ganglios entéricos. De hecho, la sobre-expresión de *Ntf3* en ratas provoca la

hiperplasia de plexo mientérico (Chalazonitis et al., 2004). De esta manera, la DNI B podría aparecer como consecuencia de una ganancia de función de este u otros genes implicados en la formación del SNE, más que debido a la aparición de mutaciones deletéreas. La estrategia que tradicionalmente se ha adoptado en el estudio de las causas moleculares de DNI B, y que se ha seguido en el presente trabajo, ha sido la búsqueda de mutaciones truncantes en genes candidatos para esta enfermedad. Debido a los conocimientos que tenemos sobre el desarrollo del SNE, así como a la ausencia de resultados positivos en los trabajos publicados hasta la fecha, nosotros proponemos que es necesario un cambio en el abordaje de esta enfermedad que incluya el análisis de la región promotora en busca de nuevas variantes *enhancer* o el rastreo de genes en los que se haya podido producir una ganancia de la dosis génica que aumente el nivel de expresión en ciertas proteínas como BMP4 o NTF3, entre otras.

Aunque se necesita aumentar el conocimiento sobre las bases genéticas de la DNI B, debemos reconocer que los resultados que hemos obtenido son compatibles con la hipótesis de la aparición de la displasia como consecuencia de factores ambientales, más que por la presencia defectos genéticos. De hecho, la estenosis intestinal experimental provoca cambios hiperplásicos post-natales, propios de DNI B (Gabella, 1984), poniendo de manifiesto la plasticidad del SNE tras el nacimiento del individuo. Esto refuerza la convicción de muchos patólogos, que consideran que la displasia es una característica secundaria inducida por una alteración distal de la motilidad intestinal de distinto origen (Kapur, 2003). Es una realidad constatada que el individuo no sólo es consecuencia de su información genética, sino de la interacción de ésta con su ambiente. Por ello, proponemos que, a pesar de la importancia que pueda tener la aparición de lesiones obstructivas en el fenotipo DNI B, es necesario ahondar en las causas genéticas que pudieran estar implicadas en esta patología, mediante el estudio de series de pacientes de tamaño adecuado, usando la tecnología apropiada, antes de descartarlas por completo.

E.7. Asociación de una mutación en el gen *SOX10* con el fenotipo HSCR aislado

Todos los miembros de la familia Sox contienen un dominio HMG de unión a DNA. Este dominio contiene tres regiones α -hélice que se disponen formando el motivo conservado de giro en L (*twisted L shaped*) para el reconocimiento específico de secuencias de ácidos nucleicos. Dicho reconocimiento y consiguiente unión específica, da lugar a una reorganización conformacional en el DNA. Existen

en la proteína dos señales independientes de localización nuclear en los extremos de este dominio de unión a DNA (Kuhlbrodt et al., 1998a). La proteína SOX10 también contiene un dominio de transactivación, consistente en una secuencia de 113 residuos aminoacídicos en el extremo carboxilo-terminal, que es requerido para la activación transcripcional (Kuhlbrodt et al., 1998a). Varios estudios *in vitro* han mostrado las consecuencias funcionales de distintas mutaciones en *SOX10* localizadas a lo largo de toda su secuencia, ya que no se han detectado puntos calientes de mutación en este gen (Kuhlbrodt et al., 1998a; Bondurand et al., 1999; Hilleren et al., 1999; Inoue et al., 2004; Verheij et al., 2006). La mayor parte de mutaciones *nonsense* que afectan a los primeros exones del gen dan lugar a pequeños mRNAs aberrantes que suelen ser eliminados antes de ser traducidos, generando haploinsuficiencia en la célula debida al mecanismo celular NMD-mRNA, que es responsable del fenotipo WS4 (Hilleren et al., 1999; Inoue et al., 2004; Verheij et al., 2006). Por el contrario, las mutaciones que afectan a los últimos exones del gen, que codifican el dominio de transactivación, se escapan de este mecanismo de protección celular frente a mRNAs aberrantes y muestran un efecto dominante negativo al competir con la proteína WT por la unión del promotor, por lo que dan lugar a fenotipos más agresivos como el PCWH (Inoue et al., 2004). Sin embargo, la reciente observación de deleciones completas en *SOX10* en pacientes que presentaban el síndrome PCWH sugiere que mecanismos distintos al NMD-mRNA podrían explicar esta variabilidad fenotípica (Bondurand et al., 2007).

Las dos mutaciones *frameshift* que se describen en el presente trabajo generan péptidos carentes de todos los dominios funcionales, ya que la secuencia silvestre de la proteína se pierde a partir de la posición 37 y 52 respectivamente. Nuestros estudios funcionales *in vitro* demuestran no sólo que las proteínas mutantes tienen una localización citosólica aberrante, sino que también carecen de actividad transactivadora y no tienen efecto negativo dominante. Por lo tanto, nosotros proponemos haploinsuficiencia como el mecanismo más plausible por el que aparecen WS4 y HSCR en los dos pacientes de nuestra cohorte en los que hemos encontrado mutaciones en *SOX10* (Sánchez-Mejías et al., 2010b).

La asociación entre HSCR sindrómico y mutaciones en *SOX10* está bien establecida, ya que la mayor parte de los pacientes que portan mutaciones en heterocigosis en este *locus* presentan HSCR como parte de un cuadro sindrómico. De hecho, se han descrito muy pocos pacientes con mutaciones en *SOX10* que no presenten HSCR u otras alteraciones entéricas (Pingault et al., 1998, 2002; Bondurand et al., 1999, 2007; Touraine et al., 2000; Sznajder et al., 2008), aunque las mutaciones en *SOX10* muestran una gran heterogeneidad fenotípica. Cabe

destacar que para muchos de estos pacientes que presentaban características propias de WS de manera aislada (WS2), se había sugerido la posibilidad de que se debiera a una compensación específica de tejido que tuviera lugar en el SNE por la presencia de otras proteínas pertenecientes a la familia SOX. Así que mutaciones en *SOX10* podrían afectar sólo a una subpoblación de las células derivadas de la cresta neural distintas a las que origina el SNE. Otros genes responsables de WS4 han demostrado ser también responsables de formas aisladas de HSCR, como ocurre en pacientes con mutaciones en heterocigosis en *EDNRB* y *EDN3* (Svensson et al., 1999; Attie et al., 1995b; Ederly et al., 1996; Hofstra et al., 1996; Verheij et al., 2002). Sin embargo, hasta ahora, no se habían descrito mutaciones en *SOX10* asociadas a pacientes HSCR aislado. Nuestro hallazgo sugiere que, de la misma manera que ocurre para HSCR aislado, es posible que mutaciones en *SOX10* sean responsables de desórdenes de la mielina en el SNC o SNP, que pueden aparecer en pacientes sin características propias de WS ni alteraciones entéricas, a pesar de los resultados negativos que se han encontrado hasta el momento (Pingault et al., 2001).

La mutación c.153del es la primera mutación en *SOX10* reportada en una paciente HSCR aislado sin ninguna otra característica propia de WS. Es difícil explicar cómo esta mutación en concreto, en este paciente, puede afectar a la población de células derivadas de la cresta neural que coloniza el intestino y no a aquellas que dan lugar a otros tejidos. La posibilidad de que el paciente fuera un mosaico no parece factible, ya que la mutación fue heredada de la madre, y lo más probable es que esté presente en todas las células del individuo. La madre portadora de la mutación, no presentaba ningún rasgo clínico de WS o de HSCR tras una cuidadosa anamnesis y un detallado examen clínico. La falta de signos clínicos en la madre podría concordar con un modelo de penetrancia parcial dependiente de sexo que se ajustaría con el sesgo observado de manera general en HSCR (4:1 de varones afectados frente a mujeres). Otra posibilidad es que la distribución de la mutación en la madre sea en mosaico. Desgraciadamente la opción de testar esta posibilidad fue desechada por considerarse poco justificado debido al riesgo/beneficio de la intervención. En cualquier caso, este fenómeno no explicaría el fenotipo concreto del paciente afecto, ni tendría consecuencias sobre la penetrancia de la mutación en la descendencia.

La ausencia de síntomas que sugieran WS en este paciente HSCR con una mutación en *SOX10* podría también explicarse mediante la propia naturaleza de la mutación. Se ha demostrado que las mutaciones que dan lugar a una proteína truncada antes del dominio HMG en lugar de tener un efecto dominante negativo,

son funcionalmente equivalentes a mutaciones nulas y generan haploinsuficiencia en la célula (Inoue et al., 2004). Este tipo de mutaciones tienden a correlacionarse con casos menos severos de HSCR y WS, pudiendo ser este el caso de la mutación c.153del. La haploinsuficiencia podría tener consecuencias más dramáticas en el desarrollo del SNE que en el desarrollo de otros derivados de la cresta neural (melanocitos de la piel y del oído interno), en los que una reducción en la dosis normal de *SOX10* podría verse suplida por la función redundante de otros miembros de la familia *SOX* con un patrón de expresión diferencial con respecto al SNE, como es el caso de *SOX8*, *SOX22* o *LSox5* (Hong y Saint-Jeannet, 2005). De hecho se ha propuesto la existencia de una función redundante entre las proteínas del grupo *SOX* (*SOX8*, *SOX9* y *SOX10*). Además, la pérdida de función de *Sox8* en embriones de ratón con mutaciones en heterocigosis en *Sox10*, aumenta la penetrancia y la severidad de la aganglioneosis colónica observada en dichos animales (Maka et al., 2005). Esta es la primera vez que se reporta una mutación en *SOX10* que no da lugar a ninguna alteración fenotípica sugestiva de WS, por lo tanto deben de existir otros fenómenos adicionales que tengan lugar en este paciente en concreto y que expliquen esta diferencia de fenotipo observada, como por ejemplo un aumento de la expresión del alelo silvestre en los tejidos que no se ven afectados. Además, dado que HSCR es un paradigma de enfermedad compleja y poligénica, también podemos proponer la intervención de otros genes modificadores aún no identificados que junto con *SOX10* pueden dar lugar al fenotipo entérico de manera aislada.

Como conclusión podemos decir que el resultado más relevante del presente trabajo ha sido la detección de una mutación en *SOX10* en un paciente HSCR aislado, que demuestra la implicación de este gen en la patogénesis de HSCR por sí mismo, y no como parte de un cuadro sindrómico. Este hallazgo da una nueva perspectiva del papel de *SOX10* en HSCR y constituye un nuevo paso hacia la disección de la naturaleza poligénica de esta enfermedad.

E.8. Evaluación de los genes *SEMA3A* y *SEMA3D* como genes de susceptibilidad para HSCR

Uno de los objetivos de la investigación en la genética del desarrollo del SNE, es el de establecer los fundamentos conceptuales para entender la estructura y funcionamiento de los circuitos neuronales entéricos. Los miembros de la subfamilia de semaforinas de clase III son proteínas quimiotácticas que actúan durante el guiado axonal, pudiendo actuar tanto atrayendo como repeliendo las

proyecciones axonales de varios tipos de neuronas a lo largo del SNC y SNP (Roth et al., 2009). Existen varias evidencias que nos animan a proponer las 6 mutaciones *missense* encontradas en el presente trabajo en los genes que codifican para las semaforinas (*SEMA3A*: A131T, V435I, S598G; *SEMA3D*: I198K, P615T, R634Q) como factores de susceptibilidad para HSCR. Por una parte, todas estas variantes se localizan en dominios funcionales de la proteína, y 4 de ellas resultaron estar completamente ausentes en población control. A pesar de que la ausencia de una mutación en población control es una característica necesaria para considerarla como causante de enfermedad (Hofstra et al., 1997), en enfermedades complejas como HSCR la presencia de factores de susceptibilidad en controles es un fenómeno esperable, ya que el fenotipo aparece por el efecto aditivo de varios eventos genéticos independientes que concurren en un mismo individuo (Tam y García-Barceló, 2009). Sin embargo, la frecuencia de factores de susceptibilidad para una enfermedad debe ser mayor en los pacientes que en población control, tal y como ocurre con las variantes V435I y P615T en *SEMA3A* y *SEMA3D* respectivamente. Por otra parte, las predicciones *in silico* realizadas muestran un efecto perjudicial sobre la proteína de muchas de las mutaciones detectadas. Sería interesante realizar estudios funcionales *in vitro* para comprobar el efecto de las mutaciones detectadas en el presente trabajo sobre la expresión de *SEMA3A* y *SEMA3D*, así como de la eficiencia de unión ligando/receptor o la especificidad de reconocimiento por parte del receptor. De hecho nuestro grupo está trabajando en el desarrollo de un ensayo funcional que nos permita determinar si las mutaciones detectadas en el dominio Ig-Like afectan a la unión al receptor de las proteínas mutantes al compararlas con las silvestres. Los resultados de estos estudios nos ayudarán a comprender mejor el papel de la semaforinas en el desarrollo del SNE.

Las semaforinas actúan como moduladores cruciales durante el desarrollo de distintas estructuras a lo largo de todo el organismo, estando implicadas en el establecimiento de órganos y tejidos complejos altamente estructurados como la corteza cerebral, el hipocampo, el corazón o el pulmón entre otros (Roth et al., 2009). Dado que las semaforinas tienen este papel fundamental en el desarrollo una expresión o función aberrante de las mismas podría resultar en un efecto pleiotrópico en el organismo, tal y como se ha observado en modelos animales carentes de Sema3A o Neuropilina-1 (Serrín et al., 2003). Esta hipótesis concuerda con la falta de mutaciones nulas en nuestros resultados. Por el contrario, es más plausible que las mutaciones *missense* detectadas en los genes *SEMA3A* y *SEMA3D* causen un efecto sutil en la función proteica, y/o que la hemidosis en estos genes sea suficiente para mantener una señalización normal en la mayor parte de las células. El fondo genético del individuo, en combinación con la presencia de estas

mutaciones hipomórficas en los genes de las semaforinas podrían dar lugar al fenotipo específico observado en nuestros pacientes, de acuerdo con el modelo de herencia aditiva propuesto para HSCR (Amiel et al., 2008; Tam y García-Barceló, 2009). De esta manera, nosotros proponemos que la presencia de estas variantes podría dañar de alguna manera la correcta función de *SEMA3A* y *SEMA3D*, afectando al proceso de generación de la red de neuronas entéricas, o a la migración y diferenciación de los precursores neurales en el intestino, o a ambos procesos. Así, dichas alteraciones tendrían consecuencias en la formación del SNE, generando consecuencias con trascendencia en la clínica en aquellos casos en los que existan otros factores genéticos que contribuyan a un fallo en el desarrollo de los ganglios entéricos.

Cabe destacar la alta e inesperada frecuencia de concurrencia de mutaciones en la secuencia codificante de *RET* y de *SEMA3A*, ya que el 50% de los pacientes con mutaciones en este *locus* también son portadores de mutaciones en la secuencia codificante de *RET*. Además, todos los pacientes portadores de mutaciones en *SEMA3A* y *SEMA3D* también habían heredado la mutación en el dominio *enhancer-like* del intrón 1 de *RET* asociada a HSCR (Emison et al., 2005). Es bien conocido, que la activación de *RET* es esencial para la migración y diferenciación de los precursores neurales entéricos (Taraviras et al., 1999). La mayor parte de las neuronas entéricas proceden de derivados neurales de la región vagal, a pesar de que la región sacra también aporta ciertos tipos neuronales al SNE, principalmente en la región posterior al intestino ciego (Gershon y Ratcliffe, 2006; Anderson et al., 2006), tal y como se describe en el apartado A.1. La migración de los precursores entéricos de origen vagal en el intestino ha demostrado depender principalmente de la proliferación en el frente de avance migratorio (Simpson et al., 2007). Por esta razón, mutaciones en *RET* pueden llegar a causar un fallo en la colonización de estas células de la región más distal del colon en un número suficiente para la formación de ganglios entéricos, dando lugar a HSCR (Amiel et al., 2008), aunque el fondo genético del individuo tiene un gran impacto en este proceso (Tam y García-Barceló, 2009). La expresión de *GDNF* en la región final del intestino es más baja que en el ciego (Natarejan et al., 2002), por lo que muchos autores han propuesto que la migración y la proliferación de los precursores sacrales es menos dependiente de *GDNF* que la de los vagales. Además, las células derivadas de la cresta neural sacra son capaces de migrar a través del intestino pre-ciego, aunque más letalmente que las vagales (Anderson et al., 2007). Por si fuera poco, la ausencia de precursores neurales o sus derivados en el intestino puede actuar como señal para que las células derivadas de la cresta neural sacra migren y colonicen dichas regiones aganglionicas en el intestino en

desarrollo (Druckenbrod y Epstein 2005, 2007; Young et al., 2004; Anderson et al., 2007). En este escenario nosotros proponemos que la ausencia de ganglios entéricos en las regiones distales del intestino, debido a fallos en los precursores de origen vagal, podría ser rescatada por la migración y la diferenciación de precursores de origen sacral. Por otra parte, se ha demostrado que *SEMA3A* regula la entrada de las células derivadas de la cresta neural sacra en la región distal del intestino en formación (Anderson et al., 2007). De hecho, defectos en esta proteína afectan a la correcta entrada de dichos precursores en el intestino (Anderson et al., 2007). Por lo tanto, resulta tentador especular con la posibilidad de que un fallo en la colonización del intestino distal por parte de los precursores sacrales en la ventana temporal adecuada, debido a mutaciones en *SEMA3A* pudieran tener un efecto más dramático en aquellos pacientes con mutaciones adicionales en *RET*, ya que *SEMA3A* no afecta a los precursores derivados de la cresta neural vagal (Shepherd y Raper, 1999). La ausencia de fenotipo entérico en los familiares de nuestros pacientes HSCR con mutaciones aisladas en *RET* o *SEMA3A*, sería totalmente compatible con nuestra hipótesis.

Esta es la primera vez que se asocian mutaciones en los genes que codifican a las semaforinas con HSCR. Este hallazgo confirma la implicación funcional de las semaforinas como moléculas de señalización en el desarrollo del SNE, tal y como se había propuesto con anterioridad a pesar de la falta de evidencias que lo confirmasen en humanos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que, al menos *SEMA3A* y presumiblemente también *SEMA3D*, están actuando como factor modificador de la penetrancia de mutaciones en *RET* en nuestra serie de pacientes HSCR. Hemos propuesto una explicación plausible sobre mecanismo molecular que controla la manera en la que estos genes interaccionan durante la formación de los ganglios entéricos. La confirmación de esta hipótesis podría revelar información muy útil sobre la migración y la diferenciación de distintas subpoblaciones de células derivadas de la cresta neural durante el desarrollo del SNE.

E.9. Implicación en HSCR de una CNV en el gen *GFRA1* en un caso familiar de HSCR

Los dos genes más importantes en la aparición de HSCR son *RET* y *EDNRB* (Amiel et al., 2008). Sin embargo, esta enfermedad tiene una genética compleja y se han descrito mutaciones puntuales en varios genes tanto en casos aislados como esporádicos de la enfermedad, aunque las mutaciones en estos genes minoritarios

en su conjunto no son una causa común de la aparición del fenotipo HSCR (Tam y García-Barceló, 2009).

Nosotros nos planteamos la posibilidad de que otros eventos genéticos distintos de las mutaciones puntuales o las pequeñas deleciones/inserciones, como pudieran ser las CNVs, tuvieran un papel funcional en la patogénesis de HSCR. Se conoce muy poco en este campo, ya que los métodos que tradicionalmente se han usado en los rastreos de los genes implicados en HSCR están basados en la PCR convencional, como SSCP, dHPLC o análisis de secuencia, que sólo detectan pequeñas deleciones o duplicaciones; y en técnicas de citogenética, que son capaces de detectar solamente deleciones y duplicaciones del orden de megabases. Ninguna de estas técnicas son ni potentes ni adecuadas para la detección de CNVs que afectan regiones específicas de unas pocas kilobases (Sellner et al., 2004), y por lo tanto han podido no ser detectadas con anterioridad al estudiar distintas series de pacientes HSCR y por lo tanto su frecuencia en los genes relacionados con esta enfermedad se ha podido ver subestimada. Además, las técnicas que se usan para la detección de este tipo de deleciones/duplicaciones, como el southern blot, son caras y consumen mucho tiempo, por lo que no son adecuadas para un rastreo en un alto número de pacientes, por lo que no se han usado como rutina en estudios sobre pacientes HSCR. Esta es la razón por la que nos planteamos el screening de los genes previamente asociados con HSCR *EDNRB*, *GFRA1*, *NRTN* y *PHOX2B* en nuestra serie de pacientes HSCR utilizando tecnología MLPA, que puede llevarse a cabo en un alto número de pacientes en un corto periodo de tiempo. A pesar de los resultados negativos previamente obtenidos con el kit comercial de MLPA para HSCR (Nuñez-Torres et al., 2009; Serra et al., 2009), con esta nueva aproximación técnica para el análisis de otros genes hemos obtenido resultados positivos con el hallazgo de una deleción que afecta a los 4 primeros exones de *GFRA1* en dos pacientes HSCR independientes, y estaba ausente en controles (Sánchez-Mejías, 2010c). Esta deleción ya había sido previamente identificada en un paciente HSCR esporádico, pero su implicación en la aparición del fenotipo no había sido esclarecida (Borrego et al., 2003b). El hallazgo de esta deleción en un paciente HSCR completamente independiente y su ausencia en población control, apoyan la idea de que esta deleción en el gen *GFRA1* podría estar potencialmente implicada en la aparición del fenotipo. Además, la implementación de la técnica de MLPA para estos genes ha permitido refinar la región delecionada y predecir la falta de funcionalidad de la posible proteína que se expresaría a partir del alelo delecionado. La proteína $GFR\alpha 1$, es uno de los 4 correceptores de RET. La unión de RET y $GFR\alpha 1$ es necesaria para el reclutamiento específico de GDNF y la consiguiente fosforilación de RET. Por lo tanto, la presencia de esta deleción en el

correceptor impediría la expresión de la proteína, y presumiblemente también la fosforilación de RET, afectando al correcto desarrollo del SNE. Nosotros proponemos que esta mutación podría ser necesaria pero no suficiente para producir el fenotipo, debido a la presencia de la misma en miembros no afectados de la familia. Por lo tanto, parece que otras mutaciones o variantes de secuencia en otros genes, aún no identificadas, podrían estar actuando junto con la delección descrita en estos pacientes HSCR. En este sentido, merece la pena destacar que en este paciente, o en el otro previamente descrito con la misma delección, no se encontraron mutaciones puntuales en la región codificante de los genes relacionados con HSCR rastreados: *RET*, *GDNF*, *NRTN*, *PSPN*, *ARTN*, *EDNRB*, *EDN3*, *NTF3*, *NTRK3*, *SOX10* y *PHOX2B*.

Uno de los objetivos del presente trabajo fue el de conseguir una técnica sencilla, fidedigna y económica que sirviera como método de rastreo de CNVs en genes relacionados con HSCR que no habían sido analizados para este tipo de alteraciones. En este sentido, el presente trabajo ha conseguido validar nuestro diseño de sondas para el rastreo de CNVs mediante MLPA. El diseño y la validación de sondas de MPLA en genes adicionales supone una importante implementación en una técnica que estaba restringida a la producción comercial. De esta manera, el presente diseño, junto con el kit de MLPA comercial para HSCR, permite el análisis completo de la región codificante de aquellos genes con mayor prevalencia en la enfermedad de HSCR. Además, la presencia de una delección en *GFRA1* que implida la correcta función de la proteína expresada, en un paciente HSCR adicional apoya y confirma la idea de que esta delección específica podría tener un papel importante en la aparición de fallos durante la formación del SNE. A pesar de que las CNVs parecen ser un factor de susceptibilidad poco frecuente en la aparición de HSCR, nuestros resultados ponen de manifiesto la importancia de tener en cuenta a las CNVs en los estudios de pacientes HSCR a partir de ahora, al menos en el caso del gen *GFRA1* (Sánchez-Mejías et al., 2010c). El rastreo de CNVs en series de pacientes adicionales podrá esclarecer la implicación real de estos eventos moleculares en la patogénesis de HSCR.

F. CONCLUSIONES

F.1. Se confirma la implicación del gen *NRTN* en la patogénesis de la enfermedad de Hirschsprung con el análisis de las consecuencias funcionales sobre dicha proteína de la mutación F127L. Posteriores estudios *in vivo* podrán esclarecer el mecanismo molecular por el cual se produce la aganglionosis en estos pacientes.

F.2. Las consecuencias funcionales de la presencia de la mutación R91C en *PSPN* sobre el nivel de expresión de la proteína y la capacidad de activación de RET observadas en el presente trabajo demuestran, por primera vez la implicación de PSPN en la patogénesis de la enfermedad de Hirschsprung.

F.3. La identificación de la mutación R72H en el gen *ARTN*, sugiere que ARTN podría constituir un nuevo gen asociado a la enfermedad de Hirschsprung, a pesar de que los estudios funcionales *in vitro* no han podido verificar dicha hipótesis y sería necesario analizar las consecuencias *in vivo* de dicha mutación.

F.3. Hemos descartado el polimorfismo c*587T>C localizado en el extremo 3'UTR de *RET* como factor de protección frente a la enfermedad de Hirschsprung, en contra de lo que había sido previamente reportado.

F.4. Hemos asociado, por primera vez, la presencia de mutaciones en la región codificante de *NTRK3* con la enfermedad de Hirschsprung. Describiendo, por lo tanto, un nuevo gen de susceptibilidad para dicha enfermedad.

F.5. La descripción de una familia en la que tenía lugar la combinación de mutaciones en *NTRK3*, *RET* y *EDN3* confirma que la aparición del fenotipo Hirschsprung responde al efecto sumatorio de varios alelos deletéreos en genes distintos. La presencia de la mutación c.560insA en *EDN3* parece actuar como factor modificador de la expresión de esta enfermedad en dicha familia.

F.6. La frecuencia mutacional de los genes *EDNRB* y *EDN3* en nuestra serie de pacientes Hirschsprung es similar a la de otras series presentadas con anterioridad. La presencia de la mutación K15X de parada prematura de la traducción de la isoforma *EDNRB Δ 3*, podría indicar la implicación de esta isoforma en el desarrollo del SNE.

F.7. Se ha demostrado, por primera vez, la asociación de variantes comunes en *EDN3* con la enfermedad de Hirschsprung. La asociación del alelo *EDN3* c.365+7474T a la enfermedad sugiere que es necesaria la consideración de dicho gen como gen de susceptibilidad común en los casos esporádico con una penetrancia reducida, y no sólo como gen menor para esta enfermedad tal y como estaba considerado hasta la fecha.

F.8. Como resultado de la evaluación del proto-oncogén RET en el contexto de la displasia neuronal intestinal tipo B, hemos obtenido indicios de su implicación en esta patología, aunque a través de mecanismos diferentes a los que dan lugar a la enfermedad de Hirschsprung. Por otra parte se necesitan investigar las causas moleculares de la DNI B en una serie más amplia de pacientes para poder determinar si la ausencia de mutaciones causales en los genes analizados es debida al bajo número de pacientes rastreados o a la ausencia de la implicación de los mismos en la aparición de la enfermedad.

Conclusiones

F.9. Hemos detectado, por primera vez, una mutación en la región codificante de *SOX10* en un paciente Hirschsprung esporádico, sin síntomas indicativos de síndrome de Waanderburg. Esto demuestra la asociación de *SOX10* con el fenotipo Hirschsprung *per se*, no sólo como parte de cuadro sindrómico característico de Waanderburg.

F.10. Se han detectado, por primera vez, mutaciones en los genes *SEMA3A* y *SEMA3D* en pacientes con la enfermedad de Hirschsprung. Esta es la primera vez que se asocian mutaciones en los miembros de la ruta de señalización de las semaforinas con dicha enfermedad, confirmando el papel funcional de estas moléculas durante la formación del SNE. La concurrencia de mutaciones en *RET* y en *SEMA3A* en una alta proporción puede indicar que *SEMA3A* está actuando como modificador de la penetrancia de *RET*.

F.11. Hemos diseñado un método basado en MLPA para el análisis de alteraciones en el número de copias de los genes *EDNRB*, *GFRA*, *NRTN* y *PHOX2B*, que junto con el kit comercial para la enfermedad de Hirschsprung, permite el análisis molecular de CNVs de los genes con mayor prevalencia para la enfermedad.

F.12. Hemos confirmado y refinado la presencia de una delección grande en el gen *GFRA1* que ha permitido validar la fiabilidad del método diseñado. Además hemos detectado la presencia de esta misma delección en otro paciente totalmente independiente, lo que podría sugerir la importancia de analizar la implicación de CNVs en la patogénesis de la enfermedad de Hirschsprung.

G. BIBLIOGRAFIA

- Abe Y, Sakurai T, Yamada T, Nakamura T, Yanagisawa M, Goto K. Functional analysis of five endothelin-B receptor mutations found in human Hirschsprung disease patients. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 524-531, 2000.
- Airaksinen MS, Titievsky A, Saarma M. GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant?. *Mol Cell Neurosci* 13: 313-325, 1999.
- Alberti L, Borrello MG, Ghizzoni S, Torriti F, Rizzetti MG, Pierotti MA. Grb2 binding to the different isoforms of Ret tyrosine kinase. *Oncogene* 17: 1079-1087, 1998.
- Almond S, Lindley RM, Kenny SE, Connell MG, Edgar DH. Characterisation and transplantation of enteric nervous system progenitor cells. *Gut* 56: 489-496, 2007.
- Amiel J, Attie T, Jan D, Pelet A, Edery P, Bidaud C, et al. Heterozygous endothelin receptor B (EDNRB) mutations in isolated Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 5: 355-357, 1996.
- Amiel J, Lyonnet S. Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review. *J Med Genet* 38: 729-739, 2001.
- Amiel J, Espinosa-Parrilla Y, Steffann J, Gosset P, Pelet A, Prieur M, et al. Large-scale deletions and SMADIP1 truncating mutations in syndromic Hirschsprung disease with involvement of midline structures. *Am J Hum Genet* 69: 1370-1377, 2001.
- Amiel J, Laudier B, Attie-Bitach T, Trang H, de Pontual L, Gener B, et al. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet* 33: 459-461, 2003.
- Amiel J, Rio M, de Pontual L, Redon R, Malan V, Boddaert N, et al. Mutations in TCF4, encoding a class I basic helix-loop-helix transcription factor, are responsible for Pitt-Hopkins syndrome, a severe epileptic encephalopathy associated with autonomic dysfunction. *Am J Hum Genet* 80: 988-993, 2007.
- Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S, et al. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet* 45: 1-14, 2008.

Bibliografía

- Anderson RB, Bergner AJ, Taniguchi M, Fujisawa H, Forrai A, Robb L, et al Effects of different regions of the developing gut on the migration of enteric neural crest-derived cells: A role for *Sema3A*, but not *Sema3F*. *Developmental Biology* 305: 287-299, 2007.
- Angrist M, Kauffman E, Slaugenhaupt SA, Matisse TC, Puffenberger EG, Washington SS, et al. A gene for Hirschsprung disease (megacolon) in the pericentromeric region of human chromosome 10. *Nat Genet* 4: 351-356, 1993.
- Angrist M, Bolk S, Thiel B, Puffenberger EG, Hofstra RM, Buys CH, et al. Mutation analysis of the RET receptor tyrosine kinase in Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 4: 821-830, 1995.
- Angrist M, Bolk S, Halushka M, Lapchak PA, Chakravarti A. Germline mutations in glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and RET in a Hirschsprung disease patient. *Nat Genet* 14: 341-344, 1996.
- Angrist M, Jing S, Bolk S, Bentley K, Nallasamy S, Halushka M, et al. Human *GFRA1*: cloning, mapping, genomic structure, and evaluation as a candidate gene for Hirschsprung disease susceptibility. *Genomics* 48: 354-362, 1998.
- Aoki Y, Saint-Germain N, Gyda M, Magner-Fink E, Lee YH, Credidio C, et al. *Sox10* regulates the development of neural crest-derived melanocytes in *Xenopus*. *Dev Biol* 259: 19-33, 2003.
- Arai H, Nakao K, Takaya K, Hosoda K, Ogawa Y, Nakanishi S, et al. The human endothelin-B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment. *J Biol Chem* 268, 3873-3879, 1993.
- Arighi E, Alberti L, Torriti F, Ghizzoni S, Rizzetti MG, Pelicci G, et al. Identification of Shc docking site on Ret tyrosine kinase. *Oncogene* 14: 773-782, 1997.
- Arnold S, Pelet A, Amiel J, Borrego S, Hofstra R, Tam P, et al. Interaction Between a Chromosome 10 RET Enhancer and Chromosome 21 in the Down Syndrome–Hirschsprung Disease Association. *Hum Mutat* 30: 771-775, 2009a.
- Arnold S, Guy M, Kashuk K, Li Y, Abecasis G, Chakravarti A, International HSCR Consortium. Semaphorin Family 3 Members Are Associated With Hirschsprung Disease. Second International Symposium on Development of

- the Enteric Nervous System: Cells, Signals and Genes. UCL Institute of Child Health, London, UK. 2009b.
- Asai N, Murakami H, Iwashita T, Takahashi M. A mutation at tyrosine 1062 in MEN2A-Ret and MEN2B-Ret impairs their transforming activity and association with shc adaptor proteins. *J Biol Chem* 271: 17644-17649, 1996.
- Attie T, Pelet A, Edery P, Eng C, Mulligan LM, Amiel J, et al. Diversity of RET proto-oncogene mutations in familial and sporadic Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 4: 1381-1386, 1995a.
- Attie T, Till M, Pelet A, Amiel J, Edery P, Boutrand L, et al. Mutation of the endothelin-receptor B gene in Waardenburg-Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 4: 2407-2409, 1995b.
- Attie-Bitach T, Abitbol M, Gerard M, Delezoide AL, Augé J, Pelet A, et al. Expression of the RET proto-oncogene in human embryos. *Am J Med Genet* 80: 481-486, 1998.
- Auricchio A, Casari G, Staiano A, Ballabio A. Endothelin-B receptor mutations in patients with isolated Hirschsprung disease from a non-inbred population. *Hum Mol Genet* 5: 351-354, 1996.
- Auricchio A, Griseri P, Carpentieri ML, Betsos N, Staiano A, Tozzi A, et al. Double heterozygosity for a RET substitution interfering with splicing and an EDNRB missense mutation in Hirschsprung disease. *Am J Hum Genet* 64: 1216-1221, 1999.
- Avantaggiato V, Dathan NA, Grieco M, Fabien N, Lazzaro D, Fusco A, et al. Developmental expression of the RET protooncogene. *Cell Growth Differ* 5: 305-311, 1994.
- Badner JA, Sieber WK, Garver KL, Chakravarti A. A genetic study of Hirschsprung disease. *Am J Hum Genet* 46: 568-580, 1990.
- Bagnard D, Vaillant C, Khuth ST, Dufay N, Lohrum M, Puschel AW, et al. Semaphorin 3A-vascular endothelial growth factor-165 balance mediates migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor. *J Neurosci* 21: 3332-3341, 2001a.
- Bagnard D, Chounlamountri N, Puschel AW, Bolz J. Axonal surface molecules act in combination with semaphorin 3a during the establishment of corticothalamic projections. *Cereb Cortex* 11: 278-285, 2001b.

Bibliografía

- Baloh RH, Tansey MG, Lampe PA, Fahrner TJ, Enomoto H, Simburger KS, et al. Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. *Neuron* 21: 1291-1302, 1998.
- Baloh RH, Enomoto H, Johnson EM Jr, Milbrandt J. The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol* 10: 103-110, 2000.
- Bamji SX, Majdan M, Pozniak CD, Belliveau DJ, Aloyz R, Kohn J, et al. The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J Cell Biol* 140: 911-923, 1998.
- Barbacid M, Lamballe F, Pulido D, Klein R. The trk family of tyrosine protein kinase receptors. *Biochim Biophys Acta* 1072: 115-127, 1991.
- Barbacid M. Nerve growth factor: a tale of two receptors. *Oncogene* 8: 2033-2042, 1993.
- Barbacid M. The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 25: 1386-1403, 1994.
- Barde YA. The nerve growth factor family. *Prog Growth Factor Res* 2: 237-248, 1991.
- Barlow A, de Graaff E, Pachnis V. Enteric nervous system progenitors are coordinately controlled by the G protein-coupled receptor EDNRB and the receptor tyrosine kinase RET. *Neuron* 40: 905-916, 2003.
- Barnes G, Puranam RS, Luo Y, McNamara JO. Temporal specific patterns of semaphorin gene expression in rat brain after kainic acid-induced status epilepticus. *Hippocampus* 13: 1-20, 2003.
- Bates MD. Development of the enteric nervous system. *Clin Perinatol* 29: 97-114, 2002.
- Bateman A, Birney E, Cerruti L, Durbin R, Ewlinger L, Eddy SR, et al. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 30: 276-280, 2002.
- Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE, et al. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for

- development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 79: 1277-1285, 1994.
- Behar O, Golden JA, Mashimo H, Schoen FJ, Fishman MC. Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart. *Nature* 383, 525–528, 1996.
- Berger S, Ziebell P, Offsler M, Hoffmann-von Kap-herr S. Congenital malformations and perinatal morbidity associated with intestinal neuronal dysplasia. *Pediatr Sur Int* 13: 474-479, 1998.
- Berndt JD, Halloran MC. Semaphorin 3d promotes cell proliferation and neural crest cell development downstream of TCF in the zebrafish hindbrain. *Development* 133: 3983-3992, 2006.
- Betancur P, Bronner-Fraser M, Sauka-Spengler T. Genomic code for Sox10 activation reveals a key regulatory enhancer for cranial neural crest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, In Press.
- Bibel M, Barde YA. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 14: 2919-2937, 2000.
- Bidaud C, Salomon R, Van Camp G, Pelet A, Attie T, Eng C, et al. Endothelin-3 gene mutations in isolated and syndromic Hirschsprung disease. *Eur J Hum Genet* 5: 247-251, 1997.
- Bilozur ME, Hay ED. Neural crest migration in 3D extracellular matrix utilizes laminin, fibronectin, or collagen. *Dev Biol* 125: 19-33, 1988.
- Binder BJ, Landman KA, Simpson MJ, Mariani M, Newgreen DF. Modeling proliferative tissue growth: a general approach and an avian case study. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 78: 031912, 2008.
- Blaugrund E, Pham TD, Tennyson VM, Lo L, Sommer L, Anderson DJ, Gershon MD. Distinct subpopulations of enteric neuronal progenitors defined by time of development, sympathoadrenal lineage markers, and Mash-I-dependence. *Development* 122: 309-320, 1996.
- Bodian M, Carter C. A family study of Hirschsprung disease. *Ann Hum Genet* 26: 261, 1963.
- Boger HA, Middaugh LD, Huang P, Zaman V, Smith AC, Hoffer BJ, et al. A partial GDNF depletion leads to earlier age-related deterioration of motor function

- and tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra. *Exp Neurol* 202: 336–347, 2006.
- Boger HA, Middaugh LD, Patrick KS, Ramamoorthy S, Denehy ED, Zhu H, et al. Long-term consequences of methamphetamine exposure in young adults are exacerbated in glial cell line-derived neurotrophic factor heterozygous mice. *J Neurosci* 27: 8816–8825, 2007.
- Bolk S, Angrist M, Xie J, Yanagisawa M, Silvestri JM, Weese-Mayer DE, et al. Endothelin-3 frameshift mutation in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet* 13: 395–396, 1996.
- Bolk S, Pelet A, Hofstra RM, Angrist M, Salomon R, Croaker D, et al. A human model for multigenic inheritance: phenotypic expression in Hirschsprung disease requires both the *RET* gene and a new 9q31 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 268–273, 2000.
- Bondurand N, Kobetz A, Pingault V, Lemort N, Encha-Razavi F, Couly G, et al. Expression of the SOX10 gene during human development. *FEBS Lett* 432: 168–172, 1998.
- Bondurand N, Pingault V, Goerich DE, Lemort N, Sock E, Le Caignec C, et al. Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Hum Mol Genet* 9: 1907–1917, 2000.
- Bondurand N, Girard M, Pingault V, Lemort N, Dubourg O, Goossens M. Human Connexin 32, a gap junction protein altered in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease, is directly regulated by the transcription factor SOX10. *Hum Mol Genet* 10: 2783–2795, 2001.
- Bondurand N, Natarajan D, Thapar N, Atkins C, Pachnis V. Neuron and glia generating progenitors of the mammalian enteric nervous system isolated from foetal and postnatal gut cultures. *Development* 130: 6387–6400, 2003.
- Bondurand N, Natarajan D, Barlow A, Thapar N, Pachnis V. Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. *Development* 133: 2075–2086, 2006.
- Bondurand N, Dastot-Le Moal F, Stanchina L, Collot N, Baral V, Marlin S, et al. Deletions at the SOX10 gene locus cause Waardenburg syndrome types 2 and 4. *Am J Hum Genet* 81: 1169–1185, 2007.

- Borghini S, Bocciardi R, Bonardi G, Matera I, Santamaria G, Ravazzolo R, et al. Hirschsprung associated GDNF mutations do not prevent RET activation. *Eur J Hum Genet* 10: 183-187, 2002.
- Borghini S, Duca MD, Pini Prato A, Lerone M, Martucciello G, Jasonni V, Ravazzolo R, Ceccherini I. Search for pathogenetic variants of the SPRY2 gene in intestinal innervation defects. *Intern Med J* 39: 335-337, 2009.
- Borrego S, Eng C, Sánchez B, Sáez ME, Navarro E, Antiñolo G. Molecular analysis of the RET and GDNF genes in a family with multiple endocrine neoplasia type 2A and Hirschsprung disease. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 3361-3364, 1998.
- Borrego S, Saez ME, Ruiz A, Gimm O, Lopez-Alonso M, Antinolo G, et al. Specific polymorphisms in the RET proto-oncogene are over-represented in patients with Hirschsprung disease and may represent loci modifying phenotypic expression. *J Med Genet* 36: 771-774, 1999.
- Borrego S, Ruiz A, Saez ME, Gimm O, Gao X, Lopez-Alonso M, et al. RET genotypes comprising specific haplotypes of polymorphic variants predispose to isolated Hirschsprung disease. *J Med Genet* 37: 572-578, 2000.
- Borrego S, Wright FA, Fernández RM, Williams N, López-Alonso M, Davuluri R, et al. A founding locus within the RET proto-oncogene may account for a large proportion of apparently sporadic Hirschsprung disease and a subset of cases of sporadic medullary thyroid carcinoma. *Am J Hum Genet* 72: 88-100, 2003a.
- Borrego S, Fernández RM, Dziema H, Niess A, López-Alonso M, Antiñolo G, et al. Investigation of germline GFRA4 mutations and evaluation of the involvement of GFRA1, GFRA2, GFRA3, and GFRA4 sequence variants in Hirschsprung disease. *J Med Genet* 40: e18, 2003b.
- Borrello MG, Pelicci G, Arighi E, De Filippis L, Greco A, Bongarzone I, et al. The oncogenic versions of the Ret and Trk tyrosine kinases bind Shc and Grb2 adaptor proteins. *Oncogene* 9: 1661-1668, 1994.
- Borrello MG, Smith DP, Pasini B, Bongarzone I, Greco A, Lorenzo MJ, et al. RET activation by germline MEN2A and MEN2B mutations. *Oncogene* 11: 2419-2427, 1995.
- Bothwell M. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci* 18: 223-253, 1995.

- Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol* 227: 239–255, 2000.
- Boyen G, Krammer HJ, Süß A, Dembowski C, Ehrenreich H, Wedel T. Abnormalities of the enteric nervous system in heterozygous endothelin B receptor deficient (spotting lethel) rats resembling intestinal neuronal dysplasia. *Gut* 51: 414–419, 2002.
- Brand M, Le Moullec JM, Corvol P, Gasc JM. Ontogeny of endothelins-1 and -3, their receptors, and endothelin converting enzyme-1 in the early human embryo. *J Clin Invest* 101: 549–559, 1998.
- Brennan A, Dean CH, Zhang AL, Cass DT, Mirsky R, Jessen KR. Endothelins control the timing of Schwann cell generation in vitro and in vivo. *Dev Biol* 227: 545–557, 2000.
- Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, Pairano RI, Rossner M, Nave KA, et al. The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glia development. *Genes Dev* 15: 66–78, 2001.
- Brooks AS, Breuning MH, Meijers C. Spectrum of phenotypes associated with Hirschsprung disease: an evaluation of 239 patients from a single institution. The Third International Meeting: Hirschsprung disease and related neurocristopathies, Evian, France, 1998.
- Brooks AS, Oostra BA, Hofstra RM. Studying the genetics of Hirschsprung's disease: unraveling an oligogenic disorder. *Clin. Genet* 67: 6–14, 2005.
- Brooks AS, Leegwater PA, Burzynski GM, Willems PJ, de Graaf B, van Langen I, et al. A novel susceptibility locus for Hirschsprung's disease maps to 4q31.3–q32.3. *J Med Genet* 43:e35, 2006.
- Bronner-Fraser M. An antibody to a receptor for fibronectin and laminin perturbs cranial neural crest development in vivo. *Dev Biol* 117: 528–536, 1986.
- Burzynski GM, Nolte IM, Bronda A, Bos KK, Osinga J, Plaza Menacho I, et al. Identifying Candidate Hirschsprung Disease-Associated RET Variants. *Am J Hum Genet* 76: 850–858, 2005.
- Burzynski G, Shepherd IT, Enomoto H. Genetic model system studies of the development of the enteric nervous system, gut motility and Hirschsprung's disease. *Neurogastroenterol Motil* 21: 113–127, 2009.

- Cacheux V, Dastot-Le Moal F, Kaariainen H, Bondurand N, Rintala R, Boissier B, et al. Loss-of-function mutations in SIP1 Smad interacting protein 1 result in a syndromic Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 10: 1503-1510, 2001.
- Cantrell VA, Owens SE, Chandler SR, Airey DC, Bradley KM, Smith JR, et al. Interactions between Sox10 and EdnrB modulate penetrance and severity of aganglionosis in the Sox10Dom mouse model of Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 13: 2289–2301, 2004.
- Carlomagno F, De Vita G, Berlingieri MT, de Franciscis V, Melillo RM, Colantuoni V, et al. Molecular heterogeneity of RET loss of function in Hirschsprung's disease. *EMBO J* 15: 2717-2725, 1996.
- Carter CO. Genetics of common disorders. *Br. Med. Bull* 25; 52-57, 1969.
- Casademunt E, Carter BD, Benzel I, Frade JM, Dechant G, Barde YA. The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death. *EMBO J* 18: 6050-6061, 1999.
- Castellani V, Chedotal A, Schachner M, Faivre-Sarrailh C, Rougon G. Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* 27: 237–249, 2000.
- Castro F, Hu L, Drabkin H, Sotelo C, Chedotal A. Chemoattraction and chemorepulsion of olfactory bulb axons by different secreted semaphorins. *J. Neurosci* 19: 4428–4436, 1999.
- Castro E, Sigrist CJ, Gattiker A, Bulliard V, Langendijk-Genevaux PS, Gasteiger E, et al. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res* 34: W362-W365, 2006.
- Carrasquillo MM, McCallion AS, Puffenberger EG, Kashuk CS, Nouri N, Chakravarti A. Genome-wide association study and mouse model identify interaction between RET and EDNRB pathways in Hirschsprung disease. *Nat Genet* 32: 237-244, 2002.
- Ceccherini I, Bocciardi R, Luo Y, Pasini B, Hofstra R, Takahashi M, et al. Exon structure and flanking intronic sequences of the human RET proto-oncogene. *Biochem Biophys Res Commun* 196: 1288-1295, 1993.

Bibliografía

- Ceccherini I, Hofstra RM, Luo Y, Stulp RP, Barone V, Stelwagen T, et al. DNA polymorphisms and conditions for SSCP analysis of the 20 exons of the ret proto-oncogene. *Oncogene* 9: 3025-3029, 1994.
- Chakravarti A. Endothelin receptor-mediated signaling in Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 5: 303-307, 1996.
- Chakravarti A, Lyonnet S. Hirschsprung disease. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited disease. Capítulo 251. Eds McGraw-Hill Companies, 2002.
- Chalazonitis A, Rothman TP, Chen J, Lamballe F, Barbacid M, Gershon MD. Neurotrophin-3 induces neural crest-derived cells from fetal rat gut to develop in vitro as neurons or glia. *J Neurosci* 14: 6571-6584, 1994.
- Chalazonitis A, Rothman TP, Chen J, Gershon MD. Age-dependent differences in the effects of GDNF and NT-3 on the development of neurons and glia from neural crest-derived precursors immunoselected from the fetal rat gut: expression of GFR α -1 in vitro and in vivo. *Dev Biol* 204: 385-406, 1998a.
- Chalazonitis A, Rothman TP, Chen L, Vinson EN, MacLennan AJ, Gershon MD. Promotion of the development of enteric neurons and glia by neurotrophic cytokines: interactions with neurotrophin-3. *Dev Biol* 198: 343-365, 1998b.
- Chalazonitis A, Pham TD, Rothman TP, DiStefano PS, Bothwell M, Blair-Flynn J, et al. Neurotrophin-3 is required for the survival-differentiation of subsets of developing enteric neurons. *J Neurosci* 21: 5620-5636, 2001.
- Chalazonitis A, D'Autreaux E, Guha U, Pham TD, Faure C, Chen JJ, et al. Bone morphogenetic protein-2 and -4 limit the number of enteric neurons but promote development of a TrkC-expressing neurotrophin-3-dependent subset. *J Neurosci* 24:4266-4282, 2004.
- Chan KK, Wong CK, Lui VC, Tam PK, Sham MH. Analysis of SOX10 mutations identified in Waardenburg-Hirschsprung patients: differential effects on target gene regulation. *J Cell Biochem* 90: 573-585, 2003.
- Chao MV. Neurotrophin receptors: a window into neuronal differentiation. *Neuron* 9: 583-593, 1992.
- Chao MV. The p75 neurotrophin receptor. *J Neurobiol* 25: 1373-1385, 1994.

- Chatten J, Voorhess ML. Familial neuroblastoma. Report of a kindred with multiple disorders, including neuroblastomas in four siblings. *N Engl J Med* 277: 1230–1236, 1967.
- Chen ZY, He ZY, He C, Lu CL, Wu XF. Human glial cell-line-derived neurotrophic factor: a structure-function analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 268: 692-696, 2000.
- Chen C, Li M, Chai H, Yang H, Fisher WE, Yao Q. Roles of neuropilins in neuronal development, angiogenesis, and cancers. *World J Surg* 29: 271–275, 2005.
- Christensen CR, Klingelhofer J, Tarabykina S, Hulgaard EF, Kramerov D, Lukanidin E. Transcription of a novel mouse semaphorin gene, M-semaH, correlates with the metastatic ability of mouse tumor cell lines. *Cancer Res* 58: 1238–1244, 1999.
- Cosma MP, Cardone M, Carlomagno F, Colantuoni V. Mutations in the Extracellular Domain Cause RET Loss of Function by a Dominant Negative Mechanism. *Mol Cell Biol* 18: 3321-3329, 1998.
- Costa M, Fava M, Seri M, Cusano R, Sancandi M, Forabosco P, et al. Evaluation of the HOX11L1 gene as a candidate for congenital disorders of intestinal innervation. *J Med Genet* 37:E9, 2000.
- Coulpier M, Anders J, Ibanez CF. Coordinated activation of autophosphorylation sites in the RET receptor tyrosine kinase: importance of tyrosine 1062 for GDNF mediated neuronal differentiation and survival. *J Biol Chem* 277: 1991-1999, 2002.
- Czopik AK, Bynoe MS, Palm N, Raine CS, Medzhitov R. Semaphorin 7A is a negative regulator of T cell responses. *Immunity* 24: 591–600, 2006.
- Cramer H, Schmenger K, Heinrich K, Horstmeyer A, Böning H, Breit A, et al. Coupling of endothelin receptors to the ERK/MAP kinase pathway. Roles of palmitoylation and G α q. *Eur J Biochem* 268: 5449-5459, 2001.
- Cunningham ME, Greene LA. A function-structure model for NGF-activated TRK. *EMBO J* 17: 7282-7293, 1998.
- Davenport, AP. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 54: 219-226, 2002.

Bibliografía

- D'Autreaux F, Cserjesi P, Rothman TP, Gershon MD. Expression of the basic helix-loop-helix (b-HLH) transcription factor, Hand2 is essential for enteric neuronal development. *Gastroenterology* 126(suppl 2): 119, 2004.
- De Winter F, Oudega M, Lankhorst AJ, Hamers FP, Blits B, Ruitenberg MJ, et al. Injury-induced class 3 semaphorin expression in the rat spinal cord. *Exp Neurol* 175: 61-75, 2002.
- Decker RA, Peacock ML. Occurrence of MEN 2a in familial Hirschsprung's disease: A new indication for genetic testing of the RET proto-oncogene. *J Pediatr Surg* 33: 207-214, 1998.
- Didenko VV. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques* 31: 1106-1121, 2001.
- Ding S, Luo JH, Yuan XB. Semaphorin-3F attracts the growth cone of cerebellar granule cells through cGMP signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 356: 857-863, 2007.
- Doray B, Salomon R, Amiel J, Pelet A, Touraine R, Billaud M, et al. Mutation of the RET ligand, neurturin, supports multigenic inheritance in Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 7: 1449-1452, 1998.
- Druckenbrod NR, Epstein ML. The pattern of neural crest advance in the cecum and colon. *Dev Biol* 287: 125-133, 2005.
- Druckenbrod NR, Epstein ML. Behavior of enteric neural crest-derived cells varies with respect to the migratory wavefront. *Dev Dyn* 236: 84-92, 2007.
- Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat.* 15: 7-12, 2001.
- Durbec PL, Larsson-Blomberg LB, Schuchardt A, Costantini F, Pachnis V. Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts. *Development* 122: 349-358, 1996.
- Durick K, Gill GN, Taylor SS. Shc and Enigma are both required for mitogenic signaling by Ret/ptc2. *Mol Cell Biol* 18: 2298-2308, 1998.
- Dutton KA, Pauliny A, Lopes SS, Elworthy S, Carney TJ, Rauch J, et al. Zebrafish colourless encodes sox10 and specifies non-ectomesenchymal neural crest fates. *Development* 128: 4113-4125, 2001.

- Edery P, Lyonnet S, Mulligan LM, Pelet A, Dow E, Abel L, et al. Mutations of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 367: 378–380, 1994.
- Edery P, Attie T, Amiel J, Pelet A, Eng C, Hofstra RM, et al. Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg–Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat Genet* 12: 442–444, 1996.
- Eketjall S, Fainzilber M, Murray-Rust J, Ibanez CF. Distinct structural elements in GDNF mediate binding to GFRalpha1 and activation of the GFRalpha1-c-Ret receptor complex. *EMBO J* 18: 5901-5910, 1999.
- Eketjall S, Ibanez CF. Functional characterization of mutations in the GDNF gene of patients with Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 11: 325-329, 2002.
- Emission ES, McCallion AS, Kashuk CS, Bush RT, Grice E, Lin S, et al. A common sex-dependent mutation in a RET enhancer underlies Hirschsprung disease risk. *Nature* 434: 857-863, 2005.
- Encinas M, Crowder RJ, Milbrandt J, Johnson EM Jr. Tyrosine 981, a novel ret autophosphorylation site, binds c-Src to mediate neuronal survival. *J Biol Chem* 279:18262-18269, 2004.
- Eng C, Smith DP, Mulligan LM, Nagai MA, Healey CS, Ponder MA, et al. Point mutation within the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B and related sporadic tumours. *Hum Mol Genet* 3: 237-241, 1994.
- Eng C. RET proto-oncogene in the development of human cancer. *J Clin Oncol* 17: 380–393, 1999.
- Enokido Y, de Sauvage F, Hongo JA, Ninkina N, Rosenthal A, Buchman VL, et al. GFR alpha-4 and the tyrosine kinase Ret form a functional receptor complex for persephin. *Curr Biol* 8:1019-1022, 1998.
- Enomoto H, Araki T, Jackman A, Heuckeroth RO, Snider WD, Johnson EM Jr, et al. GFR alpha1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. *Neuron* 21: 317-324, 1998.
- Facer P, Knowles CH, Thomas PK, Tam PK, Williams NS, Anand P. Decreased tyrosine kinase C expression may reflect development abnormalities in Hirschsprung's disease and idiopathic slow-transit constipation. *Br J Surg* 88: 545-552, 2001.

Bibliografía

- Falk J, Bechara A, Fiore R, Nawabi H, Zhou H, Hoyo-Becerra C, et al. Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron* 48: 63–75, 2005.
- Farndon JR, Leight GS, Dilley WG, Baylin SB, Smallridge RC, Harrison TS, et al. Familial medullary thyroid carcinoma without associated endocrinopathies: a distinct clinical entity. *Br J Surg* 73: 278-281, 1986.
- Fava M, Borghini S, Cinti R, Cusano R, Seri M, Lerone M, et al. HOX11L1: A promoter study to evaluate possible expression defects in intestinal motility disorders. *Int J Mol Med* 10: 101–106, 2002.
- Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, et al. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* 386: 796-804, 1997.
- Fernández RM, Antiñolo G, Eng C, Borrego S. The RET C620S mutation causes multiple endocrine neoplasia type 2A (MEN2A) but not Hirschsprung disease (HSCR) in a family cosegregating both phenotypes. *Hum Mutat* 22: 41241-41245, 2003.
- Fernández RM, Boru G, Peciña A, Jones K, López-Alonso M, Antiñolo G, et al. Ancestral RET haplotype associated with Hirschsprung's disease shows linkage disequilibrium breakpoint at -1249. *J Med Genet* 42: 322-327, 2005.
- Fernandez RM, Navarro E, Antinolo G, Ruiz-Ferrer M, Borrego S. Evaluation of the role of RET polymorphisms/haplotypes as modifier loci for MEN 2, and analysis of the correlation with the type of RET mutation in a series of Spanish patients. *Int J Mol Med* 17: 575-581, 2006.
- Fernandez RM, Sanchez-Mejias A, Ruiz-Ferrer M, Lopez-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. Is the RET proto-oncogene involved in the pathogenesis of intestinal neuronal displasia type B?. *Molecular Medicine Reports* 2: 265-270, 2009a.
- Fernandez RM, Sanchez-Mejias A, Mena MD, Ruiz-Ferrer M, Lopez-Alonso M, Antiñolo G, et al. A novel point variant in NTRK3, R645C, suggests a role of this gene in the pathogenesis of Hirschsprung disease. *Ann Hum Genet* 73: 19-25, 2009b.

- Fernández RM, Sánchez-Mejías A, Navarro E, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. The RET functional variant c 587T>C is not associated with susceptibility to sporadic medullary thyroid cancer. *Thyroid* 19: 1017-1018, 2009c.
- Ferrè F, Clote P. DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic Acids Res* 33: W230-232, 2005.
- Fiorica-Howells E, Maroteaux L, Gershon MD. Serotonin and the 5-HT_{2B} receptor in the development of enteric neurons. *J Neurosci* 20: 294-305, 2000.
- Fitze G, Schreiber M, Kuhlisch E, Schackert HK, Roesner D. Association of RET protooncogene codon 45 polymorphism with Hirschsprung disease. *Am J Hum Genet* 65: 1469-1473, 1999.
- Fitze G, Cramer J, Ziegler A, Schierz M, Schreiber M, Kuhlisch E, et al. Association between c135G/A genotype and RET proto-oncogene germline mutations and phenotype of Hirschsprung's disease. *Lancet* 359: 1200-1205, 2002a.
- Frade JM, Barde YA. Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. *Bioessays* 20: 137-145, 1998.
- Friedman WJ, Greene LA. Neurotrophin signaling via Trks and p75. *Exp Cell Res* 253: 131-142, 1999.
- Friedman WJ. Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J Neurosci* 20: 6340-6346, 2000.
- Fu M, Lui VC, Sham MH, Pachnis V, Tam PK. Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation, and migration of enteric neural crest cells in gut. *J Cell Biol* 166: 673-684, 2004.
- Fuchs S, Amiel J, Claudel S, Lyonnet S, Corvol P, Pinet F. Functional characterization of three mutations of the endothelin B receptor gene in patients with Hirschsprung's disease: evidence for selective loss of Gi coupling. *Mol Med* 7: 115-124, 2001.
- Fugazzola L, Muzza M, Mian C, Cordella D, Barollo S, Alberti L, et al. RET genotypes in sporadic medullary thyroid cancer: studies in a large Italian series. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008.
- Fujisawa H. Discovery of semaphorin receptors, neuropilin and plexin, and their functions in neural development. *J Neurobiol* 59: 24-33, 2004.

Bibliografía

- Fukumoto T, Kema IP, Levin M. Serotonin signaling is a very early step in patterning of the left-right axis in chick and frog embryos. *Curr Biol* 15: 794-803, 2005.
- Furness JB, Costa M. *The Enteric Nervous System*. Glasgow: Churchill Livingstone, 1987.
- Furness JB, Johnson PJ, Pompolo S, Bornstein JC. Evidence that enteric motility reflexes can be initiated through entirely intrinsic mechanisms in the guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 7: 89-96, 1995.
- Gabella G. Size of neurons and glial cells in the intramural ganglia of the hypertrophic intestine of the guinea-pig. *J Neurocytol* 13: 73-84, 1984.
- Gabriel SB, Salomon R, Pelet A, Angrist M, Amiel J, Fornage M, et al. Segregation at three loci explains familial and population risk in Hirschsprung disease. *Nat Genet* 31: 89-93, 2002.
- Galvez Y, Skaba R, Vajtrova R, Frantlova M, Herget J. Evidences of secondary neuronal intestinal displasia in a rat model of chronic intestinal obstruction. *J Invest Surg* 17: 31-39, 2004.
- García-Barceló M, Sham MH, Lui VC, Chen BL, Ott J, Tam PK. Association study of PHOX2B as a candidate gene for Hirschsprung's disease. *Gut* 52: 563-567, 2003a.
- García-Barceló MM, Sham MH, Lui VC, Chen BL, Song YQ, Lee WS, et al. Chinese patients with sporadic Hirschsprung's disease are predominantly represented by a single RET haplotype. *J Med Genet* 40:e122, 2003b.
- Garcia-Barcelo M, Sham MH, Lee WS, Lui VC, Chen BL, Wong KK, et al. Highly recurrent RET mutations and novel mutations in genes of the receptor tyrosine kinase and endothelin receptor B pathways in Chinese patients with sporadic Hirschsprung disease. *Clin Chem* 50: 93-100, 2004.
- Garcia-Barcelo M, Ganster RW, Lui VC, Leon TY, So MT, Lau AM, et al. TTF-1 and RET promoter SNPs: regulation of RET transcription in Hirschsprung's disease. *Hum Mol Genet* 14: 191-204, 2005.
- Garcia-Barcelo MM, Tang CS, Ngan ES, Lui VC, Chen Y, So MT, et al. Genome-wide association study identifies NRG1 as a susceptibility locus for Hirschsprung's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 2694-2699, 2009.

- Garipey CE, Williams SC, Richardson JA, Hammer RE, Yanagisawa M. Transgenic expression of the endothelin-B receptor prevents congenital intestinal aganglionosis in a rat model of Hirschsprung disease. *J Clin Invest* 102: 1092–1101, 1998.
- Gath R, Goessling A, Keller K-M, Koletzko S, Coerdt W, Müntefering H, et al. Analysis of the RET, GDNF, EDN3 and EDNRB genes in patient with intestinal neuronal dysplasia and Hirschsprung disease. *Gut* 48: 671-675, 2001.
- Gershon MD, Ratcliffe EM. Development of the Enteric Nervous System. *Physiology of the Gastrointestinal Tract, Fourth Edition*. Capítulo 18. Ed. Leonard R. Johnson. Academic Press, Pages 499-521, 2006.
- Gimm O, Neuberg DS, Marsh DJ, Dahia PL, Hoang-Vu C, Raue F, et al. Over-representation of a germline RET sequence variant in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma and somatic RET codon 918 mutation. *Oncogene* 18: 1369-1373, 1999.
- Gimm O, Dziema H, Brown J, de la Puente A, Hoang-Vu C, Dralle H, et al. Mutation analysis of NTRK2 and NTRK3, encoding two tyrosine kinases, in sporadic human medullary thyroid carcinoma reveals novel sequence variants. *Int J Cancer* 92: 70-74, 2001.
- Goldstein AM, Brewer KC, Doyle AM, Nagy Nandor, Roberts DJ. BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system. *Mech Dev* 122: 821-833, 2005.
- Good PF, Alapat D, Hsu A, Chu C, Perl D, Wen X, et al. A role for semaphorin 3A signaling in the degeneration of hippocampal neurons during Alzheimer's disease. *J Neurochem* 91: 716–736, 2004.
- Görlich D, Mattaj JW. Nucleocytoplasmic transport. *Science* 271: 1513-1518, 1996.
- Gorlin RJ, Sedano HO, Vickers RA, Cervenka J. Multiple mucosal neuromas, pheochromocytoma and medullary carcinoma of the thyroid--a syndrome. *Cancer* 22: 293-299, 1968.
- Gozal D. Congenital central hypoventilation syndrome: an update. *Pediatr Pulmonol* 26: 273–282, 1998.
- de Graaff E, Srinivas S, Kilkeny C, D'Agati V, Mankoo BS, Costantini F, et al. Differential activities of the RET tyrosine kinase receptor isoforms during mammalian embryogenesis. *Genes Dev* 15:2433-2444, 2001.

Bibliografía

- Granero Cendón R, Millán López A, Moya Jiménez MJ, López Alonso M, De Agustín Asensio JC. Intestinal neuronal dysplasia: association with digestive malformations. *Cir Pediatr*;20: 166-168, 2007.
- Grice EA, Rochelle ES, Green ED, Chakravarti A, McCallion AS. Evaluation of the RET regulatory landscape reveals the biological relevance of a HSCR-implicated enhancer. *Hum Mol Genet* 14: 3837-3845, 2005.
- Grimm J, Sachs M, Britsch S, Di Cesare S, Schwarz-Romond T, Alitalo K, Birchmeier W. Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation. *J Cell Biol* 154: 345-354, 2001.
- Griseri P, Sancandi M, Patrone G, Bocciardi R, Hofstra R, Ravazzolo R, et al. A single-nucleotide polymorphic variant of the RET proto-oncogene is underrepresented in sporadic Hirschsprung disease. *Eur J Hum Genet* 8: 721-724, 2000.
- Griseri P, Bachetti T, Puppo F, Lantieri F, Ravazzolo R, Devoto M, et al. A common haplotype at the 5' end of the RET proto-oncogene, overrepresented in Hirschsprung patients, is associated with reduced gene expression. *Hum Mutat* 25: 189-195, 2005.
- Griseri P, Lantieri F, Puppo F, Bachetti T, Di Duca M, Ravazzolo R, et al. A common variant located in the 3'UTR of the RET gene is associated with protection from Hirschsprung disease. *Hum Mutat* 28:168-176, 2007.
- Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346: 245-250, 1990.
- Guillemot F, Lo LC, Johnson JE, Auerbach A, Anderson DJ, Joyner AL. Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75: 463-476, 1993.
- Haddad GG, Mazza NM, Defendini R, Blanc WA, Driscoll JM, Epstein MA, et al. Congenital failure of automatic control of ventilation, gastrointestinal motility and heart rate. *Medicine (Baltimore)* 57: 517-526, 1978.
- Haga H, Yamada R, Ohnishi Y, Nakamura Y, Tanaka T. Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium Genome Project: identification of 190

- 562 genetic variations in the human genome. *J Hum Genet* 47: 605-610, 2002.
- Hamanoué M, Middleton G, Wyatt S, Jaffray E, Hay RT, Davies AM. p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol Cell Neurosci* 14:28-40, 1999.
- Hansford JR, Mulligan LM. Multiple endocrine neoplasia type 2 and RET: from neoplasia to neurogenesis. *J Med Genet* 37: 87-827, 2000.
- Hao MM, Young HM. Development of enteric neuron diversity. *J Cell Mol Med*, 2009
- Hao MM, Anderson RB, Kobayashi K, Whittington PM, Young HM. The migratory behavior of immature enteric neurons. *Dev Neurobiol* 69: 22–35, 2009.
- Haramis AR, Begthel H, van den Born M, van Es J, Jonkheer S, Offerhaus GJ, Clevers H. De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* 303: 1684-1686, 2004.
- Hardwick JC, van Den Brink GR, Bleuming SA, Ballester I, van Den Brande JM, Keller J, et al. Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. *Gastroenterology* 126: 111-121, 2004.
- Harley VE, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acid Res* 22: 1500-1501, 1994.
- Hatano M, Aoki T, Dezawa M, Yusa S, Iitsuka Y, Koseki H, et al. A novel pathogenesis of megacolon in *Ncx/Hox11L.1* deficient mice. *J Clin Invest* 100: 795–801, 1997.
- Hearn CJ, Murphy M, Newgreen D. GDNF and ET-3 differentially modulate the numbers of avian enteric neural crest cells and enteric neurons in vitro. *Dev Biol* 197: 93–105, 1998.
- Heanue T, Pachnis V. Expression profiling the developing mammalian enteric nervous system identifies marker and candidate Hirschsprung disease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 18: 6919-6924, 2006.
- Heanue TA, Pachnis V. Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat Rev Neurosci* 8: 466–479, 2007.

Bibliografía

- Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM, Lemeulle C, Armanini M, et al. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 266: 1062–1064, 1994.
- Henion PD, Weston JA. Timing and pattern of cell fate restrictions in the neural crest lineage. *Development* 124: 4351-4359, 1997.
- Henrichsen CN, Chaignat E, Reymond A. Copy number variants, diseases and gene expression. *Hum Mol Genet*; 5:R1-8, 2009.
- Herbarth B, Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, Hermans-Borgmeyer I, Puliti A, et al. Mutation of the Sry-related Sox10 gene in Dominant megacolon, a mouse model for human Hirschsprung disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5161-5165, 1998.
- Heuckeroth RO, Lampe PA, Johnson EM, Milbrandt J. Neurturin and GDNF promote proliferation and survival of enteric neuron and glial progenitors in vitro. *Dev Biol* 200: 116–129, 1998.
- Heuckeroth RO, Enomoto H, Grider JR, Golden JP, Hanke JA, Jackman A, et al. Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons. *Neuron* 22: 253-263, 1999.
- Heuckeroth RO. Finding your way to the end. A tale of GDNF and endothelin-3. *Neuron* 40: 871-873, 2003.
- Hilleren P, Parker R. Mechanisms of mRNA surveillance in eukaryotes. *Annu Rev Genet* 33: 229-260, 1999.
- Hirsch E, Hu LJ, Prigent A, Constantin B, Agid Y, Drabkin H, et al. Distribution of semaphorin IV in adult human brain. *Brain Res* 823: 67 –79, 1999.
- Hirschsprung H. Stuhlträgheit neugeborener infolge von dilatation und hypertrophic des colons. *Jb inderheilk* 27: 1-2, 1888.
- Hoehner JC, Wester T, Pahlman S, Olsen L. Alterations in neurotrophin and neurotrophin-receptor localization in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 31: 1524-1529, 1996.
- Hofstra RM, Landsvater RM, Ceccherini I, Stulp RP, Stelwagen T, Luo Y, et al. A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine

- neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature* 367: 375-376, 1994.
- Hofstra RM, Osinga J, Tan-Sindhunata G, Wu Y, Kamsteeg EJ, Stulp RP, et al. A homozygous mutation in the endothelin-3 gene associated with a combined Waardenburg type 2 and Hirschsprung phenotype (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat Genet* 12: 445-447, 1996.
- Hofstra R, Osinga J, Buys CH.. Mutations in Hirschsprung disease: When does a mutation contribute to phenotype. *Eur J Hum Genet* 5: 180-185, 1997.
- Hofstra RM, Valdenaire O, Arch E, Osinga J, Kroes H, Loffler BM, et al. A loss-of-function mutation in the endothelin-converting enzyme 1 (ECE-1) associated with Hirschsprung disease, cardiac defects, and autonomic dysfunction. *Am J Hum Genet* 64: 304-308, 1999.
- Hofstra R, Wu Y, Stulp RP, Elfferich P, Osinga J, Maas SM, et al. RET and GDNF gene scanning in Hirschsprung patients using two dual denaturing gel systems. *Hum Mutat* 15: 418-429, 2000.
- Hofstra RM, Elfferich P, Osinga J, Verlind E, Fransen E, Lopez Pison J, et al. Hirschsprung disease and L1CAM: is the disturbed sex ratio caused by L1CAM mutations? *J Med Genet* 39:E11, 2002.
- Holmes S, Downs AM, Fosberry A, Hayes PD, Michalovich D, Murdoch P, et al. Sema7A is a potent monocyte stimulator. *Scand J Immunol* 56: 270-275, 2002.
- Holschneider AM, Puri P. Intestinal neuronal dysplasia. In: Holschneider AM, Puri P, eds. *Hirschsprung Disease and Allied Disorder*. Amsterdam: Harwood Academic Publ 147-154, 2002.
- Holtmaat AJ, Gorter JA, De Wit J, Tolner EA, Spijker S, Giger RJ, et al. Transient downregulation of Sema3A mRNA in a rat model for temporal lobe epilepsy. A novel molecular event potentially contributing to mossy fiber sprouting. *Exp Neurol* 182: 142-150, 2003.
- Hong CS, Saint-Jeannet JP. Sox proteins and neural crest development. *Semin Cell Dev Biol* 16: 694-703, 2005.
- Höpker V, Shewan D, Tessier-Lavigne M, Poo M, Holt C. Growthcone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* 401: 69-73, 1999.

Bibliografía

- Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A, et al. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 79: 1267-1276, 1994.
- Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24: 677-736, 2001.
- Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609-642, 2003.
- Ikeda I, Ishizaka Y, Tahira T, Suzuki T, Onda M, Sugimura T, Nagao M. Specific expression of the ret proto-oncogene in human neuroblastoma cell lines. *Oncogene* 5: 1291-1296, 1990.
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, 1990.
- Inoue K, Tanabe Y, Lupski JR. Myelin deficiencies in both the central and the peripheral nervous systems associated with a SOX10 mutation. *Ann Neurol* 46: 313-318, 1999.
- Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2863-2867, 1989.
- Inoue K, Khajavi M, Ohyama T, Hirabayashi S, Wilson J, Reggin JD, et al. Molecular mechanism for distinct neurological phenotypes conveyed by allelic truncating mutations. *Nat Genet* 36: 361-369, 2004.
- Ip NY, Ibanez CF, Nye SH, McClain J, Jones PF, Gies DR, et al. Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3060-3064, 1992.
- Ip NY, McClain J, Barrezueta NX, Aldrich TH, Pan L, Li Y, et al. The ct component of the CNTF receptor is required for signalling and defines potential CNTF targets in the adult and during development. *Neuron* 10: 89-102, 1993.
- Iso M, Fukami M, Horikawa R, Azuma N, Kawashiro N, Ogata T. SOX10 mutation in Waardenburg syndrome type II. *Am J Med Genet A* 146A: 2162-2163, 2009.

- Ivanchuk SM, Myers SM, Eng C, Mulligan LM. De novo mutation of GDNF, ligand for the RET/GDNFR-alpha receptor complex, in Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 5: 2023-2026, 1996.
- Ivanchuk SM, Eng C, Cavenee WK, Mulligan LM. The expression of RET and its multiple splice forms in developing human kidney. *Oncogene* 14: 1811-1818, 1997.
- Ivanchuk SM, Myers SM, Mulligan LM. Expression of RET 3' splicing variants during human kidney development. *Oncogene* 16: 991-996, 1998.
- Iwamoto T, Taniguchi M, Asai N, Ohkusu K, Nakashima I, Takahashi M. cDNA cloning of mouse ret proto-oncogene and its sequence similarity to the cadherin superfamily. *Oncogene* 8: 1087-1091, 1993.
- Iwashita T, Murakami H, Asai N, Takahashi M. Mechanism of ret dysfunction by Hirschsprung mutations affecting its extracellular domain. *Hum Mol Genet* 5: 1577-1580, 1996.
- Iwashita T, Kurokawa K, Qiao S, Murakami H, Asai N, Kawai K, et al. Functional analysis of RET with Hirschsprung mutations affecting its kinase domain. *Gastroenterology* 121: 24-33, 2001.
- Jiang Y, Liu M, Gershon MD. Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. *Dev Biol* 258:364-384, 2003.
- Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, et al. GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* 85: 1113-1124, 1996.
- Kagoshima M, Ito T. Diverse gene expression and function of semaphorins in developing lung: positive and negative regulatory roles of semaphorins in lung branching morphogenesis. *Genes Cells* 6: 559-571, 2001.
- Kamachi Y, Cheah KS, Kondoh H. Mechanism of regulatory target selection by the SOX high-mobility-group domain proteins as revealed by comparison of SOX1/2/3 and SOX9. *Mol Cell Biol* 19: 107-120, 1999.
- Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV, Parada LF. The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 252: 554-558, 1991.

Bibliografía

- Kaplan DR, Stephens RM. Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. *J Neurobiol* 25: 1404-1417, 1994.
- Kapur RE, Yost C, Palmiter RD. A transgenic model for studying development of the enteric nervous system in normal and aganglionic mice. *Development* 116:167-175, 1992.
- Kapur RP. Early death of neural crest cells is responsible for total enteric aganglionosis in Sox10(Dom)/Sox10(Dom) mouse embryos. *Pediatr Dev Pathol* 2: 559-569, 1999.
- Kapur RP. Colonization of the murine hindgut by sacral crest-derived neural precursors: experimental support for an evolutionarily conserved model. *Dev Biol* 227: 146-155, 2000a.
- Kapur RP. Developmental disorders of the enteric nervous system. *Gut* 47: iv81-83, 2000b.
- Kapur RP. Neuronal dysplasia: a controversial pathological correlate of intestinal pseudo-obstruction. *Am J Med Genet A* 122A: 287-293, 2003.
- Kapur RP, Gershon MD, Milla PJ, Pachnis V. The influence of Hox genes and three intercellular signalling pathways on enteric neuromuscular development. *Neurogastroenterol Motil* 16: 8-13, 2004.
- Kapur RP. Practical pathology and genetics of Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg* 18: 212-223, 2009.
- Kashuk CS, Stone EA, Grice EA, Portnoy ME, Green ED, Sidow A, et al. Phenotype-genotype correlation in Hirschsprung disease is illuminated by comparative analysis of the RET protein sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8949-8954, 2005.
- Kato Y, Miyahara K, Hatano M, Hasegawa Y, Seki T, Frykman PK, et al. Immature enteric neurons in Ncx/Hox11L.1 deficient intestinal neuronal dysplasia model mice. *Pediatr Surg Int* 25: 961-965, 2009.
- Kawamoto Y, Takeda K, Okuno Y, Yamakawa Y, Ito Y, Taguchi R, et al. Identification of RET autophosphorylation sites by mass spectrometry. *J Biol Chem* 279: 14213-14224, 2004.

- Kawasaki T, Bekku Y, Suto F, Kitsukawa T, Taniguchi M, Nagatsu I, et al. Requirement of neuropilin 1-mediated Sema3A signals in patterning of the sympathetic nervous system. *Development* 129: 671-680, 2002.
- Kenny SE, Hofstra RMW, Buys CHCM, Vaillant CR, Lloyd DA, Edgar DH. Reduced endothelin-3 expression in sporadic Hirschsprung disease. *B J Surg* 87: 580-585, 2000.
- Kim J, Lo L, Dormand E, Anderson DJ. SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron* 38: 17-31, 2003.
- Kjær S, Ibanez CF. Intrinsic susceptibility to misfolding of a hot-spot for Hirschsprung disease mutations in the ectodomain of RET. *Hum Mol Genet* 12: 2133-2144, 2003.
- Kloog Y, Sokolovsky M. Similarities in mode and sites of action of sarafotoxins and endothelins. *Trends Pharmacol Sci* 10: 212-214, 1989.
- Kobayashi H, Hirakawa H, Surana R, O'Brian SD, Puri P. Intestinal neuronal dysplasia is a possible cause of persistent bowel symptoms after pull-through operation for Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 30: 253-259, 1995.
- Kobayashi H, Mahomed A, Ouri P. Intestinal Neuronal Dysplasia in Twins. *JPGN* 22: 398-401, 1996a.
- Kobayashi H, Hirakawa H, Puri P. Abnormal internal anal sphincter innervations in patients with Hirschsprung's disease and allied disorders. *J Pediatr Surg* 31: 794-799, 1996b.
- Kobayashi A, Yukota H, Kobayashi H, Yamakata A, Miyano T, Hayashida Y. Mucosal endocrine cell abnormalities in patients with chronic constipation. *Asian J Surg* 27: 197-201, 2004.
- Kotzbauer PT, Lampe PA, Heuckeroth RO, Golden JP, Creedon DJ, Johnson EM Jr, et al. Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature* 384: 467-470, 1996.
- Kruger GM, Mosher JT, Tsai YH, Yeager KJ, Iwashita T, Garipey CE, Morrison SJ. Temporally distinct requirements for endothelin receptor B in the generation and migration of gut neural crest stem cells. *Neuron* 40: 917-929, 2003.

Bibliografía

- Kuhlbrodt K, Schmidt C, Sock E, Pingault V, Bondurand N, Goossens M, Wegner M. Functional analysis of Sox10 mutations found in human Waardenburg-Hirschsprung patients. *J Biol Chem* 273: 23033-23038, 1998a.
- Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M. Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci* 18: 237-250, 1998b.
- Kurihara Y, Kurihara H, Oda H, et al. Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1. *J Clin Invest* 96: 293-300, 1995.
- Kurokawa K, Iwashita T, Murakami H, Hayashi H, Kawai K, Takahashi M. Identification of SNT/FRS2 docking site on RET receptor tyrosine kinase and its role for signal transduction. *Oncogene* 20: 1929-1938, 2001.
- Kurokawa K, Kawai K, Hashimoto M, Ito Y, Takahashi M. Cell signalling and gene expression mediated by RET tyrosine kinase. *J Intern Med* 253: 627-633, 2003.
- Kusafuka T, Wang Y, Puri P. Novel mutations of the endothelin-B receptor gene in isolated patients with Hirschsprung's disease. *Hum Mol Genet* 5: 347-349, 1996.
- Kwok JB, Gardner E, Warner JP, Ponder BA, Mulligan LM. Structural analysis of the human *ret* proto-oncogene using exon trapping. *Oncogene* 8: 2575-2582, 1993.
- Lahav R, Ziller C, Dupin E, Le Douarin NM. Endothelin 3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3892-3897, 1996.
- Lallier T, Deutzmann R, Perris R, Bronner-Fraser M. Neural crest cell interactions with laminin: structural requirements and localization of the binding site for $\alpha 1 \beta 1$ integrin. *Dev Biol* 162: 451-464, 1994.
- Lamballe F, Klein R, Barbacid M. *trkC*, a new member of the *trk* family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66: 967-979, 1991.
- Lang D, Chen F, Milewski R, Li J, Lu MM, Epstein JA. Pax3 is required for enteric ganglia formation and functions with Sox10 to modulate expression of c-ret. *J Clin Invest* 106: 963-971, 2000.

- Lang D, Epstein JA. Sox10 and Pax3 physically interact to mediate activation of a conserved c-RET enhancer. *Hum Mol Genet* 12: 937-945, 2003.
- Langer JC. Persistent obstructive symptoms after surgery for Hirschsprung's disease: Development of a diagnostic and therapeutic algorithm. *J Pediatr Surg* 39: 1458-1462, 2004.
- Lantieri F, Griseri P, Puppo F, Campus R, Martucciello G, Ravazzolo R, et al. Haplotypes of the human RET proto-oncogene associated with Hirschsprung disease in the Italian population derive from a single ancestral combination of alleles. *Ann Hum Genet* 70: 12-26, 2006.
- Le Douarin NM, Cameron-Curry P, Dulac C. Cellular interactions during the ontogeny of neural crest derivatives. *C R Acad Sci III* 314: 55-58, 1992.
- Le Douarin NM, Kalcheim C. *The Neural Crest*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1999.
- Leibl MA, Ota T, Woodward MN, Kenny SE, Lloyd DA, Vaillant CR, et al. Expression of endothelin 3 by mesenchymal cells of embryonic mouse caecum. *Gut* 44: 246-252, 1999.
- Leon TY, Ngan ES, Poon HC, So MT, Lui VC, Tam PK, et al. Transcriptional regulation of RET by Nkx2-1, Phox2b, Sox10, and Pax3. *J Pediatr Surg*. 44: 1904-1912, 2009.
- Lepelletier Y, Moura IC, Hadj-Slimane R, Renand A, Fiorentino S, Baude C, et al. Immunosuppressive role of semaphorin-3A on T cell proliferation is mediated by inhibition of actin cytoskeleton reorganization. *Eur J Immunol* 36: 1782-1793, 2006.
- Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science*. 237: 1154-1162, 1987.
- Li ZS, Pham TD, Tamir H, Chen JJ, Gershon MD. Enteric dopaminergic neurons: definition, developmental lineage, and effects of extrinsic denervation. *J Neurosci* 24: 1330-1339, 2004.
- Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, Ibanez CF. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J* 16: 4999-5005, 1997.

Bibliografía

- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260: 1130-1132, 1993.
- Lin S, Chakravarti A, Cutler DJ. Exhaustive allelic transmission disequilibrium tests as a new approach to genome-wide association studies. *Nat Genet* 36: 1181-1188, 2004.
- Lindahl M, Timmusk T, Rossi J, Saarma M, Airaksinen MS. Expression and alternative splicing of mouse *Gfra4* suggest roles in endocrine cell development. *Mol Cell Neurosci* 15: 522-533, 2000.
- Lindahl M, Poteryaev D, Yu L, Arumae U, Timmusk T, Bongarzone I, et al. Human glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha 4 is the receptor for persephin and is predominantly expressed in normal and malignant thyroid medullary cells. *J Biol Chem* 276: 9344-9351, 2001.
- Liu X, Vega QC, Decker RA, Pandey A, Worby CA, Dixon JE. Oncogenic RET receptors display different autophosphorylation sites and substrate binding specificities. *J Biol Chem* 271: 5309-5312, 1996.
- Liu B, Wu D. The first inner loop of endothelin receptor type B is necessary for specific coupling to Galpha 13. *J Biol Chem* 278: 2384-2387, 2003.
- Liu Y, Stein E, Oliver T, Li Y, Brunken WJ, Koch M, et al. Novel role for Netrins in regulating epithelial behaviour during lung branching morphogenesis. *Curr Bio* 14: 897-905, 2004.
- Lo LC, Johnson JE, Wuenschell CW, Saito T, Anderson DJ. Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells. *Genes Dev* 5:1524-1537, 1991.
- Lo L, Anderson DJ. Postmigratory neural crest cells expressing c-RET display restricted developmental and proliferative capacities. *Neuron* 15: 527-539, 1995.
- Lore F, Di Cairano G, Talidis F. Unilateral renal agenesis in a family with medullary thyroid carcinoma. *N Engl J Med* 342: 1218-1219, 2000.
- Lorenzo MJ, Gish GD, Houghton C, Stonehouse TJ, Pawson T, Ponder BA, et al. RET alternate splicing influences the interaction of activated RET with the SH2 and PTB domains of Shc, and the SH2 domain of Grb2. *Oncogene* 14: 763-771, 1997.

- Ludwig A, Rehberg S, Wegner M. Melanocyte-specific expression of dopachrome tautomerase is dependent on synergistic gene activation by the Sox10 and Mitf transcription factors. *FEBS Lett* 556: 236-244, 2004.
- Lyonnet S, Bolino A, Pelet A, Abel L, Nihoul-Fékété C, Briard ML, et al. A gene for Hirschsprung disease maps to the proximal long arm of chromosome 10. *Nat Genet* 4: 346-350, 1993.
- Maka M, Scolt CC, Werner M. Identification of Sox8 as a modifier gene in a mouse model of Hirschsprung disease reveals underlying molecular defect. *Dev Biol* 277: 155-169, 2005.
- Marsh D, Theodosopoulos G, Howell V, Richardson AL, Benn DE, Proos AL, et al. Rapid mutation scanning of genes associated with familial cancer syndrome using denaturing high-performance liquid chromatography. *Neoplasia* 3: 236-244, 2001.
- Marshall GM, Pearson AE, Hocker JE, Smith SA, Hansford LM, Tobias V, et al. Expression of multiple endocrine neoplasia 2B RET in neuroblastoma cells alters cell adhesion in vitro, enhances metastatic behaviour in vivo and activates Jun kinase. *Cancer Res* 57: 5399-5405, 1997.
- Martucciello G, Caffarena PE, Lerone M, Mattioli G, Barabino A, Bisio G, et al. Neuronal intestinal dysplasia: Clinical experience in Italian patients. *Eur J Pediatr Surg* 4: 287-292, 1994.
- Martucciello G, Ceccherini I, Lerone M, Jasonni V. Pathogenesis of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 35: 1017-1025, 2000.
- Martucciello G, Torre M, Pini Prato A, Lerone M, Campus R, Leggio S, et al. Associated Anomalies in Intestinal Neuronal Dysplasia. *J Pediatr Surg* 37: 219-223, 2002.
- Masaki T, Ninomiya H, Sakamoto A, Okamoto Y. Structural basis of the function of endothelin receptor. *Mol Cell Biochem* 190: 153-156, 1999.
- Masure S, Cik M, Hoefnagel E, Nosrat CA, Van der Linden I, Scott R, et al. Mammalian GFRalpha -4, a divergent member of the GFRalpha family of coreceptors for glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands, is a receptor for the neurotrophic factor persephin. *J Biol Chem* 275: 39427-39434, 2000.

- McCallion AS, Stames E, Conlon RA, Chakravarti A. Phenotype variation in two-locus mouse models of Hirschsprung disease: Tissue-specific interaction between Ret and Ednrb. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1826-1831, 2003.
- Metallinos DL, Bowling AT, Rine J. A missense mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with Lethal White Foal Syndrome: an equine version of Hirschsprung disease. *Mamm Genome* 9: 426-431, 1998.
- Matera I, Bachetti T, Puppo F, Di Duca M, Morandi F, Casiraghi GM, et al. PHOX2B mutations and polyalanine expansions correlate with the severity of the respiratory phenotype and associated symptoms in both congenital and late onset Central Hypoventilation syndrome. *J Med Genet* 41: 373-380, 2004.
- Matheson CR, Carnahan J, Urich JL, Bocangel D, Zhang TJ, Yan Q. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is a neurotrophic factor for sensory neurons: comparison with the effects of the neurotrophins. *J Neurobiol* 32: 22-32, 1997.
- Matini P, Mayer B, Faussonne-Pellegrini MS. Neurochemical differentiation of rat enteric neurons during pre- and postnatal life. *Cell Tissue Res* 288: 11-23, 1997.
- Maxwell GD. Cell cycle changes during neural crest cell differentiation in vitro. *Dev Biol* 49: 66-79, 1976.
- Meakin SO, Shooter EM. The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci* 15: 323-331, 1992.
- Mehlen P, Mazelin L. The dependence receptors DCC and UNC5H as a link between neuronal guidance and survival. *Biol Cell* 95: 425-436, 2003.
- Meier-Ruge W. Ueber ein Erkrankungsblid des Colon mit Hirschsprung Symptomatik. *Verh Dtsch Ges Pathol* 55: 506-511, 1971.
- Meier-Ruge WA. Epidemiology of congenital innervations defects of the distal colon. *Vichow Arch A Pathol Anat* 420: 171-177, 1992.
- Meier-Ruge WA, Bronnimann PB, Gambassi F, Schmid PC, Schmidt CP, Stoss F. Histopathological criteria for intestinal neuronal dysplasia of the submucosal plexus (type B). *Virchows Arch* 426: 549-556, 1995.

- Meier-Ruge WA, Ammann K, Bruder E, Holschneider AM, Scharli AF, Schmittenebecher PP, et al. Updated Results on Intestinal Neuronal Dysplasia (IND B). *Eur J Pediatr Surg* 14: 384-391, 2004.
- Meier-Ruge WA, Bruder E, Kapur RP. Intestinal neuronal dysplasia type B: one giant ganglion is not good enough. *Pediatr Dev Pathol* 9: 444-452, 2006.
- Melillo RM, Carlomagno F, De Vita G, Formisano P, Vecchio G, Fusco A, et al. The insulin receptor substrate (IRS)-1 recruits phosphatidylinositol 3-kinase to Ret: evidence for a competition between Shc and IRS-1 for the binding to Ret. *Oncogene* 20: 209-218, 2001a.
- Melillo RM, Santoro M, Ong SH, Billaud M, Fusco A, Hadari YR, et al. Docking protein FRS2 links the protein tyrosine kinase RET and its oncogenic forms with the mitogen-activated protein kinase signaling cascade. *Mol Cell Biol* 21: 4177-4187, 2001b.
- Miao X, Garcia-Barcelo MM, So MT, Leon TY, Lau DK, Liu TT, et al. Role of RET and PHOX2B gene polymorphisms in risk of Hirschsprung's disease in Chinese population. *Gut* 56:736, 2007.
- Milbrandt J, de Sauvage FJ, Fahrner TJ, Baloh RH, Leitner ML, Tansey MG, et al. Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron* 20:245-253, 1998.
- Ming GL, Song HJ, Beminger B, Holt CE, Tessier-Lavigne M, Poo MM. cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron* 19: 1225-1235, 1997.
- Moore MW, Klein RD, Farinas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, et al. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 382: 76-79, 1996.
- Moore SW, Tessier-Lavigne M, Kennedy TE. Netrins and their receptors. *Adv Exp Med Biol* 621: 17-31, 2007.
- Mosse YP, Laudenslager M, Khazi D, Carlisle AJ, Winter CL, Rappaport E, Maris JM. Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *Am J Hum Genet* 75: 727-730, 2004.
- Mowat DR, Wilson MJ, Goossens M. Mowat-Wilson syndrome. *J Med Genet* 40: 305-310, 2003.
- Mukai J, Hachiya T, Shoji-Hoshino S, Kimura MT, Nadano D, et al. NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated

Bibliografía

- by the common neurotrophin receptor p75NTR. *J Biol Chem* 275: 17566-17570, 2000.
- Muller G, Storz P, Bourteele S, Doppler H, Pfizenmaier K, Mischak H, et al. Regulation of Raf-1 kinase by TNF via its second messenger ceramide and cross-talk with mitogenic signalling. *EMBO J* 17:732-742, 1998.
- Mulligan LM, Gardner E, Smith BA, Mathew CG, Ponder BA. Genetic events in tumour initiation and progression in multiple endocrine neoplasia type 2. *Genes Chromosomes Cancer* 6: 166-177, 1993.
- Mulligan LM, Eng C, Attie T, Lyonnet S, Marsh DJ, Hyland VJ, et al. Diverse phenotypes associated with exon 10 mutations of the RET proto-oncogene. *Hum Mol Genet* 3: 2163-2167, 1994.
- Murakami H, Iwashita T, Asai N, Shimono Y, Iwata Y, Kawai K, et al. Enhanced phosphatidylinositol 3-kinase activity and high phosphorylation state of its downstream signalling molecules mediated by ret with the MEN 2B mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 262: 68-75, 1999.
- Murakami H, Yamamura Y, Shimono Y, Kawai K, Kurokawa K, Takahashi M. Role of Dok1 in cell signaling mediated by RET tyrosine kinase. *J Biol Chem* 277: 32781-32790, 2002.
- Murisier F, Guichard S, Beermann F. The tyrosinase enhancer is activated by Sox10 and Mitf in mouse melanocytes. *Pigment Cell Res* 20: 173-184, 2007.
- Myers SM, Eng C, Ponder BA, Mulligan LM. Characterization of RET proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C-terminus for RET. *Oncogene* 11: 2039-2045, 1995.
- Myers SM, Salomon R, Goessling A, Pelet A, Eng C, von Deimling A, et al. Investigation of germline GFR alpha-1 mutations in Hirschsprung disease. *J Med Genet* 36: 217-220, 1999.
- Nakamura T, Ishizaka Y, Nagao M, Hara M, Ishikawa T. Expression of the ret proto-oncogene product in human normal and neoplastic tissues of neural crest origin. *J Pathol* 172: 255-260, 1994.
- Nataf V, Lecoin L, Eichmann A, Le Douarin NM. Endothelin-B receptor is expressed by neural crest cells in the avian embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9645-9650, 1996.

- Nataf V, Amemiya A, Yanagisawa M, Le Douarin NM. The expression pattern of endothelin 3 in the avian embryo. *Mech Dev* 73: 217–220, 1998.
- Natarajan D, Marcos-Gutierrez C, Pachnis V, de Graaff E. Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. *Development* 129: 5151-5160, 2002.
- Nebigil CG, Choi DS, Dierich A, Hickel P, Le Meur M, Messaddeq N, et al. Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9508-9513, 2000.
- Newgreen DE, Tan SS. Adhesion molecules in neural crest development. *Pharmacol Ther* 60: 517-537, 1993.
- Newgreen D, Young HM. Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 1. *Pediatr Dev Pathol* 5: 224-247, 2002a.
- Newgreen D, Young HM. Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 2. *Pediatr Dev Pathol* 5: 329-349, 2002b.
- Nitta KR, Takahashi S, Haramoto Y, Fukuda M, Tanegashima K, Onuma Y, Asashima M. The N-terminus zinc finger domain of Xenopus SIP1 is important for neural induction, but not for suppression of Xbra expression. *Int J Dev Biol* 51: 321–325, 2007.
- Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 31: 3812-3814, 2003.
- Nikolopoulos SN, Giancotti FG. Netrin-integrin signaling in epithelial morphogenesis, axon guidance and vascular patterning. *Cell Cycle* 4:e131-e135, 2005.
- Núñez-Torres R, Fernández RM, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. A novel study of Copy Number Variations in Hirschsprung disease using Multiple Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) technique. *BMC Med Genet*; 10: 119-121, 2009.
- Obermeier A, Bradshaw RA, Seedorf K, Choidas A, Schlessinger J, Ullrich A. Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/Trk binding sites for SHC and PLC gamma. *EMBO J* 13: 1585-1590, 1994.

Bibliografía

- Oefner PJ, Underhill PA: DNA mutation detection using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Current Protocols In Human Genetics*. Eds Dracopoli NC, Haines J, et al. New York, NY, Wiley-Interscience. pp7.10.1-7.10.12, 1999.
- Okamoto N, Del Maestro R, Valero R, Monros E, Poo P, Kanemura Y, et al. Hydrocephalus and Hirschsprung's disease with a mutation of L1CAM. *J Hum Genet* 49: 334-337, 2004.
- Onochie CI, Korngut LM, Vanhorne JB, Myers SM, Michaud D, Mulligan LM. Characterisation of the human GFRalpha-3 locus and investigation of the gene in Hirschsprung disease. *J Med Genet* 37: 674-679, 2000.
- Okamoto E, Ueda T. Embryogenesis of intramural ganglia of the gut and its relation to Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 2: 437-443, 1967.
- Pachnis V, Mankoo B, Costantini F. Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development* 119: 1005-1017, 1993.
- Pandey A, Duan H, Di Fiore PP, Dixit VM. The Ret receptor protein tyrosine kinase associates with the SH2-containing adapter protein Grb10. *J Biol Chem* 270: 21461-21463, 1995.
- Paratore C, Eichenberger C, Suter U, Sommer L. Sox10 haploinsufficiency affects maintenance of progenitor cells in a mouse model of Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 11: 3075-3085, 2002.
- Paratore C, Goerich DE, Suter U, Wegner M, Sommer L. Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling. *Development* 128: 3949-3961, 2001.
- Parc R, Berrod JL, Tussiot J, Loygue J. Megacolon in adults. Apropos of 76 cases. *Ann Gastroenterol Hepatol* 20: 133-141, 1984.
- Parichy DM, Mellgren EM, Rawls JF, Lopes SS, Kelsh RN, Johnson SL. Mutational analysis of endothelin receptor b1 (rose) during neural crest and pigment pattern development in the zebrafish *Danio rerio*. *Dev Biol* 227: 294-306, 2000.
- Parisi MA, Kapur RP, Neilson I, Hofstra RM, Holloway LW, Michaelis RC, et al. Hydrocephalus and intestinal aganglionosis: is L1CAM a modifier gene in Hirschsprung disease? *Am J Med Genet* 108: 51-56, 2002.

- Pascual A, Hidalgo-Figueroa M, Piruat JI, Pintado CO, Gómez-Díaz R, López-Barneo J. Absolute requirement of GDNF for adult catecholaminergic neuron survival. *Nat Neurosci* 11: 755-761, 2008.
- Pasini B, Hofstra RM, Yin L, Bocciardi R, Santamaria G, Grootsholten PM, et al. The physical map of the human RET proto-oncogene. *Oncogene* 11: 1737-1743, 1995a.
- Pasini B, Borrello MG, Greco A, Bongarzone I, Luo Y, Mondellini P, et al. Loss of function effect of RET mutations causing Hirschsprung disease. *Nat Genet* 10: 35-40, 1995b.
- Pasini B, Rossi R, Ambrosio MR, Zatelli MC, Gullo M, Gobbo M, et al. RET mutation profile and variable clinical manifestations in a family with multiple endocrine neoplasia type 2A and Hirschsprung's disease. *Surgery* 131: 373-381, 2002.
- Passarge E. The genetics of Hirschsprung's disease. Evidence for heterogeneous etiology and a study of sixty-three families. *N Engl J Med* 276: 138-143, 1967.
- Pattyn A, Morin X, Cremer H, Goriadis C, Brunet JF. The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature* 399: 366-370, 1999.
- Pawson T, Nash P. Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev* 14: 1027-1047, 2000.
- Payette RE, Tennyson VM, Pham TD, Mawe GM, Pomeranz HD, Rothman TP, et al. Origin and morphology of nerve fibers in the aganglionic colon of the lethal spotted (ls/ls) mutant mouse. *J Comp Neurol* 257: 237-252, 1987.
- Peirano RI, Wegner M. The glial transcription factor Sox10 binds to DNA both as monomer and dimer with different functional consequences. *Nucleic Acids Res* 28: 3047-3055, 2000.
- Pelet A, Geneste O, Edery P, Pasini A, Chappuis S, Atti T, et al. Various mechanisms cause RET-mediated signaling defects in Hirschsprung's disease. *J Clin Invest* 101: 1415-1423, 1998.
- Pelet A, de Pontual L, Clement-Ziza M, Salomon R, Mugnier C, Matsuda F, et al. Homozygosity for a frequent and weakly penetrant predisposing allele at the RET locus in sporadic Hirschsprung disease. *J Med Genet* 42: e18, 2005.

Bibliografía

- Perri P, Bachetti T, Longo L, Matera I, Seri M, Tonini GP, et al. PHOX2B mutations and genetic predisposition to neuroblastoma. *Oncogene* 24: 3050–3053, 2005.
- Pham TD, Gershon MD, Rothman TP. Time of origin of neurons in the murine enteric nervous system: sequence in relation to phenotype. *J Comp Neurol* 314: 789-798, 1991.
- Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, Drago J, Grinberg A, et al. Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 382: 73–76, 1996.
- Pierotti MA, Bongarzone I, Borello MG, Greco A, Pilotti S, Sozzi G. Cytogenetics and molecular genetics of the carcinomas arising from thyroid epithelial follicular cells. *Genes Chromosomes Cancer* 16: 1-14, 1996.
- Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, Goerich DE, Préhu MO, Puliti A, et al. SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet* 18: 171-173, 1998.
- Pingault V, Bondurand N, Lemort N, Sancandi M, Ceccherini I, Hugot JP, et al. A heterozygous endothelin 3 mutation in Waardenburg-Hirschsprung disease: is there a dosage effect of EDN3/EDNRB gene mutations on neurocristopathy phenotypes? *J Med Genet* 38: 205-209, 2001.
- Pingault V, Girard M, Bondurand N, Dorkins H, Van Maldergem L, Mowat D, et al. SOX10 mutations in chronic intestinal pseudo-obstruction suggest a complex physiopathological mechanism. *Hum Genet* 111: 198-206, 2002.
- Pla P, Laure L. Involvement of endothelin receptors in normal and pathological development of neural crest cells. *Int J Dev Biol* 47: 315-325, 2003.
- Polleux F, Morrow T, Ghosh A. Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 404: 567–573, 2002.
- Pontiggia A, Rimini R, Harvey VR, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME. Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. *EMBO J* 13: 6115-6124, 1994.
- Powley TL. Vagal input to the enteric nervous system. *Gut* 47 Suppl 4: IV30–32, 2000.

- Pozas E, Pascual M, Nguyen Ba-Charvet KT, Guijarro P, Sotelo C, Chedotal A, et al. Age-dependent effects of secreted Semaphorins 3A, 3F, and 3E on developing hippocampal axons: in vitro effects and phenotype of Semaphorin 3A (-/-) mice. *Mol Cell Neurosci* 18: 26–43, 2001.
- Prato AP, Gentilino V, Giunta C, Avanzini S, Mattioli G, Parodi S, et al. Hirschsprung disease: do risk factors of poor surgical outcome exist? *J Pediatr Surg* 43: 612-619, 2008.
- Puffenberger EG, Hosoda K, Washington SS, Nakao K, deWit D, Yanagisawa M, et al. A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell* 79: 1257–1266, 1994.
- Puri P, Shinkai T. Pathogenesis of Hirschsprung's disease and its variants: recent progress. *Semin Pediatr Surg* 13: 18-24, 2004.
- Ramalho-Santos M, Melton DA, McMahon AP. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development* 127: 2763–2772, 2000.
- Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* 30: 3894-3900, 2002.
- Rauch U, Hansgen A, Hagl C, Holland-Cunz S, Schafer KH. Isolation and cultivation of neuronal precursor cells from the developing human enteric nervous system as a tool for cell therapy in dysganglionosis. *Int J Colorectal Dis* 21: 554–559, 2006.
- Richard I, Beckmann JS. How neutral are synonymous codon mutations? *Nature Genetics* 10 259–259, 1995.
- Roberts DJ, Johnson RL, Burke AC, Nelson CE, Morgan BA, Tabin C. Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. *Development* 121: 3163-3174, 1995.
- Roberts DJ, Smith DM, Goff DJ, Tabin CJ. Epithelial–mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut. *Development* 125: 2791–2801, 1998.
- Romeo G, Ronchetto P, Luo Y, Barone V, Seri M, Ceccherini I, et al. Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET protooncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 367: 377–378, 1994.

Bibliografía

- Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Barde YA. Neurotrophins: structural relatedness and receptor interactions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 331: 255-258, 1991.
- Rosenthal A. The GDNF protein family: gene ablation studies reveal what they really do and how. *Neuron* 22: 201-203, 1999.
- Rossi J, Luukko K, Poteryaev D, Laurikainen A, Sun YF, Laakso T, et al. Retarded growth and deficits in the enteric and parasympathetic nervous system in mice lacking GFR alpha2, a functional neurturin receptor. *Neuron* 22: 243-252, 1999.
- Roth L, Koncina E, Satkauskas S, Crémel G, Aunis D, Bagnard D. The many faces of semaphorins: from development to pathology. *Cell Mol Life Sci* 66: 649-66, 2009.
- Rothman TP, Gershon MD. Regionally defective colonization of the terminal bowel by the precursors of enteric neurons in lethal spotted mutant mice. *Neuroscience* 12: 1293-1311, 1984.
- Rothman TP, Chen J, Howard MJ, Costantini FD, Pachnis V, Gershon MD. Increased expression of laminin-1 and collagen (IV) subunits in the aganglionic bowel of *ls/ls*, but not *c-ret^{-/-}* mice. *Dev Biol* 178: 498-513, 1996.
- Roux PP, Bhakar AL, Kennedy TE, Barker PA. The p75 neurotrophin receptor activates Akt (protein kinase B) through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 276:23097-23104, 2001.
- Ruiz A, Antiñolo G, Borrego S, Sánchez B, Sánchez J. PCR mutagenesis-based method for generation of positive controls for SSCP analysis. *Biotechniques* 23: 704-708, 1997.
- Ruiz A, Antiñolo G, Fernández RM, Eng C, Marcos I, Borrego S. Germline sequence variant S836S in the RET proto-oncogene is associated with low level predisposition to sporadic medullary thyroid carcinoma in the Spanish population. *Clin Endocrinol* 55: 399-402, 2001.
- Ruiz-Ferrer M, Fernandez RM, Antiñolo G, Lopez-Alonso M, Eng C, Borrego S. A complex additive model of inheritance for Hirschsprung disease is supported by both RET mutations and predisposing RET haplotypes. *Genet Med* 8: 704-710, 2006.

- Ruiz-Ferrer M. Análisis molecular y funcional de genes candidatos como factores de susceptibilidad para la enfermedad de Hirschsprung y el cáncer medulas de tiroides. Tesis Doctoral. Departamento de Genética, Facultad de Biología. Universidad de Sevilla. 2007.
- Ruiz-Ferrer M, Fernandez RM, Antiñolo G, Lopez-Alonso M, Borrego S. NTF-3, a gene involved in the enteric nervous system development, as a candidate gene for Hirschsprung disease. *J Pediatr Surg* 43: 1308-1311, 2008.
- Ruiz-Ferre M, Torroglosa A, Luzón-Toro B, Sánchez-Mejías A, Fernández RM, Antiñolo G, et al. Novel mutations at NRTN and PSPN preventing RET activation are associated to Hirschsprung's disease: first link among PSPN and the disorder. *Hum Mol Genet*, 2010, In Press.
- Saffrey MJ, Wardhaugh T, Walker T, Daisley J, Silva AT. Trophic actions of neurotrophin-3 on postnatal rat myenteric neurons in vitro. *Neurosci Lett* 278: 133-136, 2000.
- Sakai T, Nirasawa Y, Itoh Y, Wakizaka A. Japanese patients with sporadic Hirschsprung: mutation analysis of the receptor tyrosine kinase proto-oncogene, endothelin-B receptor, endothelin-3, glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin genes: a comparison with similar studies. *Eur J Pediatr* 159: 160-67, 2000.
- Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 13: 103-108, 1992.
- Salehi AH, Roux PP, Kubu CJ, Zeindler C, Bhakar A, Tannis LL, et al. NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron* 27: 279-288, 2000.
- Salomon R, Attie T, Pelet A, Bidaud C, Eng C, Amiel J, et al. Germline mutations of the RET ligand GDNF are not sufficient to cause Hirschsprung disease. *Nat Genet* 14: 345-347, 1996.
- Sancandi M, Ceccherini I, Costa M, Fava M, Chen B, Wu Y, et al. Incidence of RET mutations in patients with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 35: 139-142, 2000.
- Sancandi M, Griseri P, Pesce B, Patrone G, Puppo F, Lerone M, et al. Single nucleotide polymorphic alleles in the 5' region of the RET proto-oncogene

Bibliografía

- define a risk haplotype in Hirschsprung's disease. *J Med Genet* 40: 714-718, 2003.
- Sánchez MP, Silos-Santiago I, Frisen J, He B, Lira SA, Barbacid M. Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 382: 70-73, 1996.
- Sánchez B, Antiñolo G, Navarro E, Japón MA, Conde AF, Astorga R, Borrego S. Cys 634 mutations in the RET proto-oncogene in Spanish families affected by MEN 2A. *Hum Mutat* 1: S72-73, 1998.
- Sánchez B, Robledo M, Biarnes J, Sáez ME, Volpini V, Benítez J, Navarro E, Ruiz A, Antiñolo G, Borrego S. High prevalence of the C634Y mutation in the RET proto-oncogene in MEN 2A families in Spain. *J Med Genet* 36: 68-70, 1999.
- Sánchez-Mejías A, Fernández RM, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. Contribution of RET, NTRK3 and EDN3 to the expression of Hirschsprung disease in a multiplex family. *J Med Genet* 46: 862-864, 2009.
- Sánchez-Mejías A, Fernández RM, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. New roles of EDNRB and EDN3 in the pathogenesis of Hirschsprung disease. *Genet Med* 12: 39-43, 2010a.
- Sánchez-Mejías A, Watanabe Y, Fernández RM, López-Alonso M, Antiñolo G, Bondurand N, et al. Involvement of SOX10 in the pathogenesis of Hirschsprung disease: report of a truncating mutation in an isolated patient. *J Mol Med*, In press, 2010b.
- Sánchez-Mejías A, Núñez-Torres R, Fernández RM, Antiñolo G, Borrego S. Novel MLPA procedure using self-designed probes allows comprehensive analysis for CNVs of the genes involved in Hirschsprung disease. *BMC Med Genet*, In press, 2010c.
- Sandgren K, Larsson LT, Ekblad E. Widespread changes in neurotransmitter expression and number of enteric neurons and interstitial cells of Cajal in lethal spotted mice. *Dig Dis Sci* 47: 1049-1064, 2002.
- Santoro M, Rosati R, Grieco M, Berlingieri MT, D'Amato GL, de Franciscis V, et al. The ret proto-oncogene is consistently expressed in human pheochromocytomas and thyroid medullary carcinomas. *Oncogene* 5: 1595-1598, 1990.

- Santschi EM, Purdy AK, Valberg SJ, Vrotsos PD, Kaese H, Mickelson JR. Endothelin receptor B polymorphism associated with lethal white foal syndrome in horses. *Mamm Genome* 9: 306-309, 1998.
- Sasaki A, Kanai M, Kijima K, Akaba K, Hashimoto M, Hasegawa H, et al. Molecular analysis of congenital central hypoventilation syndrome. *Hum Genet* 114: 22-26, 2003.
- Sato M, Tsai HJ, Yost HJ. Semaphorin3D regulates invasion of cardiac neural crest cells into the primary heart field. *Dev Biol* 298: 12-21, 2006.
- Schafer KH, Hagl CI, Rauch U. Differentiation of neurospheres from the enteric nervous system. *Pediatr Surg Int* 19: 340-344, 2003.
- Schimke RN. Genetic aspects of multiple endocrine neoplasia. *Annu Rev Med* 35: 25-31, 1984.
- Schmittenebecher PP, Sacher P, Cholewa D. Hirschsprung's disease and intestinal and intestinal neuronal dysplasia- a frequent association with implications for the postoperative course. *Pediatr Surg Int* 15: 553-558, 1999.
- Schneider R, Schweiger M. A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors. *Oncogene* 6: 1807-1811, 1991.
- Schneider R. The human protooncogene ret: a communicative cadherin? *Trends Biochem Sci* 17: 468-469, 1992.
- Schouten J, Sepers E, the MRC-Holland team. Designing synthetic MLPA probes. On line resource: <http://www.mlpa.com/WebForms>. Version 6; 14-11-2007. MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands.
- Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* 367: 380-383, 1994.
- Segouffin-Cariou C, Billaud M. Transforming ability of MEN2A-RET requires activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway. *J Biol Chem* 275: 3568-3576, 2000.
- Sellner LN, Taylor GR. MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. *Hum Mutat* 23: 413-419, 2004.

Bibliografía

- Seri M, Yin L, Barone V, Bolino A, Celli I, Bocciardi R, et al. Frequency of RET mutations in long- and short-segment Hirschsprung disease. *Hum Mutat* 9: 243-249, 1997.
- Serini G, Valdembri D, Zanivan S, Morterra G, Burkhardt C, Caccavari F, et al. Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function. *Nature* 424: 391-397, 2003.
- Serra A, Görgens H, Alhadad K, Ziegler A, Fitze G, Schackert HK. Analysis of RET, ZEB2, EDN3 and GDNF genomic rearrangements in 80 patients with Hirschsprung disease (using multiplex ligation-dependent probe amplification). *Ann Hum Genet* 73: 147-151, 2009.
- Sham MH, Lui VC, Chen BL, Fu M, Tam PK. Novel mutations of SOX10 suggest a dominant negative role in Waardenburg-Shah syndrome. *J Med Genet* 38: E30, 2001.
- Shanske A, Ferreira JC, Leonard JC, Fuller P, Marion RW. Hirschsprung disease in an infant with a contiguous gene syndrome of chromosome 13. *Am J Med Genet* 102: 231-236, 2001.
- Shekarabi M, Moore SW, Tritsch NX, Morris SJ, Bouchard JF, Kennedy TE. Deleted in colorectal cancer binding netrin-1 mediates cell substrate adhesion and recruits Cdc42, Rac 1, Pak 1, and N-WASP into an intracellular signaling complex that promotes growth cone expansion. *J Neurosci* 25: 3132-3141, 2005.
- Shepherd IT, Raper JA. Collapsin-1/semaphorin D is a repellent for chick ganglion of Remak axons. *Dev Biol* 212: 42-53, 1999.
- Shin MK, Levorse JM, Ingram RS, Tilghman SM. The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development. *Nature* 402: 496-501, 1999.
- Shirasawa S, Yunker AMR, Roth KA, Brown GA, Horning S, Korsmeyer SJ. Enx (Hox11L1)-deficient mice develop myenteric neuronal hyperplasia and megacolon. *Nat Med* 3: 646-650, 1997.
- Simonson MS, Dunn MJ. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J* 4: 2989-3000, 1990.
- Simpson MJ, Landman KA, Hughes BD. Cell proliferation drives neural crest cell invasion of the intestine. *Dev Biol* 302: 553-568, 2007.

- Skinner MA, Moley JA, Dilley WG, Owzar K, DeBenedetti MK, Wells SA. Prophylactic thyroidectomy in multiple endocrine neoplasia type 2A. *New Eng J Med* 353: 1105-1113, 2005.
- Skinner MA, Safford SD, Reeves JG, Jackson ME, Freemerman AJ. Renal aplasia in humans is associated with RET mutations. *Am J Hum Genet* 82: 344-351, 2008.
- Skutella T, Nitsch R. New molecules for hippocampal development. *Trends Neurosci* 24: 107-113, 2001.
- Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92: 735-745, 1998.
- Soker S, Miao HQ, Nomi M, Takashima S, Klagsbrun M. VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J Cell Biochem* 85: 357-368, 2002.
- Soler RM, Dolcet X, Encinas M, Egea J, Bayascas JR, Comella JX. Receptors of the glial cell line-derived neurotrophic factor family of neurotrophic factors signal cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in spinal cord motoneurons. *J Neurosci* 19: 9160-9169, 1999.
- Southard-Smith EM, Kos L, Pavan WJ. Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. *Nat Genet* 18: 60-64, 1998.
- Southard-Smith EM, Angrist M, Ellison JS, Agarwala R, Baxevanis AD, Chakravarti A, et al. The Sox10(Dom) mouse: modeling the genetic variation of Waardenburg-Shah (WS4) syndrome. *Genome Res* 9: 215-225, 1999.
- Spouge D, Baird PA. Hirschsprung disease in a large birth cohort. *Teratology* 32: 171-177, 1985.
- Stanchina L, Baral V, Robert F, Pingault V, Lemort N, Pachnis V, et al. Interactions between Sox10, Edn3 and Ednrb during enteric nervous system and melanocyte development. *Dev Biol* 295: 232-249, 2006.
- Stanchina L, Van de Putte T, Goossens M, Huylebroeck D, Bondurand N. Genetic interaction between Sox10 and Zfhx1b during enteric nervous system development. *Dev Biol*. In press, 2010.

- Stein E, Zou Y, Poo M, Tessier-Lavigne M. Binding of DCC by netrin-1 to mediate axon guidance independent of adenosine A2B receptor activation. *Science* 291: 1976-1982, 2001.
- Stephens RM, Loeb DM, Copeland TD, Pawson T, Greene LA, Kaplan DR. Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron* 12: 691-705, 1994.
- Stolt CC, Rehberg S, Ader M, Lommes P, Riethmacher D, Schachner M, et al. Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10. *Genes Dev* 16: 165-170, 2002.
- Suzuki K, Okuno T, Yamamoto M, Pasterkamp RJ, Takegahara N, Takamatsu H, et al. Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through alpha1beta1 integrin. *Nature* 446: 680-684, 2007.
- Svensson PJ, Molander ML, Eng C, Anvret M, Nordenskjöld A. Low frequency of RET mutations in Hirschsprung disease in Sweden. *Clin Genet* 54: 39-44, 1998.
- Svensson PJ, Tapper-Persson M, Anvret M, Molander ML, Eng C, Nordenskjöld A. Mutations in the endothelin-receptor B gene in Hirschsprung disease in Sweden. *Clin Genet* 55: 215-217, 1999.
- Sznajder Y, Coldéa C, Meire F, Delpierre I, Sekhara T, Touraine RL. A de novo SOX10 mutation causing severe type 4 Waardenburg syndrome without Hirschsprung disease. *Am J Med Genet A* 146A: 1038-1041, 2008.
- Tahira T, Ishizaka Y, Itoh F, Sugimura T, Nagao M. Characterization of ret proto-oncogene mRNAs encoding two isoforms of the protein product in a human neuroblastoma cell line. *Oncogene* 5: 97-102, 1990.
- Takagi Y, Ninomiya H, Sakamoto A, Miwa S, Masaki T. Structural basis of G protein specificity of human endothelin receptors. A study with endothelinA/B chimeras. *J Biol Chem* 270: 10072-10078, 1995.
- Takahashi M, Buma Y, Iwamoto T, Inaguma Y, Ikeda H, Hiai H. Cloning and expression of the ret proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. *Oncogene* 3: 571-578, 1988.
- Takahashi M, Buma Y, Hiai H. Isolation of ret proto-oncogene cDNA with an amino-terminal signal sequence. *Oncogene* 4: 805-806, 1989.

- Takahashi M, Buma Y, Taniguchi M. Identification of the ret proto-oncogene products in neuroblastoma and leukemia cells. *Oncogene* 6: 297-301, 1991.
- Takahashi M. The GDNF/RET signalling pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 12: 361-373, 2001.
- Taketomi T, Yoshiga D, Taniguchi K, Kobayashi T, Nonami A, Kato R et al. Loss of mammalian Sprouty2 leads to enteric neuronal hyperplasia and esophageal achalasia. *Nat Neurosci* 8: 855-857, 2005.
- Takigawa M, Sakurai T, Kasuya Y, Abe Y, Masaki T, Goto K. Molecular identification of guanine-nucleotide-binding regulatory proteins which couple to endothelin receptors. *Eur J Biochem* 228: 102-108, 1995.
- Tam PK, Garcia-Barceló M. Genetic basis of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 25: 543-558, 2009.
- Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, He Z, Ming GI, Song H, et al. Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99: 71-80, 1999.
- Taniguchi M, Yuasa S, Fujisawa H, Naruse I, Saga S, Mishina M, et al. Disruption of semaphorin III/D gene causes severe abnormality in peripheral nerve projection. *Neuron* 19: 519-530, 1997.
- Taraviras S, Marcos-Gutierrez CV, Durbec P, Jani H, Grigoriou M, Sukumaran M, et al. Signalling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system. *Development* 126: 2785-2797, 1999.
- Tessarollo L, Tsoulfas P, Martin-Zanca D, Gilbert DJ, Jenkins NA, Copeland NG, et al. *trkC*, a receptor for neurotrophin-3, is widely expressed in the developing nervous system and in non-neuronal tissues. *Development* 118: 463-475, 1993.
- Thapar N. New frontiers in the treatment of Hirschsprung disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 48: S92-94, 2009.
- Theocharatos S, Kenny SE. Hirschsprung's disease: Current management and prospects for transplantation of enteric nervous system progenitor cells. *Early Hum Dev* 84: 801-804, 2008.

Bibliografía

- Tomizawa Y, Sekido Y, Kondo M, Gao B, Yokota J, Roche J, et al. Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13954–13959, 2001.
- Touraine RL, Attie-Bitach T, Manceau E, Korsch E, Sarda P, Pingault V, et al. Neurological phenotype in Waardenburg syndrome type 4 correlates with novel SOX10 truncating mutations and expression in developing brain. *Am J Hum Genet* 66: 1496-1503, 2000.
- Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, et al. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 382: 80-83, 1996.
- Trochet D, Bourdeaut F, Janoueix-Lerosey I, Deville A, de Pontual L, Schleiermacher G, et al. Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Am J Hum Genet* 74: 761–764, 2004.
- Trudrung P, Furness JB, Pompolo S, Messenger JP. Locations and chemistries of sympathetic nerve cells that project to the gastrointestinal tract and spleen. *Arch Histol Cytol* 57: 139–150, 1994.
- Trupp M, Arenas E, Fainzilber M, Nilsson A-S, Sieber B-A, Grigoriou M, et al. Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. *Nature* 381: 785-789, 1996.
- Tsui-Pierchala BA, Ahrens RC, Crowder RJ, Milbrandt J, Johnson EM Jr. The long and short isoforms of Ret function as independent signaling complexes. *J Biol Chem* 277:34618-34625, 2002.
- Tsutsumi M, Liang G, Jones PA. Novel endothelin B receptor transcripts with the potential of generating a new receptor. *Gene* 228: 43-49, 1999.
- Tsuzuki T, Takahashi M, Asai N, Iwashita T, Matsuyama M, Asai J. Spatial and temporal expression of the ret proto-oncogene product in embryonic, infant and adult rat tissues. *Oncogene* 10: 191-198, 1995.
- Ure BM, Holschneider AM, Meier-Ruge W. Neuronal Intestinal Malformations: A Retro- and Prospective Study on 203 Patients. *Eur J Pediatr Surg* 4: 279-286, 1994.

- Urfer R, Tsoulfas P, O'Connell L, Shelton DL, Parada LF, Presta LG. An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. *EMBO J* 14: 2795-2805, 1995.
- Urfer R, Tsoulfas P, O'Connell L, Hongo JA, Zhao W, Presta LG. High resolution mapping of the binding site of TrkA for nerve growth factor and TrkC for neurotrophin-3 on the second immunoglobulin-like domain of the Trk receptors. *J Biol Chem* 273: 5829-5840, 1998.
- Van de Putte T, Francis A, Nelles L, van Grunsven LA, Huylebroeck D. Neural crest-specific removal of Zfhx1b in mouse leads to a wide range of neurocristopathies reminiscent of Mowat–Wilson syndrome. *Hum Mol Genet* 16: 1423–1436, 2007.
- van Weering DH, de Rooij J, Marte B, Downward J, Bos JL, Burgering BM. Protein kinase B activation and lamellipodium formation are independent phosphoinositide 3-kinase-mediated events differentially regulated by endogenous Ras. *Mol Cell Biol* 18: 1802-1811, 1998.
- Vanhorne JB, Gimm O, Myers SM, Kaushik A, von Deimling A, Eng C, et al. Cloning and characterization of the human GFRA2 locus and investigation of the gene in Hirschsprung disease. *Hum Genet* 108: 409-415, 2001.
- Verheij JB, Kunze J, Osinga J, van Essen AJ, Hofstra RM. ABCD syndrome is caused by a homozygous mutation in the EDNRB gene. *Am J Med Genet* 108: 223–225, 2002.
- Verheij JB, Sival DA, van der Hoeven JH, Vos YJ, Meiners LC, Brouwer OF, et al. Shah-Waardenburg syndrome and PCWH associated with SOX10 mutations: a case report and review of the literature. *Eur J Paediatr Neurol* 10: 11-17, 2006.
- Vohra B, Tsuji K, Nagashimada M, Uesaka T, Wind D, Armon J, et al. Differential gene expression and functional analysis implicates novel mechanisms in enteric nervous system precursor migration and neuritogenesis. *Dev Biol* 298: 259–271, 2006.
- Wakamatsu N, Yamada Y, Yamada K, Ono T, Nomura N, Taniguchi H, et al. Mutations in SIP1, encoding Smad interacting protein-1, cause a form of Hirschsprung disease. *Nat Genet* 27: 369-370, 2001.

Bibliografía

- Waardenburg PJ. A new syndrome combining developmental anomalies of the eyelids, eyebrows and nose root with pigmentary defects of the iris and head hair and with congenital deafness. *Am J Hum Genet* 3: 195–253, 1951.
- Wang B, Zhang N, Qian KX, Geng JG. Conserved molecular players for axon guidance and angiogenesis. *Curr Protein Pept Sci* 6: 473–478, 2005.
- Wegner M, Burley K. Architectural transcription factors: proteins that remodel DNA. *Cell* 88: 733–736, 1997.
- Wegner M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acid Res* 27: 1409–1420, 1999.
- Weese-Mayer DE, Silvestri JM, Marazita ML, Hoo JJ. Congenital central hypoventilation syndrome: inheritance and relation to sudden infant death syndrome. *Am J Med Genet* 47: 360–367, 1993.
- Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Zhou L, Maher BS, Silvestri JM, Curran ME, et al. Idiopathic congenital central hypoventilation syndrome: analysis of genes pertinent to early autonomic nervous system embryologic development and identification of mutations in PHOX2b. *Am J Med Genet* 123A: 267–278, 2003.
- Woodward MN, Kenny SE, Vaillant C, Lloyd DA, Edgar DH. Time-dependent effects of endothelin-3 on enteric nervous system development in an organ culture model of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 35: 25–29, 2000.
- Wooten MW, Seibenhener ML, Mamidipudi V, Diaz-Meco MT, Barker PA, Moscat J. The atypical protein kinase C-interacting protein p62 is a scaffold for NF-kappaB activation by nerve growth factor. *J Biol Chem* 276: 7709–7712, 2001.
- Worley DS, Pisano JM, Choi ED, Walus L, Hession CA, Cate RL, et al. Developmental regulation of GDNF response and receptor expression in the enteric nervous system. *Development* 127: 4383–4393, 2000.
- Wright DE, White FA, Gerfen RW, Silos-Santiago I, Snider WD. The guidance molecule semaphorin III is expressed in regions of spinal cord and periphery avoided by growing sensory axons. *J Comp Neurol* 361: 321–333, 1995.
- Wu JJ, Chen JX, Rothman TP, Gershon MD. Inhibition of in vitro enteric neuronal development by endothelin-3: mediation by endothelin B receptors. *Development* 126: 1161–1173, 1999.

- Wu X, Howard MJ. Transcripts encoding HAND genes are differentially expressed and regulated by BMP4 and GDNF in developing avian gut. *Gene Expr* 10: 279-293, 2002.
- Wu X, Howard MJ. Transcripts encoding HAND genes are differentially expressed and regulated by BMP4 and GDNF in developing avian gut. *Gene Expr* 10: 279-293, 2003.
- Yamataka A, Hatano M, Kobayashi H, Wang K, Miyahara K, Sueyoshi N, et al. Intestinal neuronal dysplasia-like pathology in *Ncx/Hox11L.1* gene-deficient mice. *J Pediatr Surg* 36:1293-1296, 2001.
- Yanai T, Kobayashi H, Yamataka A, Lane GJ, Miyano T, Hayakawa T, et al. Acetylcholine-related bowel dysmotility in homozygous mutant *NCX/HOX11L1*-deficient (*NCX-/-*) mice—evidence that acetylcholine is implicated in causing intestinal neuronal dysplasia. *J Pediatr Surg* 39:927-930, 2004.
- Yanagisawa H, Yanagisawa M, Kapur RP, Richardson JA, Williams SC, Clouthier DE, et al. Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development* 125:825-836, 1998.
- Yang GC, Croaker D, Zhang AL, Manglick P, Cartmill T, Cass D. A dinucleotide mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with lethal white foal syndrome (LWFS); a horse variant of Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 7: 1047-1052, 1998.
- Yin L, Barone V, Seri M, Bolino A, Bocciardi R, Ceccherini I, et al. Heterogeneity and low detection rate of RET mutations in Hirschsprung disease. *Eur J Hum Genet* 2: 272-280, 1994.
- Yin L, Seri M, Barone V, Tocco T, Scaranari M, Romeo G. Prevalence and parental origin of de novo RET mutations in Hirschsprung's disease. *Eur J Hum Genet* 4: 356-358, 1996.
- Yntema CL, Hammond WS. The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. *J Comp Neurol* 101: 515-541, 1954.
- Young HM, Furness JB, Shuttleworth CW, Brecht DS, Snyder SH. Co-localization of nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH diaphorase staining in neurons of the guinea-pig intestine. *Histochemistry* 97: 375-378, 1992.

Bibliografía

- Young HM, Hearn CJ, Farlie PG, Canty AJ, Thomas PQ, Newgreen DF. GDNF Is a chemoattractant for enteric neural cells. *Dev Biol* 229: 503–516, 2001.
- Young HM, Bergner AJ, Muller T. Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine. *J Comp Neurol* 456: 1-11, 2003.
- Young HM, Anderson RB, Anderson CR. Guidance cues involved in the development of the peripheral autonomic nervous system. *Auton Neurosci* 112: 1-14, 2004.
- Young HM, Turner KN, Bergner AJ. The location and phenotype of proliferating neural-crest-derived cells in the developing mouse gut. *Cell Tissue Res* 320: 1–9, 2005.
- Young HM. Functional development of the enteric nervous system—from migration to motility. *Neurogastroenterol Motil* 20: 20–31, 2008.
- Zaahl MG, Du Plessis L, Warnich L, Kotze MJ, Moore SW. Significance of novel endothelin-B receptor gene polymorphisms in Hirschsprung's disease: Predominance of a novel variant (561C/T) in patients with co-existing Down's syndrome. *Mol Cell Probes* 17: 49-54, 2003.
- Zhu L, Lee HO, Jordan CS, Cantrell VA, Southard-Smith EM, Shin MK. Spatiotemporal regulation of endothelin receptor-B by SOX 10 in neural crest-derived enteric neuron precursors. *Nat Genet* 36: 732-737, 2004.
- Zweier C, Peippo MM, Hoyer J, Sousa S, Bottani A, Clayton-Smith J, et al. Haploinsufficiency of TCF4 causes syndromic mental retardation with intermittent hyperventilation (Pitt-Hopkins syndrome). *Am J Hum Genet* 80: 994-1001, 2007.
- Zwijnsen A, Verschueren K, Huylebroeck D. New intracellular components of bone morphogenetic protein/Smad signalling cascades. *FEBS Lett* 546: 133-139, 2003.

Avencia Sánchez-Mejías García

avencia.sanchez.exts@juntadeandalucia.es | 955012776
avencia.sm@gmail.com | 654810074

FORMACIÓN ACADÉMICA

Licenciado Biología. Universidad de Sevilla, 2006

Máster Oficial en Investigaciones Biomédicas. Universidad de Sevilla, 2007

SITUACIÓN PROFESIONAL

Ayuda Predoctoral de Formación en Investigación (2007 y en la actualidad)

- **Institución:** Fondo de Investigaciones Biomédicas. Instituto de Salud Carlos III
- **Centro:** Hospitales universitarios Virgen del Rocío
- **Departamento:** Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal.
Dirección: Avda. Manuel Siurot s/n 41013-Sevilla, España
Tfno: 955012776 **Fax:** 955013473

EXPERIENCIA CIENTÍFICA

- **Alumna Interna** | Departamento de Genética | Universidad de Sevilla | Sep 2004-Jun 2005
- **Beca de la Colaboración del Ministerio de Educación y Ciencia** en el Laboratorio dirigido por la Dra. Isabel López Calderón, de Genética de Levaduras
Departamento de Genética | Universidad de Sevilla | Oct 2005-Jun 2006
- **Beca de adscrita al proyecto del Fondo de Investigaciones Biomédicas** "Estudio epidemiológico y genético de distrofias hereditarias de retina: genes y mecanismos moleculares relacionados con el locus RP25. (PI050857)"
Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal
Hospitales Universitarios Virgen del Rocío | Jul06-Ene07

PUBLICACIONES

1. Fernandez RM, **Sánchez-Mejías A**, Mena MD, Ruiz-Ferrer M, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. A novel point variant in NTRK3, R645C, suggests a role of this gene in the pathogenesis of Hirschsprung disease. Ann Hum Genet. 2009; 73: 19-25.
2. Fernández RM, **Sánchez-Mejías A**, Ruiz-Ferrer M, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. Is the RET proto-oncogene involved in the pathogenesis of intestinal neuronal dysplasia type B? Molecular Medicine Reports. 2009; 2: 265-270.
3. **Sánchez-Mejías A**, Fernández RM, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. Contribution of RET, NTRK3 and EDN3 to the expression of Hirschsprung disease in a multiplex family. J Med Genet. 2009; 46: 862-864.
4. Fernández RM, **Sánchez-Mejías A**, Navarro E, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. The RET Functional Variant c*587T>C is Not Associated with Susceptibility to Sporadic Medullary Thyroid Cancer. Thyroid. 2009; 19: 1017-1018.
5. **Sánchez-Mejías A**, Fernández RM, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. New roles of EDNRB and EDN3 in the pathogenesis of Hirschsprung disease. Genet Med. 2010; 12: 39-43.
6. **Sánchez-Mejías A**, Watanabe Y, Fernández RM, López-Alonso M, Antiñolo G, Bondurand N, Borrego S. Involvement of SOX10 in the pathogenesis of Hirschsprung disease: report of a truncating mutation in an isolated patient. J Mol Med. 2010; 88: 507-511.

7. **Sánchez-Mejías A**, Núñez-Torres R, Fernández RM, Antiñolo G, Borrego S. Novel MLPA procedure using self-designed probes allows comprehensive analysis for CNVs of the genes involved in Hirschsprung disease. BMC Med Genet. 2010. In press.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

Comunicación: Revelación de Actividades Secundarias de Enzimas de Saccharomyces Cerevisiae

P. Marina, A. Sánchez-Mejías, I. Velasco, I. L. Calderón.

VI Reunión de la Red Española de Levaduras (Resúmenes). Reunión de la Red Española de Levaduras. Num. 6. Pag. 12-12. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, Spain. 16-17 Diciembre 2005.

Comunicación: NTF-3, nuevo gen candidato para la enfermedad de Hirschsprung

M Ruiz-Ferrer, R. Fernandez, A. Sánchez-Mejías, M. Lopez-alonso, G. Antinolo, S. Borrego.

XXIV Congreso Nacional de Genética Humana. Alicante, España. 19-21 Septiembre 2007

Comunicación: Origen común de una mutación universal del proto-oncogén RET, asociada a las formas esporádicas de la enfermedad de Hirschsprung (HSCR)

R.M. Fernández, J. Amiel, G. Antiñolo, G. Brurzynski, I. Ceccherini, A. Chakravarti, E. Emison, M. García-Barceló, P. Griseri, R. Hofstra, F. Lantieri, S. Lyonnet, M. Ruiz-Ferrer, A. Sánchez-Mejías, P. Tam, A. Tullio-Pellet, S. Borrego.

XXIV Congreso Nacional de Genética Humana. Alicante, España. 19-21 Septiembre 2007

Conferencia: Análisis molecular de genes candidatos para la enfermedad de Hirschsprung

Ruiz-Ferrer M, Fernández RM, Sánchez-Mejías A, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S.

Reunión anual CIBERER. Barcelona, España. 12 - 13 de Noviembre, 2007

Comunicación: NTRK3, a gene involved in the enteric nervous system development, is related to Hirschsprung disease

A. Sanchez-Mejías, M. Ruiz-Ferrer, RM. Fernandez, MD. Mena, M. Lopez-Alonso, G. Antiñolo, S. Borrego.

European Human Genetics Conference 2008, European Society of Human Genetics.

Barcelona, España. 31 Mayo - 3 Junio 2008.

Comunicación: Association of the RET proto-oncogen to Intestinal Neuronal Dysplasia type B

RM. Fernandez, M. Ruiz-Ferrer, A. Sanchez-Mejías, M. Lopez-Alonso, G. Antiñolo, S. Borrego.

European Human Genetics Conference 2008, European Society of Human Genetics.

Barcelona, España. 31 Mayo - 3 Junio 2008

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

Estudio epidemiológico y genético de distrofias hereditarias de retina: genes y mecanismos moleculares relacionados con el locus RP25.

Organismo: Fondo de Investigación Sanitaria (PI050857), 2005-2008. Investigador colaborador.

Análisis molecular y funcional de genes candidatos como genes de susceptibilidad para la enfermedad de Hirschsprung, la displasia neuronal intestinal y el cáncer medular de tiroides.

Organismo: Fondo de Investigación Sanitaria (PI070080), 2008-2010. Investigador colaborador.

Cáncer medular de tiroides y enfermedades del sistema nervioso entérico: Evaluación de genes candidatos y análisis de asociación genómica para la identificación de regiones ligadas a estas patologías.

Organismo: Proyectos de investigación de Excelencia. C. Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (2509), 2008-2010. Investigador colaborador.

Identificación de perfiles de miRNAs de tumores relacionados con la Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2, carcinoma medular de tiroides (CMT), y feocromocitoma. Comparación entre formas familiares y esporádicas. (Proyecto intramural coordinado).

Organismo: Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) (INTRA/07/705.3).

Instituto de Salud Carlos III. 2008. Investigador colaborador.

Consortio Internacional para la enfermedad de Hirschsprung.

Organismo: Fondo de Investigación Sanitaria (PI071315), 2008-2010. Investigador colaborador.

Evaluación de genes candidatos y análisis de asociación genómica para la identificación de regiones ligadas a la enfermedad de HSCR y la displasia neuronal intestinal.

Organismo: Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (PI-0249/2008), 2009-2011. Investigador colaborador.

ESTANCIAS EN CENTROS DE INVESTIGACION INTERNACIONALES**Dra. Mercedes Robledo, grupo de Cáncer Endocrino Hereditario, Programa de Genética del Cáncer Humano, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).**

Formación en técnicas de microarrays en miRNAs, aislamiento de miRNAs, análisis de expresión de miRNAs. Aplicación de estas técnicas en oncología.

Madrid, España, 25 al 28 de Febrero 2008

Dra. Nadège Bondurand laboratory, Inserm Unit 955, Hôpital Henri Mondor

Formación en técnicas de biología molecular, cultivos celulares, transfección, inmunohistoquímica y estudios de genes reporteros; además de llevar a cabo el estudio de las consecuencias funcionales de dos mutaciones en SOX10.

Creteil, Francia, 23 de Marzo al 1 de Mayo 2009.

PREMIOS

- Premio Andaluna a la Acción en Defensa de los Derechos de la Infancia 2007. Junta de Andalucía. Consejería para la Igualdad y Bienestar Social.

A la UGC Genética, Reproducción y Medicina Fetal.

- CANF DE ORO 2007. A la UGC Genética, Reproducción y Medicina Fetal del Hospital Virgen del Rocío. Por los éxitos conseguidos en la rama de las enfermedades hereditarias gracias al desarrollo del Diagnóstico Genético Preimplantatorio.

- Galardón FAAM de Oro 2008 en la categoría de Investigación. Federación Almeriense de Asociaciones de Personas con Discapacidad.

A la UGC Genética, Reproducción y Medicina Fetal.

- Premio Plaza de España 2008, concedido por la Delegación del Gobierno en Andalucía, a los valores constitucionales a la Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

- Premio "El Público" 2009. Canal Sur Radio. A la UGC Genética, Reproducción y Medicina Fetal.

OTRAS ACTIVIDADES y MÉRITOS RELEVANTES DE INTERÉS CIENTÍFICO O ACADÉMICO

- Jornada "La Farmacogenética en la Práctica Clínica". Organizado por la Fundación Progreso y Salud. Sevilla, España. 26 Enero 2007.

- Participación en el "V Foro de Investigadores de HH UU Virgen del Rocío". Sevilla, España, 16 y 17 de Marzo 2007.

- Miembro numerario de la "Asociación Española de Genética Humana" desde Diciembre de 2007

- Seminario "Soluciones de Microarrays para Investigación y Aplicaciones Clínicas" organizado por Agilent Technologies. Sevilla, España, 29 de Enero 2008.

- Curso de Bioinformática CIBERER. Valencia, España, 16 y 17 de Febrero 2009.

- Simposio "Internacional Symposium on Embryonic Stem Cell Therapy For Human Retinal Disease" organizado por el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER). Sevilla, España, 20 de Mayo 2009.

- Curso "Basic Real Time PCR on the 7900 Real-Time PCR System" (16 horas). Barcelona, España, 16 y 17 de Julio, 2009.

- Simposio Internacional "Genes, genomas y el Nuevo paradigma de la Medicina Personalizada" organizado por el Instituto Roche y la Fundación Progreso y Salud. Sevilla, España, 19 de Noviembre, 2009.

Is the *RET* proto-oncogene involved in the pathogenesis of intestinal neuronal dysplasia type B?

RAQUEL MARÍA FERNÁNDEZ^{1,2}, AVENCIA SÁNCHEZ-MEJÍAS^{1,2}, MARIA MACARENA RUIZ-FERRER^{1,2},
MANUEL LÓPEZ-ALONSO^{2,3}, GUILLERMO ANTIÑOLO^{1,2} and SALUD BORREGO^{1,2}

¹Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, 41013 Seville; ²CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Seville; ³Unidad de Gestión Clínica de Cirugía Infantil, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, 41013 Seville, Spain

Received October 9, 2008; Accepted December 9, 2008

DOI: 10.3892/mmr_00000094

Abstract. Hirschsprung disease (HSCR) is defined by the absence of intramural ganglia of Meissner and Auerbach along variable lengths of the gastrointestinal tract. Intestinal neuronal dysplasia (IND) type B is characterized by the malformation of the parasympathetic submucous plexus of the gut. A connection appears to exist between these two enteric nervous system abnormalities. Due to the major role played by the *RET* proto-oncogene in HSCR, we sought to determine whether this gene was also related to INDB. dHPLC techniques were employed to screen the *RET* coding region in 23 patients presenting with INDB and 30 patients with a combined HSCR+INDB phenotype. In addition, eight *RET* single nucleotide polymorphisms (SNPs) were strategically selected and genotyped by TaqMan technology. The distribution of SNPs and haplotypes was compared among the different groups of patients (INDB, HSCR+INDB, HSCR) and the controls. We found several *RET* mutations in our patients and some differences in the distribution of the *RET* SNPs among the groups of study. Our results suggest an involvement of *RET* in the pathogenesis of intestinal INDB, although by different molecular mechanisms than those leading to HSCR. Further investigation is warranted to elucidate these precise mechanisms and to clarify the genetic nature of INDB.

Introduction

Intestinal neuronal dysplasia (IND), a malformation of the enteric nervous system (ENS) (1), is subclassified into two clinically and histologically distinct subtypes (2). IND type A

(OMIM 243180) is a very rare condition characterized by congenital aplasia or hypoplasia of the sympathetic innervation. INDB (OMIM 601223), accounting for over 95% of cases of isolated IND, is characterized by malformation of the parasympathetic submucous plexus. Children afflicted with INDB present with intractable constipation and grossly slowed intestinal transit time. Characteristic histologic features of INDB include hypoganglionosis of the submucous plexus, giant ganglia, ectopic ganglion cells and increased acetylcholinesterase activity in the lamina propria and around submucosal blood vessels (3). The clinical picture of INDB in some ways resembles Hirschsprung disease (HSCR, OMIM 142623), a congenital disorder characterized by the absence of intramural ganglion cells in the myenteric and submucosal plexuses along a variable portion of the distal intestine. However, in absolute contrast to HSCR, INDB does not include a region of aganglionosis, though it is reported to sometimes show increased extrinsic nerve fibers in the affected gut, as in HSCR. In addition, a connection seems to exist between these two ENS abnormalities; HSCR often includes a region of INDB-like character proximal to the aganglionic segment. In this respect, some investigators have reported that, in 25-35% of patients presenting with HSCR, the disease is associated with INDB (4).

Uncertainty exists concerning the real incidence of INDB, given the considerable confusion regarding its essential diagnostic criteria. This has also led to doubt regarding whether INDB exists as a distinct histopathologic entity. However, animal models, such as two different *Hox11L1* knockout mice and an (EDNRB)-deficient rat, show phenotypes very similar to those observed in IND, thus providing a strong piece of evidence that IND is a real entity and may be linked to a genetic defect. Such a genetic component is also supported by a study in monozygotic twins affected with IND, and by a report of several families in which multiple members from different generations had biopsy-proven INDB, although without specific identified genetic alterations (4).

In contrast to HSCR, very little is known regarding the genetic basis of INDB. HSCR presents a multifactorial non-Mendelian model of inheritance with several genes, usually related to the developmental programme of neural crest cells, playing some aetiological role in its pathogenesis (5). Undoubtedly, the major susceptibility gene for HSCR is the

Correspondence to: Dr Salud Borrego, Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot s/n, 41013 Seville, Spain
E-mail: salud.borrego.sspa@juntadeandalucia.es

Key words: enteric nervous system disorders, Hirschsprung disease, intestinal neuronal dysplasia type B, *RET* proto-oncogene, susceptibility haplotypes

RET proto-oncogene (OMIM 164761), which encodes a receptor tyrosine kinase expressed in tissues and tumours derived from the neural crest and neuroectoderm. Depending on the series, traditional germline loss-of-function mutations in *RET* account for up to 50% of familial HSCR cases and 7-35% of sporadic cases, and the results derived from *in vitro* analyses suggest that haploinsufficiency is the most likely mechanism behind them. In addition, the involvement of *RET* in the pathogenesis of HSCR is supported by the existence of a specific haplotype, constituted by common *RET* polymorphisms, which seems to be responsible for the majority of sporadic forms (5-7). The most recent investigations, in the elucidation of the functional mechanism by which this HSCR-associated *RET* haplotype acts, have revealed that it is characterized by a common *RET* variant within a conserved enhancer-like sequence in intron 1, which markedly reduces *in vitro* enhancer activity (6). Since HSCR and INDB are ENS disorders that frequently occur in combination with each other, it seems plausible to speculate about the existence of common molecular pathways involved in the genesis of the two pathologies. Although a previous study based on linkage analysis showed that the INDB locus was not linked to *RET* in two pedigrees analyzed (8), and a negative mutational screening was previously reported in a small series of INDB patients (9), such analyses cannot completely rule out the implication of *RET* in the disease. It is plausible that common *RET* variants/haplotypes play a role as risk factors for INDB, just as they do for HSCR (5-7). Thus, in our series, we sought to perform both a *RET* mutational screening and an evaluation of various specific polymorphisms/haplotypes as susceptibility factors for this disease.

Materials and methods

Patients and control subjects. The University Hospital Virgen del Rocío in Seville is the major referral center for ENS disorders in southern Spain. We performed an exhaustive retrospective study of 23 patients presenting with INDB and 30 patients with a combined HSCR+INDB phenotype that were admitted to the Pediatric Surgery Unit of our hospital between 1980 and 2007. After the re-evaluation of all the biopsy specimens, INDB was histologically diagnosed according to the criteria updated by Meier-Ruge *et al.* (3). Based on these criteria, diagnosis was performed when patients were over a year of age, and a minimum of 25 submucosal ganglia were randomly evaluated in the corresponding histological sections. In each case, >20% of the colonic submucosal ganglia analyzed were found to be giant, with a giant ganglion considered to be one containing >8 nerve cell cross sections. Of note, one of the INDB patients included in this series had a monozygotic twin, also affected by INDB. On the other hand, HSCR was diagnosed when an absence of enteric plexuses was noted upon histological evaluation of the aganglionic tract, and in cases of increased acetylcholinesterase immunohistochemical staining in the nerve fibers. Accordingly, the HSCR+INDB phenotype was determined upon observation of a region suggestive of INDB proximal to the aganglionic segment in an HSCR patient.

In addition, we analyzed a group of 100 controls who were not race-, age- or gender-matched, and who did not

have any symptoms suggestive of HSCR or INDB. Informed consent was obtained from all the participants for clinical and molecular genetic studies. The study conformed to the tenets of the Declaration of Helsinki.

PCR, dHPLC and sequence analysis. We used a method based on PCR amplification and dHPLC analysis described elsewhere (10) for the mutational screening of the *RET* coding region, including intron/exon boundaries. The samples with aberrant wave profiles were subjected to sequence analysis, using conditions previously reported (10).

Selection and genotyping of RET sequence variants. We sought to analyze the distribution of eight *RET* single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the isolated INDB and HSCR+INDB groups, and to compare this with the available data for isolated HSCR patients and controls derived from our previous studies (7,11). Selection of the variants was based on their previously reported association with either HSCR or another disease, such as sporadic medullary thyroid cancer, papillary thyroid cancer or pheochromocytoma (5-7,11-14). Large scale genotyping of all these *RET* SNPs was performed using TaqMan-based techniques for allelic discrimination (TaqMan® SNP Genotyping Assay, Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's recommendations.

Statistical analysis. Allelic, haplotypic and genotypic frequencies and the distribution of the *RET* polymorphisms were calculated and then compared among patients presenting with INDB or HSCR+INDB, and also with the available data from previous analyses of our series of isolated HSCR patients and controls. Data were analyzed employing the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Version 15.0 for Windows. Statistical significance was calculated using Pearson's χ^2 analysis, with statistical significance set at $p < 0.001$. If statistical significance was obtained for any of the variants, an additional analysis was performed consisting of the comparison of the groups two by two, with the aim of elucidating the cause of the strong difference in distribution.

Results

Identification of RET coding mutations. We analyzed the coding region of *RET* in 23 INDB and 30 HSCR+INDB patients using dHPLC technology. Besides the wave profiles corresponding to common *RET* polymorphisms that we had already observed in a previous study (10), we detected four novel aberrant wave profiles. Subsequent direct sequence analysis revealed four different sequence variants present in three HSCR+ INDB cases and in one isolated INDB case. Two of the variants had previously been reported as mutations related to HSCR (R982C and Y1062C), while the other two (V145I and c.3145delCC) were novel.

R982C (c.2944C→T, rs17158558), previously reported by Mulligan *et al.* (15), was detected in a female presenting with INDB, which *in silico* predictions described as pathogenic. More specifically, R982C is defined as damaging by PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>), a bioinformatic tool which estimates the possible impact of an amino acid change on the structure and function of a human protein by implement-

ing straightforward physical and comparative considerations. In addition, the substitution of arginine by cysteine was determined as not tolerated by SIFT (<http://blocks.fhrc.org/sift/SIFT.html>), which predicts whether an amino acid substitution affects protein function based on sequence homology and the physical properties of amino acids. Finally, DiANNA (<http://bioinformatics.bc.edu/clotelab/DiANNA/>) was used to analyze the potential impact of the inclusion of the new cysteine in the protein sequence, since this biotool can predict whether a particular cysteine is reduced, forming a disulfide bond, or bound to a metallic ligand. This analysis revealed that the presence of an additional cysteine residue at position 982 might not only suggest the formation of a new disulfide bond between this residue and C656, but could also lead to the destruction/generation of different bonds with respect to the wild-type protein. However, although *in silico* analyses are very promising, the presence of this variant was also observed in 7/200 control chromosomes, corresponding to an allelic frequency of 3.5%.

A second variant, c.3185 A→G (p.Y1062C), first described by Wu *et al* (16), was detected in an HSCR+INDB male patient. This variant also appeared in his father and sister, but was not detected in the normal controls. With respect to the novel mutations, one of them, c.433 G→A (p.V145I), consisted of a missense substitution in exon 3 that was observed in an HSCR+INDB male. While maternal transmission was dismissed, it was impossible to determine whether the mutation had been inherited from the father or whether it had occurred as a *de novo* event in the proband. The second novel mutation was the deletion c.3145delCC, which causes a shift in the reading frame of the protein counting from amino acid 1049 and generates a premature stop codon resulting in a protein of 1057 amino acids. It was present in another HSCR+INDB male as well as in his unaffected father. Notably, neither V145I nor c.3145delCC were present in the 200 control chromosomes tested.

Analysis of the distribution of RET variants and haplotypes in the different groups. In addition, we analyzed the allelic and genotypic distribution of eight *RET* SNPs in the isolated INDB, HSCR+INDB, isolated HSCR and control groups. As shown in Table I, no statistical differences were found for A432A and IVS1-126G→T, although a slight trend towards significance was observed for the latter ($p=0.019$). In contrast, a clearly different distribution was observed for the remaining variants among the various groups (Table I). Worth noting were the results obtained for the two cSNPs, G691S and L769L. In the case of G691S, no S691 alleles were detected in the HSCR+INDB group, which resulted in a statistically significant difference when this group was compared to the isolated INDB group (two-tailed Fisher's exact test, $p=0.0001280$), the isolated HSCR group ($\chi^2=7.36$, $p=0.0066747$) and the controls ($\chi^2=15.42$, $p=0.0000863$) (Table II). However, the significance obtained for L769L was due to the evident overrepresentation of this polymorphism in HSCR patients, as had been previously reported. Apart from this, we only found a trend towards overrepresentation of homozygous INDB patients for the L769L variant, which led to a different genotypic distribution after comparative analysis of this group with HSCR+INDB patients ($\chi^2=6.63$,

Table I. Analysis of the distribution of the *RET* variants in the different groups.

IVS1+9277T→C (rs2435357)	Allele T	Allele C
INDB	10	36
HSCR+INDB	36	18
HSCR	66	52
Controls	33	165
	$\chi^2=79.49$, $p<10^{-8}$ ←	
IVS1-1370C→T (rs2505532)	Allele C	Allele T
INDB	33	13
HSCR+INDB	49	5
HSCR	94	24
Controls	104	94
	$\chi^2=41.73$, $p<10^{-8}$ ←	
IVS1-126G→T (rs2505532)	Allele G	Allele T
INDB	26	20
HSCR+INDB	41	13
HSCR	91	27
Controls	128	70
	$\chi^2=9.89$, $p=0.019$	
A432A (rs1800860)	Allele G	Allele A
INDB	28	18
HSCR+INDB	49	11
HSCR	91	27
Controls	140	58
	$\chi^2=9.89$, $p=0.064$	
G691S (rs1799939)	Allele C	Allele A
INDB	36	10
HSCR+INDB	60	0
HSCR	102	16
Controls	152	46
	$\chi^2=9.89$, $p=0.00023$ ←	
L769L (rs1800861)	Allele T	Allele G
INDB	36	10
HSCR+INDB	37	23
HSCR	86	32
Controls	171	27
	$\chi^2=19.32$, $p=0.00023$ ←	
IVS19+47C→T (rs2075912)	Allele C	Allele T
INDB	39	7
HSCR+INDB	37	21
HSCR	ND	ND
Controls	183	17
	$\chi^2=27.38$, $p<1.15 \times 10^{-6}$ ←	

$p=0.03636496$) or with controls ($\chi^2=8.77$, $p=0.01244654$) (unpublished data). Such significant differences, however, were not observed for the allelic distribution. In contrast, both the genotypic and allelic distribution of L769L was significantly different in HSCR+INDB patients versus controls. In order to analyze these results, we proceeded to

Table II. Allelic distribution and frequency of the RET variants in the different groups of study by comparing them two by two.

RET variant		INDB vs. HSCR+INDB (%)		INDB vs. HSCR (%)		INDB vs. controls (%)		HSCR+INDB vs. HSCR (%)		HSCR+INDB vs. controls (%)	
IVS1+9277T→C (rs2435357)	T	10 (21.7)	36 (66.7)	10 (21.7)	66 (55.93)	10 (21.7)	33 (16.67)	36 (66.7)	66 (55.93)	36 (66.7)	33 (16.67)
	C	36 (78.3)	18 (33.3)	36 (78.3)	52 (44.07)	36 (78.3)	165 (83.33)	18 (33.3)	52 (44.07)	18 (33.3)	165 (83.33)
		$\chi^2=18.42, p=0.0000177\leftarrow$		$\chi^2=14.22, p=0.0001629\leftarrow$		$\chi^2=0.36, p=0.5494458$		$\chi^2=1.35, p=0.2449396$		$\chi^2=50.86, p<10^{-8}\leftarrow$	
IVS1-1370C→T (rs2505532)	C	33 (71.7)	49 (91.7)	33 (71.7)	94 (79.7)	33 (71.7)	104 (52.5)	49 (91.7)	94 (79.7)	49 (91.7)	104 (52.5)
	T	13 (28.3)	5 (8.3)	13 (28.3)	24 (20.3)	13 (28.3)	94 (47.5)	5 (8.3)	24 (20.3)	5 (8.3)	94 (47.5)
		$\chi^2=4.86, p=0.0275308$		$\chi^2=0.78, p=0.3775462$		$\chi^2=4.84, p=0.0277484$		$\chi^2=2.50, p=0.1136957$		$\chi^2=24.40, p=0.0000008\leftarrow$	
IVS1-126G→T (rs2565206)	G	26 (56.5)	41 (76.7)	26 (56.5)	91 (77.1)	26 (56.5)	128 (64.7)	41 (76.7)	91 (77.1)	41 (76.7)	128 (64.7)
	T	20 (43.5)	13 (23.3)	20 (43.5)	27 (22.9)	20 (43.5)	70 (35.3)	13 (23.3)	27 (22.9)	13 (23.3)	70 (35.3)
		$\chi^2=3.40, p=0.0652743$		$\chi^2=5.90, p=0.0151657$		$\chi^2=0.74, p=0.3902346$		$\chi^2=0, p=0.9819610$		$\chi^2=1.96, p=0.1615287$	
A432A (c.1296G→A, rs1800860)	G	28 (60.9)	49 (81.7)	28 (60.9)	91 (77.1)	28 (60.9)	140 (70.7)	49 (81.7)	91 (77.1)	49 (81.7)	140 (70.7)
	A	18 (39.1)	11 (19.3)	18 (39.1)	27 (22.9)	18 (39.1)	58 (29.3)	11 (19.3)	27 (22.9)	11 (19.3)	58 (29.3)
		$\chi^2=4.67, p=0.0307196$		$\chi^2=3.61, p=0.0573925$		$\chi^2=1.26, p=0.2622249$		$\chi^2=0.26, p=0.6124942$		$\chi^2=2.29, p=0.1300981$	
G691S (c.2071C→A, rs1799939)	C	36 (78.3)	60 (100)	36 (78.3)	102 (86.4)	36 (78.3)	152 (76.8)	60 (100)	102 (86.4)	60 (100)	152 (76.8)
	A	10 (21.7)	0 (0)	10 (21.7)	16 (13.6)	10 (21.7)	46 (23.2)	0 (0)	16 (13.6)	0 (0)	46 (23.2)
		<i>Fisher's p=0.0001280\leftarrow</i>		$\chi^2=1.10, p=0.2935013$		$\chi^2=0.0, p=0.9821827$		$\chi^2=7.36, p=0.0066747\leftarrow$		$\chi^2=15.42, p=0.0000863\leftarrow$	
L769L (c.2307T→G, rs1800861)	T	36 (78.3)	37 (61.7)	36 (78.3)	86 (72.9)	36 (78.3)	171 (86.4)	37 (61.7)	86 (72.9)	37 (61.7)	171 (86.4)
	G	10 (21.7)	23 (38.3)	10 (21.7)	32 (27.1)	10 (21.7)	27 (13.6)	23 (38.3)	32 (27.1)	23 (38.3)	27 (13.6)
		$\chi^2=2.61, p=0.1058582$		$\chi^2=0.26, p=0.6100954$		$\chi^2=1.29, p=0.2492932$		$\chi^2=1.85, p=0.1741177$		$\chi^2=16.43, p=0.0000505\leftarrow$	
IVS19+47C→T (rs 2075912)	C	39 (84.8)	37 (63.8)	39 (84.8)	ND	39 (84.8)	183 (91.5)	37 (63.8)	ND	37 (63.8)	183 (91.5)
	T	7 (15.2)	21 (36.2)	7 (15.2)	ND	7 (15.2)	17 (8.5)	21 (36.2)	ND	21 (36.2)	17 (8.5)
		$\chi^2=4.73, p=0.0296893$		ND		Fisher's p=0.1730269		ND		$\chi^2=25.32, p=0.0000005\leftarrow$	

construct haplotypes comprising the three cSNPs as previously described (haplotypes A to L) (12). No significant differences were observed after comparing the general haplotypic distribution of INDB patients and controls ($\chi^2=7.28$ with six degrees of freedom, $p=0.29554021$) or HSCR+INDB patients and isolated HSCR ($\chi^2=4.70$ with six degrees of freedom, $p=0.58278287$). In contrast, haplotypic distribution was statistically different when analyzing INDB versus HSCR ($\chi^2=22.23$ with six degrees of freedom, $p=0.00109942$), INDB versus HSCR+ INDB ($\chi^2=22.57$ with six degrees of freedom, $p=0.00095533$) and HSCR+INDB versus controls ($\chi^2=59.75$ with six degrees of freedom, $p<10^{-8}$).

With respect to the intronic variants, with the exception of IVS1-126G→T, in general the distribution of the variants was different in INDB compared to HSCR or HSCR+INDB and in HSCR+ INDB compared to the controls, but did not show statistical significance when INDB was compared to the controls or HSCR+INDB was compared to HSCR (Table II). Analysis of haplotypes comprising the four variants within intron 1 (haplotypes 0-4) (6) confirmed the differences observed with the independent analysis of each of the variants. In this way, while haplotype 0 (IVS1-9277T, IVS1-1463T IVS1-1370C IVS1-126G) is the most frequently occurring haplotype in both the HSCR and HSCR+INDB groups, haplotype 1 (IVS1-9277C, IVS1-1463C IVS1-1370T IVS1-126G) is the most prevalent in controls, and haplotype 2 (IVS1-9277C, IVS1-1463C IVS1-1370C IVS1-126T) is the most common among INDB patients.

Discussion

Even today, the pathogenesis of INDB is not completely understood and its etiology remains unknown, although several pieces of evidence support a genetic basis for it. As both HSCR and INDB are neurocristopathies causing developmental and functional defects of the ENS, and as the INDB phenotype has been reported in a percentage of patients affected with HSCR, it is reasonable to consider *RET*, which is the major gene affecting HSCR, to be a good candidate gene for INDB as well. From our results, we identified three *RET* germline mutations in the 30 HSCR+INDB patients, resulting in a mutation frequency of 10% for this group. Of note, this value of frequency is the same as that reported by our group for sporadic patients presenting with isolated HSCR (10), suggesting that such *RET* mutations are indeed involved in the manifestation of the HSCR phenotype.

Perhaps a more likely candidate for debate is the finding of an R982C in an isolated INDB patient, first described by Mulligan *et al* (15) in a family with both multiple endocrine neoplasia type 2 A and HSCR, in which a mutation in codon 618 co-segregated with the phenotype. Since in the original study the mutation was also discovered in 3 of 142 control chromosomes, it was regarded as a rare polymorphism rather than as a pathogenic mutation. The biological impact of R982C has been investigated *in vitro* by introducing it into the RET/PTC2 chimeric oncogene, which is capable of transforming NIH3T3 mouse fibroblasts and of differentiating pC12 rat pheochromocytoma cells. In this system, this mutation did not alter the transforming capability of RET/PTC2 or tyrosine phosphorylation (17). However, it is still fair to postulate that

the introduction of a new cysteine residue in the receptor RET could affect its final folding by the generation of alternative disulfide bonds, and might consequently hamper either the correct transport to the membrane or the mechanisms that trigger the pathways playing a key role in ENS development. According to this hypothesis, *in silico* predictions suggest that the distribution of disulfide bonds might be absolutely different in the mutant protein with respect to the wild-type. Finally and alternatively, as previously proposed, the possibility remains that the C982 allele increases the risk of developing ENS alterations by interfering with RET expression rather than with RET function (18). Nevertheless, the presence of the variant in unaffected individuals leads us to conclude that the role played by R982C in the pathogenesis of INDB, if any, would be minor and an insufficient explanation of the phenotype.

With regard to the analysis of the distribution of *RET* variants/haplotypes in the different groups of patients, several conclusions can be drawn. First of all, the similarities in frequencies and distribution of almost all the *RET* variants analyzed in HSCR+INDB and in isolated HSCR patients indicates that the groups are not essentially different. Moreover, the same associations of specific *RET* polymorphisms to HSCR+INDB observed in comparison with normal controls have been previously reported for our series of isolated HSCR (6,11). This indicates that, in those particular cases, the pathologic changes suggestive of INDB may be a secondary phenomenon induced by the same mechanisms leading to HSCR, but probably modulated by a combination of other genetic modifiers. The only variant with a different distribution in the two groups of patients is G691S (c.2071C→A), which has been found to be absolutely absent in HSCR+INDB. Notably, this variant was underrepresented in HSCR cases versus normal controls in previous studies (11), suggesting that the S691 allele might protect against the development of HSCR in a low penetrance manner. In addition, the present results make the case for a predisposition role of the G691 allele by causing a tendency towards the appearance of IND exclusively in the presence of HSCR. The collective data thus strengthen a functional role for *RET* G691S or for another variant in linkage disequilibrium with it in the development of ENS disturbances. Such a hypothesis, although very suggestive, needs to be carefully tested by an appropriate experimental strategy.

From the comparative analysis of isolated INDB versus the controls, we can deduce that the *RET* locus c.2307 (p.769) may be related to this phenotype. It is puzzling that, while the allelic distribution in INDB and the controls is not statistically different, the genotypic distribution at this locus shows a trend to significance of $p=0.01$. From previous analyses, we know that L769L and the coding haplotypes of which it is comprised were also overrepresented in our series of HSCR patients in comparison with the normal population (11,12). A detailed examination of the raw data reveals that such significance is due to an excess of homozygous individuals for the G allele in cases versus controls. More specifically, we detected homozygosity for the G allele in 3 out of the 7 cases carrying this allele (42.85%) and in 4 out of 19 control individuals (21.05%). It is thus plausible that the 2307G allele may exert a subtle effect on the manifestation of the INDB phenotype,

its presence being necessary in homozygosity, probably in combination with other variants not tested in this study.

L769L and IVS1-1370C→T are the only HSCR-associated variants whose comparative analysis in INDB patients versus isolated HSCR does not show significant differences. Besides these, the remaining *RET* polymorphisms whose association to HSCR has been previously reported (IVS1+9277T→C, IVS1-1463T→C, IVS1-126G→T, IVS19+47C→T) showed a statistically different genotypic and allelic distribution between the two groups, as occurs when comparing HSCR to the controls. This fact leads us to our third and last conclusion, that both pathologies seem to be caused by different molecular events.

In summary, we evidenced the possible involvement of the *RET* proto-oncogene in the pathogenesis of INDB, although by molecular mechanisms different from those leading to HSCR. Further investigation is warranted to elucidate the precise mechanisms behind INDB, and to clarify its genetic nature .

Acknowledgements

We would like to thank all the patients who participated in this study. The study was funded by Fondo de Investigación Sanitaria, Spain (PI070070 and PI071315 for the E-Rare project) and Consejería de Innovación Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (CTS2590). R.M.F and M.R.-F. are postdoctoral researchers of CIBERER, which is an initiative of the ISCIII. A.S.-M. is a doctoral fellow of the Fondo de Investigación Sanitaria.

References

1. Meier-Ruge W: Ueber ein Erkrankungsblid des Colon mit Hirschsprung Symptomatik. *Verh Dtsch Ges Pathol* 59: 506-510, 1971.
2. Fadda B, Maier WA, Meier-Ruge W, Schärli A and Daum R: Neuronal intestinal dysplasia. Critical 10-years' analysis of clinical and biopsy diagnosis. *Z Kinderchir* 38: 305-311, 1983.
3. Meier-Ruge WA, Bruder E and Kapur RP: Intestinal neuronal dysplasia type B: one giant ganglion is not good enough. *Pediatr Dev Pathol* 9: 444-452, 2006.
4. Puri P and Rolle U: Variant Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg* 13: 293-299, 2004.
5. Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, *et al*: Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet* 45: 1-14, 2008.
6. Emison ES, McCallion AS, Kashuk CS, *et al*: A common sex-dependent mutation in a *RET* enhancer underlies Hirschsprung disease risk. *Nature* 434: 857-863, 2005.
7. Fernandez RM, Boru G, Peciña A, *et al*: Ancestral *RET* haplotype associated with Hirschsprung's disease shows linkage disequilibrium breakpoint at -1249. *J Med Genet* 42: 322-327, 2005.
8. Barone V, Weber D, Luo Y, Brancolini V, Devoto M and Romeo G: Exclusion of linkage between *RET* and neuronal intestinal dysplasia type B. *Am J Med Genet* 62: 195-198, 1996.
9. Gath R, Goessling A, Keller KM, *et al*: Analysis of the *RET*, *GDNF*, *EDN3*, and *EDNRB* genes in patients with intestinal neuronal dysplasia and Hirschsprung disease. *Gut* 48: 671-675, 2001.
10. Ruiz-Ferrer M, Fernandez RM, Antiñolo G, López-Alonso M, Eng C and Borrego S: A complex additive model of inheritance for HSCR is supported by both *RET* mutations and predisposing *RET* haplotypes. *Genet Med* 8: 704-710, 2006.
11. Borrego S, Sáez ME, Ruiz A, *et al*: Specific polymorphisms in the *RET* proto-oncogene are over-represented in patients with Hirschsprung disease and may represent loci modifying phenotypic expression. *J Med Genet* 36: 771-774, 1999.
12. Borrego S, Ruiz A, Saez ME, *et al*: *RET* genotypes comprising specific haplotypes of polymorphic variants predispose to isolated Hirschsprung disease. *J Med Genet* 37: 572-578, 2000.
13. Lesueur F, Corbex M, McKay JD, *et al*: Specific haplotypes of the *RET* proto-oncogene are over-represented in patients with sporadic papillary thyroid carcinoma. *J Med Genet* 39: 260-265, 2002.
14. McWhinney SR, Boru G, Binkley PK, *et al*: Intronic single nucleotide polymorphisms in the *RET* protooncogene are associated with a subset of apparently sporadic pheochromocytoma and may modulate age of onset. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 4911-4916, 2003.
15. Mulligan LM, Eng C, Attié T, *et al*: Diverse phenotypes associated with exon 10 mutations of the *RET* proto-oncogene. *Hum Mol Genet* 3: 2163-2167, 1994.
16. Wu TT, Tsai TW, Chu CT, *et al*: Low *RET* mutation frequency and polymorphism analysis of the *RET* and *EDNRB* genes in patients with Hirschsprung disease in Taiwan. *J Hum Genet* 50, 168-174, 2005.
17. Pasini B, Borrello MG, Greco A, *et al*: Loss of function effect of *RET* mutations causing Hirschsprung disease. *Nat Genet* 10: 35-40, 1995.
18. Sancandi M, Ceccherini I, Costa M, *et al*: Incidence of *RET* mutations in patients with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 35: 139-142, 2000.

A Novel Point Variant in *NTRK3*, R645C, Suggests a Role of this Gene in the Pathogenesis of Hirschsprung Disease

R. M. Fernández^{1,2}, A. Sánchez-Mejías^{1,2}, M. D. Mena^{1,2}, M. Ruiz-Ferrer^{1,2}, M. López-Alonso^{2,3}, G. Antiñolo^{1,2} and S. Borrego^{1,2,*}

¹Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción, y Medicina Fetal. Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Seville, Spain

²CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Seville, Spain

³Servicio de Cirugía Infantil, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Seville, Spain

Summary

Hirschsprung disease (HSCR) is a developmental disorder characterized by the absence of ganglion cells in the myenteric and submucosal plexuses due to a defect in the migration process of neural crest neuroblasts. Manifestation of the disease has been linked to the dysfunction of two principal signalling pathways involved in the enteric nervous system (ENS) formation: the RET-GDNF and the EDN3-EDNRB receptor systems. However, the NTF3/NTRK3 signalling pathway plays an essential role in the development of the ENS suggesting a potential role for those genes in the pathogenesis of HSCR. We have sought to evaluate the candidature of the *NTRK3* gene, which encodes the TrkC receptor, as a susceptibility gene for Hirschsprung disease. Using dHPLC technology we have screened the *NTRK3* coding region in 143 Spanish HSCR patients. A total of four previously described polymorphisms and 12 novel sequence variants were detected. Of note, the novel R645C mutation was detected in 2 affected siblings of a HSCR family also carrying a *RET* splicing mutation. Using bioinformatics tools we observed that the presence of an additional cysteine residue might implicate structural alterations in the mutated protein. We propose haploinsufficiency as the most probable mechanism for the *NTRK3* R645C mutation. *NTRK3* and *RET* mutations in this family only appear together in the HSCR patients, suggesting that they per se are necessary but not sufficient to produce the phenotype. In addition, it is quite probable that the contribution of other still unidentified modifier genes, may be responsible for the different phenotypes (length of aganglionosis) in the two affected members.

Keywords: *NTRK3*, Hirschsprung disease, mutational screening, complex disease, *RET* proto-oncogene

Introduction

Hirschsprung disease or aganglionic megacolon (HSCR, OMIM 142623) is a developmental disorder of variable penetrance and expressivity, showing male predominance and an incidence of 1/5000 newborn human infants (Chakravarti & Lyonnet, 2002; Amiel et al. 2008). It is characterized by the absence of intramural ganglion cells in the myenteric and submucosal plexuses along a variable portion of the distal intestine. The most widely accepted etiopathogenetic hypothesis for HSCR is based on a defect of craniocaudal migration of

neuroblasts originating from the neural crest that, under normal circumstances, reach the small intestine in the 7th week of gestation and the rectum in the 12th week (Okamoto & Ueda 1967). The clinical forms with variable extension of the aganglionic segment could be interpreted as interruptions of the migration process in different gestational periods: the earlier is the migration arrest, the longer is the distal aganglionic intestinal portion. Therefore, HSCR phenotype can be classified into 2 main groups: short segment forms (S-HSCR), which includes patients with aganglionosis as far as the splenic flexure, and long segment forms (L-HSCR), in which aganglionosis extends beyond there. Approximately 20% of HSCR cases are familial, with a recurrence risk for sibs of affected patients increasing together with the length of the portion affected (Chakravarti & Lyonnet, 2002).

HSCR is the paradigm of complex disease, frequently related to the dysfunction of two principal signalling pathways involved in the enteric nervous system (ENS)

*Corresponding author: Salud Borrego, M.D., Ph.D., Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Hospital de la Mujer 4 planta centro, Avda. Manuel Siurot s/n, 41013 Seville, Spain. Tel: +34 955 012780; Fax: +34 955 013473. E-mail: salud.borrego.sspa@juntadeandalucia.es

formation during embryogenesis: the RET-GDNF and the EDN3-EDNRB receptor systems. Genetic mapping in families and mutational screening of candidate genes, together with the study of several natural and knockout animal models, have clearly shown the involvement of multiple genes in the pathogenesis of HSCR, such as *RET*, *GDNF*, *NRTN*, *EDN3*, *EDNRB*, *ECE1*, *SOX10*, *SIP1*, *PHOX2B* and *KIAA1279* (Chakravarti & Lyonnet, 2002; Amiel et al. 2008). Of these, the *RET* proto-oncogene is the major gene involved in the disease, with classical coding hypomorphic mutations accounting for 50% of familial cases and 7–35% of sporadic cases (Chakravarti & Lyonnet, 2002), and a common variant within a transcriptional enhancer of its intron 1 which seems to have a prominent role for a great proportion of sporadic cases (Emison et al. 2005). In addition, various genomic association and linkage studies have recently pointed to the existence of HSCR susceptibility loci, probably acting as *RET* modifiers, in 9q31 (Bolk et al. 2000), 3p21, 19q12 (Gabriel et al. 2002), 4q31.3–q32.3 (Brooks et al. 2006), 13q22, 16q23 (Carrasquillo et al. 2002) and 21q21 (Lin et al. 2004), although the exact genes related to the disease within these genomic regions remain to be discovered. In summary, the manifestation of HSCR seems to depend on the contribution of different combinations of genes acting in additive or multiplicative fashion, which modulate penetrance, pleiotropy or expressivity of the disease in affected individuals.

Because of its etiopathogenesis it remains tempting to speculate that additional signalling pathways implicated in intestinal neurodevelopment apart from RET-GDNF or EDN3-EDNRB, could also be involved in HSCR. In this way, it has been widely shown that NTF-3/NTRK3 signalling has an essential role in the proper development of the ENS. Studies of the biological actions of neurotrophin 3 (NTF-3) on enteric neuronal precursors *in vitro* demonstrate that it directly acts *via* its transducing tyrosine kinase receptor, NTRK3 (also known as TrkC), on the precursor cells and that in combination with other neurotrophic factors such as GDNF and CNF, promotes the survival and differentiation of enteric neurons and glia (Chalazonitis, 1996). Analyses performed on mice have shown that there is loss of neurons in both the myenteric and submucosal plexuses of mice lacking NTF-3/NTRK3 signalling and selective hyperplasia in the myenteric plexus of mice overexpressing NTF-3 (Chalazonitis, 2004). Moreover, analysis of the localization of neurotrophins and their receptors in developing and postnatal human intestine, both in normal individuals and in HSCR patients, revealed that NTRK3 is localized with cellular specificity to the ENS of normal and proximal ganglionic HSCR intestine, but was not detected in the hypertrophic nerve fibers of aganglionic HSCR segments (Hoehner et al. 1996). In addition, NTF-3, localized to the enteric plexuses and basal lamina of the ganglionic intestine,

was not detected in ganglion cells located at the 'transitional zone' of HSCR intestine (Hoehner et al. 1996).

In summary, our data suggest that genes involved in the NTF-3/NTRK3 signalling may play a role in the pathogenesis of HSCR. In fact, we previously found an *NTF-3* mutation related to HSCR in two independent cases (Ruiz-Ferrer et al. 2008). Therefore, in the present study we have sought to evaluate the candidature of the *NTRK3* gene as a susceptibility gene for Hirschsprung disease.

Materials and Methods

Patients and Control Subjects

In this study, we have included a total of 134 index cases (124 sporadic cases plus 10 familial cases) and 9 affected relatives. In order to define the exact HSCR phenotype in our patients, we have used the criteria recommended by Chakravarti & Lyonnet, 2002. Following these criteria, 96 cases were catalogued as short-segment HSCR (S-HSCR, 67%), 16 cases as long-segment (L-HSCR, 11%), and 9 cases presented with total colonic aganglionosis (TCA, 6%). Data were not available for the remaining 22 cases. All these patients had been previously tested for traditional *RET* coding mutations and for the enhancer mutation within its intron 1 (Fernandez et al. 2005; Ruiz-Ferrer et al. 2006).

In addition, we have also analyzed a group of 150 normal controls comprising unselected, unrelated, race-, age-, and sex-matched individuals. All of them were healthy voluntary donors, who came to the Hospital for other reasons and did not present any symptom suggestive of HSCR.

An informed consent was obtained from all the participants for clinical and molecular genetic studies. The study conformed to the tenets of the declaration of Helsinki.

PCR and dHPLC Analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes from patients, their parents and siblings when available, as well as from the healthy controls, using standard protocols (Dracopoli et al. 1994). Nineteen pairs of primers were designed for the mutation screening of the *NTRK3* coding region and the intron/exon boundaries (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Primers and PCR conditions are available on request.

The dHPLC analyses were carried out on an automated HPLC device equipped with a DNA separation column using the WAVE DNA Fragment Analysis system (Transgenomic, Omaha, NE, USA). PCR products were denatured for 3 min at 95°C and then gradually reannealed by decreasing sample temperature from 95°C to 65°C over a period of 30 min. Five μ l of PCR products were then injected onto the DNASEq cartridge and eluted at a constant flow rate of 0.9 ml/minute

through a linear acetonitrile gradient. DNA fragments were detected by the system's UV detector and analyzed as chromatograms. Oven temperature for optimal heteroduplex separation under partial DNA denaturation was determined for each amplicon using the WAVEMarker software.

In addition, those exons with an aberrant wave profile were also screened by dHPLC analysis in a group of 150 normal controls, in order to evaluate the putative pathogenicity of the sequence variant underlying such a profile.

Sequence Analysis

Those samples with aberrant wave profiles were subjected to sequence analysis. PCR products were purified by shrimp alkaline phosphatase and exonuclease I treatment, using the ExoSap-IT[®] PCR purification kit (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) according to the manufacturer's recommendations. Purified products were subsequently used for direct DNA-sequencing analysis by using an ABI PRISM Big Dye Terminator, Ver. 3.1, cycle sequencer and an automated sequencer ABI 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The alignment of our results with the sequences provided for *NTRK3* GenBank accession number NM_001012338 (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) was carried out using the software SeqScape Ver. 2.5 (Applied Biosystems).

Bioinformatic Tools

Genomic, transcript and protein sequences of *NTRK3* as well as information on the reported mutations and polymorphisms, were accessed through the UCSC human genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>), the National Centre for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), and the Ensembl database (<http://www.ensembl.org/>).

The *NTRK3* protein sequence was submitted to ScanProsite (<http://expasy.org/tools/scanprosite/>) to scan for the occurrence of patterns, profiles and rules or motifs stored in the PROSITE database (Castro et al. 2006).

In order to predict the putative pathogenic role of the changes at the protein sequence level, we selected both SIFT and Polyphen tools. SIFT (<http://blocks.fhrc.org/sift/SIFT.html>) predicts whether an amino acid substitution affects protein function based on sequence homology and the physical properties of amino acids (Ng & Heinikoff, 2002). Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) estimates possible impact of an amino acid change on the structure and function of a human protein, using straightforward physical and comparative considerations (Ramensky et al. 2002).

We also used DiANNA to analyze the potential impact of the inclusion of new cysteines in the protein sequence, since this biotool can predict whether a particular cysteine is reduced, is forming a disulfide bond, or is bound to a metallic ligand (Ferre & Clote, 2005).

Finally novel variants located within the non-coding region were submitted to several splice site and transcription factor binding sequence prediction interfaces such as http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html, http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html and <http://www.ebi.ac.uk/asd-srv/wb.cgi>.

Results

We have analysed the coding region of *NTRK3* in 143 Spanish HSCR patients using dHPLC technology. A total of 16 aberrant wave profiles were detected and subsequent direct sequence analysis revealed 4 previously described polymorphisms and 12 novel sequence variants. Among the previously described variants, 3 were quite common polymorphisms (Haga et al. 2002), 2 of them being located in the coding region, such as N191N (exon 4, rs1128994) and A496A (exon 12, rs2229910), while the third was localized in intron 18, IVS18 + 38G>A (rs1560975). The fourth variant previously reported consisted in a rare polymorphism, N226N (exon 5, rs1863480) that was found in only one patient, in contrast with the other 3 which were present in heterozygosity in at least one third of the patients. These results are concordant with those previously found in the German population (Gimm et al. 2001).

More interesting was the finding of 12 sequence variations never previously reported. Especially worth of note was the detection of a missense substitution in exon 14 of the gene, namely c.1933 C>T (p.R645C). Analysis of the protein sequence using the ScanProsite tool (<http://expasy.org/tools/scanprosite/>), showed that this variant localizes within the tyrosine kinase domain of the protein. The change was observed in both affected siblings of an HSCR family, who presented with aganglionosis extending to the descending colon and to the ileum respectively. Inspection showed that this variant had been inherited from their unaffected father, also appearing in another 2 healthy relatives, although it was found to be absent in 300 control chromosomes tested. This pedigree is particularly interesting since both HSCR patients also carry a *RET* mutation inherited from their unaffected mother, IVS6 + 2T>A (Fig. 1) (Ruiz-Ferrer et al. 2006). Therefore, the two affected individuals are the only family members in which the co-occurrence of *RET* and *NTRK3* mutations was observed. In order to preliminarily examine the potential pathogenicity of the *NTRK3* R645C mutation, we used both Polyphen and SIFT tools, but both programs predicted a benign effect of the variant, based on the non-conserved status of the

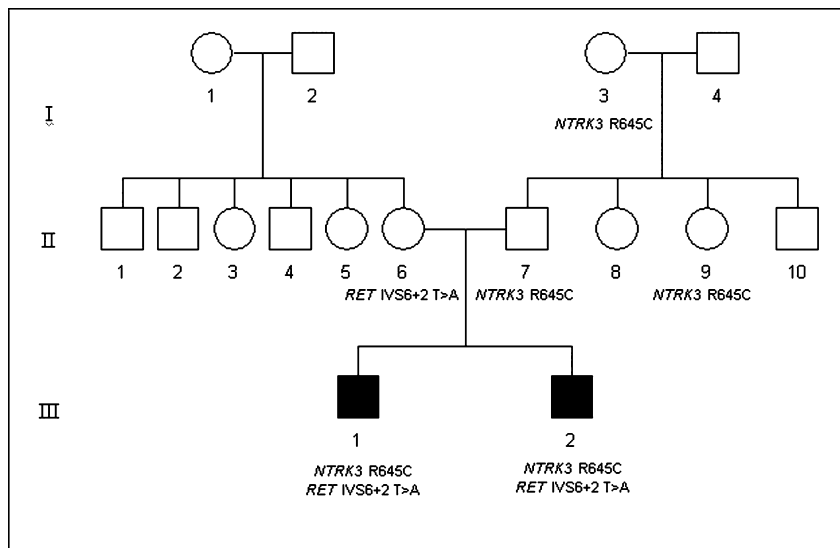


Figure 1 Pedigree of the HSCR family carrying both a *NTRK3* and a *RET* mutation.

sequence among different species in that particular region. However, it is tempting to speculate that the inclusion of a new cysteine residue in the protein sequence may implicate a change in the three-dimensional structure of the protein by means of the formation of new disulfide bonds. Unfortunately, the complete 3D structure of the protein has not been solved yet, but using DiANNA we tried to predict the cysteine states of both wildtype and mutant *NTRK3*. After running this program for the two proteins, we could observe that the presence of an additional cysteine residue at position 645 might not only implicate the formation of a new disulfide bond between this residue and C607, but could also lead to the destruction/generation of different bonds with respect to the wildtype protein (Fig. 2).

We also found 2 silent changes in exon 6 (c.802T>C, L268L), and exon 12 (c.1665C>T, A555A), present in a sporadic case and in two affected members of a family respectively, and absent in controls. A deletion of 3 nucleotides (IVS10-21delTCC) was detected in 4 sporadic HSCR cases, although it was also found in 1 of the 300 control chromosomes tested. All the remaining changes consisted of intronic nucleotide substitutions IVS2-25C>T, IVS3 + 41G>T, IVS4 + 33A>G, IVS10 + 57T>C, IVS12 + 12G>A, IVS14-37G>C, IVS15 + 44C>T and IVS16 + 97C>G. Those variants were absent in 300 normal control chromosomes except for IVS12 + 12 G>A and IVS14-37 G>C, which appeared in heterozygosity in 1% and 2% of the control alleles.

Because both the silent changes and intronic variants generate no variation at the protein sequence level, it was more probable that their pathogenic mechanism, if any, would affect transcript stability, RNA splicing or DNA-protein binding. Thus, as a first approach, those variants were submitted to several Splice Sites

and Transcription Factors Binding sequences prediction interfaces (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html; http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html; <http://www.ebi.ac.uk/asd-srv/wb.cgi>). As a result, three of these variants (IVS2-25C>T, IVS10-21delTCC and IVS14-37G>C) were predicted to be located within the Polypyrimidine Tract (PPT), a polypyrimidine-rich region just upstream of the 3' end of each of the intron sequences, present in higher eukaryotes and implicated in the correct maturation of the mRNA. It would be plausible that these sequence variants could introduce a topological change in the pre-mRNA so that incorrect splice sites were joined, resulting in exon skipping and the loss of an exon from the mature mRNA, which would generate an aberrant protein. To test *in vitro* the possible splicing effect of all the intronic variants, we performed both fluorescent PCR and sequencing of the cDNA of the patients carrying them. More specifically, for the variants IVS2-25C>T, IVS3 + 41G>T and IVS4 + 33A>G, we used primers of exons 1 and 4, which theoretically would give a product of 408 bp. Regarding IVS10-21delTCC, IVS10 + 57T>C, IVS12 + 12G>A, IVS14-37G>C, IVS15 + 44C>T and IVS16 + 97C>G, we selected primers on exons 8-9 and 16, that would generate a 1002 bp amplicon (conditions are available on request). However, no alternative products were detected in the presence of any of the variants, neither by the fragment analysis after the fluorescent PCR, nor by the sequencing procedure.

Discussion

Complex traits such as Hirschsprung disease constitute a growing field of interest in investigation in

DiANNA 1.1 web server

Step 5: Weighted matching

Predicted bonds

6 - 164	MDVSLCPAKCS - QNFFNCSDIR
10 - 36	LCPAKCSFWRI - ACPANCVCSKT
32 - 45	GSVLACPANCV - KTEINCRPDD
38 - 189	PANCVCSKTEI - SQNLYCINADG
166 - 523	FFNCSDIRVM - RQGHNCHKPDT
207 - 443	MNISQCDLPEI - LAAFACVLLVV
231 - 284	NAVITCNGSGS - GFTLTCAIENV
320 - 607	LRLEHCIEFVV - KFYGCGDGDG
362 - 781	EISEGCLLFNK - ERPRVCPKEVY
557 - 685	VFLAECYNLSP - IATRNCIVGAN
768 - 792	TEVIECITQGR - DVHLGCWQREP

DiANNA 1.1 web server

Predicted bonds

6 - 164	MDVSLCPAKCS - QNFFNCSDIR
10 - 36	LCPAKCSFWRI - ACPANCVCSKT
38 - 45	PANCVCSKTEI - KTEINCRPDD
166 - 189	FFNCSDIRVM - SQNLYCINADG
207 - 320	MNISQCDLPEI - LRLEHCIEFVV
231 - 284	NAVITCNGSGS - GFTLTCAIENV
362 - 781	EISEGCLLFNK - ERPRVCPKEVY
443 - 523	LAAFACVLLVV - RQGHNCHKPDT
557 - 685	VFLAECYNLSP - IATRNCIVGAN
607 - 645	KFYGCGDGDG - VDGQPCQAKGE
768 - 792	TEVIECITQGR - DVHLGCWQREP

Figure 2 DiANNA predictions for the wildtype A) and the mutant B) NTRK3 proteins. In red are highlighted the disulfide bonds that are predicted to be lost in the presence of the R645C mutation, while in green are indicated the new ones that would be generated.

medical genetics. These types of diseases, usually running in families but showing no classical Mendelian inheritance, are frequently under the genetic control of a few major genes, operating over a polygenic background and sometimes being subjected to major environmental determinants. In order to elucidate the nature of these complex traits, the current experimental approaches acquiring a major impact are the genome wide association/linkage analyses, which aim to identify genes/loci involved in the pathogenesis of the disease for a great proportion of the cases. In this way, these types of studies have led to the identification of specific genomic regions containing susceptibility loci for Hirschsprung disease in different series of patients, such as 10q11, 9q31, 3p21, 19q12, 4q31.3-q32.3, 13q22, 16q23 and 21q21 (Bolk et al. 2000; Carrasquillo et al. 2002; Gabriel et al. 2002; Lin et al. 2004; Brooks et al. 2006). Several lines of evidence suggest that the gene at 10q11 is *RET* (Bolk et al. 2000; Carrasquillo et al. 2002; Gabriel et al. 2002; Lin et al. 2004), and the one at 13q22 is *EDNRB* (Carrasquillo et al. 2002). However, it

is strikingly interesting to note that the rest of these genomic regions do not include any of the remaining genes already described as associated to either isolated or syndromic forms of HSCR (*GNDF*, *NTN*, *EDN3*, *ECE1*, *SOX10* or *PHOX2B*). Although related to only a minority of the cases, the involvement of these genes in the disease was discovered thanks to the use of a different approach, such as their evaluation as candidate genes based on their function, or the observation of animal phenotypes resembling HSCR. It is therefore evident that this kind of approach could reveal new genes responsible for some forms of the disease that would not be discovered with a typical large-scale genome association analysis. From this particular point of view, the involvement of NTF-3/NTRK3 signalling in ENS formation during embryogenesis (Chalazonitis, 1996), together with the evidence provided by murine models lacking or over-expressing NTF-3 (Chalazonitis, 2004), and the differential localization of the receptor in the ganglionic *versus* aganglionic region of HSCR intestine (Hoehner et al. 1996), provide strong arguments

to consider *NTRK3* as an excellent candidate gene for Hirschsprung disease. This prompted us to perform mutation screening of the coding region of the gene in our series of HSCR patients.

Among our results, we found several intronic variants present in our patients and absent in controls, which we hypothesized could be related to the disease by the generation of alternative spliced forms of the protein. The *in vitro* approaches, however, seemed to discard such a hypothesis although we cannot negate the possibility that an RNA decay phenomenon could be affecting our results. In this sense it might be plausible that the hypothetical aberrant RNA could present with a higher degradation rate than the normal RNA, so that the former could not be detected with our technical approach.

Perhaps the most relevant finding was the detection of the novel variant R645C within the tyrosine kinase domain of the protein, in a family with two affected siblings, also carrying a *RET* splicing mutation. It is largely known that binding of neurotrophins to Trk receptors leads to dimerization, phosphorylation of the receptors, recruitment of different adaptors and enzymes, and activation of several signalling pathways involved in cell survival or differentiation among other neuronal functions (Arevalo & Wu, 2006). We postulate that the introduction of a new cysteine residue in the receptor could affect its final folding by the generation of alternative disulfide bonds, and consequently may affect either the correct transport to the membrane or the mechanisms that trigger the pathways playing a key role in ENS development. In fact there are many diseases associated with misfolding of the involved proteins, especially when these proteins are located in the cytoplasmic membrane, such as in the case of cystic fibrosis or familial hypercholesterolemia. The physiological equilibrium between folding/misfolding in the cell can be easily perturbed by many factors such as small alterations in the nascent protein due to point mutations or environmental conditions that generate small perturbations in the intermediate states of the folding pathway. There is evidence in favour of the importance of temperature for the *in vivo* folding process implicated in Hirschsprung disease (Kjaer & Ibañez, 2003). These data together with the implication of amino acid variants affecting protein folding could explain why this amino acid 645 is conserved among vertebrates but there is not conservation among unrelated species. *In silico* predictions support the idea that the distribution of disulfide bonds might be quite different in the mutant protein with respect to the wildtype. For instance in the mutant, C645 might be bound to C607, while in the normal receptor C607 is predicted to bind to C320. It would therefore be plausible that R645C could inhibit the production of the correct mature protein form and its exposure on the cell membrane by interfering with the glycosylation process. In fact this same pathogenic mechanism has been proposed and functionally tested for some

RET mutations associated with HSCR (Angrist et al. 1996; Cosma et al. 1998). Alternatively, Phosphosite[®], a knowledgebase of information focused on protein phosphorylation (<http://www.phosphosite.org>), shows that some of the tyrosines susceptible of being phosphorylated, and consequently of triggering the corresponding pathways, are relatively close to amino acid 645 (Y705, Y709, Y710). So, the structural changes theoretically caused by the mutation may affect the access of the specific signalling effectors, thus altering the biological processes dependent on the correct functioning of the pathways.

Therefore, as occurs with *RET* mutations associated with HSCR, we would propose haploinsufficiency as the most probable mechanism for the *NTRK3* R645C mutation.

On the other hand, the segregation analysis of *NTRK3* and *RET* mutations in this particular pedigree, would fit with a recessive model of inheritance for the disease. The two mutations are independently present in other healthy members of the family, while they only appear together in the HSCR patients, suggesting that they are necessary but not sufficient to produce the phenotype. In fact, the same phenomenon has been observed for other HSCR genes previously reported such as *GDNF* or *NTN* (Angrist et al. 1996; Doray et al. 1998). So, while *RET* and *NTRK3* could be the major 'HSCR genes' for this family, it is quite probable that other modifier genes, as yet unidentified, may be responsible for the different phenotypes in the two affected members (S-HSCR *versus* TCA). Additional analyses are warranted in order to unravel the mechanisms leading to the different clinical forms in this family, and to assess the importance of the NTF-3/NTRK3 signalling pathway in enteric nervous system disorders.

Certainly, our results emphasize the need to continue with the investigation of other candidate genes for Hirschsprung, supporting again the complex nature of the disease.

Acknowledgements

We would like to thank all the patients who participated in the study as well as their families for their collaboration. This study was funded by Fondo de Investigación Sanitaria, Spain (PI070080 and PI071325) and Consejería de Innovación Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (CTS2590). RMF and MRF are postdoctoral fellows of CIBERER, ISCIII, Spain. ASM is a PhD student of the Fondo de Investigación Sanitaria.

References

- Amiel, J., Sproat-Emison, E., Garcia-Barcelo, M., Lantieri, F., Burzynski, G., Borrego, S., Pelet, A., Arnold, S., Miao, X., Griseri, P., Brooks, A. S., Antinolo, G., de Pontual, L., Clement-Ziza, M., Munnich, A., Kashuk, C., West, K., Wong, K. K., Lyonnet, S., Chakravarti, A., Tam, P. K., Ceccherini, I., Hofstra, R. M. & Fernandez, R. Hirschsprung Disease Consortium. (2008)

- Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet* **45**, 1–14.
- Angrist, M., Bolk, S., Halushka, M., Lapchak, P. A. & Chakravarti, A. (1996) Germline mutations in glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and RET in a Hirschsprung disease patient. *Nat Genet* **14**, 341–344.
- Arevalo, J. C. & Wu, S. H. (2006) Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci* **63**, 1523–1537.
- Bolk, S., Pelet, A., Hofstra, R. M., Angrist, M., Salomon, R., Croaker, D., Buys, C. H., Lyonnet, S. & Chakravarti, A. (2000) A human model for multigenic inheritance: phenotypic expression in Hirschsprung disease requires both the RET gene and a new 9q31 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 268–273.
- Brooks, A. S., Leegwater, P. A., Burzynski, G. M., Willems, P. J., de Graaf, B., van Langen, I., Heutink, P., Oostra, B. A., Hofstra, R. M. & Bertoli-Avella, A. M. (2006) A novel susceptibility locus for Hirschsprung's disease maps to 4q31.3–q32.3. *J Med Genet* **43**, e35.
- Carrasquillo, M. M., McCallion, A. S., Puffenberger, E. G., Kashuk, C. S., Nouri, N. & Chakravarti, A. (2002) Genome-wide association study and mouse model identify interaction between RET and EDNRB pathways in Hirschsprung disease. *Nat Genet* **32**, 237–244.
- Castro, E., Sigrist, C. J. A., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P. S., Gasteiger, E., Bairoch, A. & Hulo, N. (2006) ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res* **34**, W362–W365.
- Chakravarti, A. & Lyonnet, S. (2002) *Hirschsprung Disease. In The metabolic and molecular bases of inherited disease*, (ed. CS Scriver), pp. 6231–6255. New York: McGraw-Hill.
- Chalazonitis, A. (1996) Neurotrophin-3 as an essential signal for the developing nervous system. *Mol. Neurobiol.* **12**, 39–53.
- Chalazonitis, A. (2004) Neurotrophin-3 in the development of enteric nervous system. *Progress in Brain Research* **146**, chapter 16.
- Cosma, M. P., Cardone, M., Carlomagno, F. & Colantuoni, V. (1998) Mutations in the extracellular domain cause RET loss of function by a dominant negative mechanism. *Mol Cell Biol* **18**, 3321–3329.
- Doray, B., Salomon, R., Amiel, J., Pelet, A., Touraine, R., Billaud, M., Attie, T., Bachy, B., Munnich, A. & Lyonnet, S. (1998) Mutation of the RET ligand, neurturin, supports multigenic inheritance in Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* **7**, 1449–1452.
- Dracopoli, N. H., Haines, J. L., Korf, B. R., Moir, D. T., Morton, C. C., Seidman, C. E., Seidman, J. G. & Smith, D. R. (eds.) (1994) *Current protocols in Human Genetics*, New York: John Wiley and Sons.
- Emison, E. S., McCallion, A. S., Kashuk, C. S., Bush, R. T., Grice, E., Lin, S., Portnoy, M. E., Cutler, D. J., Green, E. D. & Chakravarti, A. (2005) A common sex-dependent mutation in a RET enhancer underlies Hirschsprung disease risk. *Nature* **434**, 857–863.
- Fernandez, R. M., Boru, G., Peciña, A., Jones, K., López-Alonso, M., Antiñolo, G., Borrego, S. & Eng, C. (2005) Ancestral RET haplotype associated with Hirschsprung's disease shows linkage disequilibrium breakpoint at -1249. *J Med Genet* **42**, 322–327.
- Ferre, F. & Clote, P. (2005) DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic Acids Res* **33**, W230–W232.
- Gabriel, S. B., Salomon, R., Pelet, A., Angrist, M., Amiel, J., Fornage, M., Attié-Bitach, T., Olson, J. M., Hofstra, R., Buys, C., Steffann, J., Munnich, A., Lyonnet, S. & Chakravarti, A. (2002) Segregation at three loci explains familial and population risk in Hirschsprung disease. *Nat Genet* **31**, 89–93.
- Gimm, O., Dziema, H., Brown, J., de la Puente, A., Hoang-Vu, C., Dralle, H., Plass, C. & Eng, C. (2001) Mutation analysis of NTRK2 and NTRK3, encoding two tyrosine kinases, in sporadic human medullary thyroid carcinoma reveals novel sequence variants. *Int J Cancer* **92**, 70–74.
- Haga, H., Yamada, R., Ohnishi, Y., Nakamura, Y. & Tanaka, T. (2002) Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium Genome Project: identification of 190 562 genetic variations in the human genome **47**, 605–610.
- Hoehner, J. C., Wester, T., Pahlman, S. & Olsen, L. (1996) Alterations in neurotrophin and neurotrophin-receptor localization in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* **31**, 1524–1529.
- Kjaer, S. & Ibáñez, C. F. (2003) Intrinsic susceptibility to misfolding of a hot-spot for Hirschsprung disease mutations in the ectodomain of RET. *Hum Mol Genet* **12**, 2133–2144.
- Lin, S., Chakravarti, A. & Cutler, D. J. (2004) Exhaustive allelic transmission disequilibrium tests as a new approach to genome-wide association studies. *Nat Genet* **36**, 1181–1188.
- Ng, P. C. & Heinikoff, S. (2002) Accounting for Human Polymorphisms Predicted to Affect Protein Function. *Genome Res* **12**, 436–446.
- Okamoto, E. & Ueda, T. (1967) Embryogenesis of intramural ganglia of the gut and its relation to Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* **2**, 437–443.
- Ramensky, V., Bork, P. & Sunyaev, S. (2002) Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* **30**, 3894–3900.
- Ruiz-Ferrer, M., Fernandez, R. M., Antiñolo, G., Lopez-Alonso, M., Eng, C. & Borrego, S. (2006) A complex additive model of inheritance for Hirschsprung disease is supported by both RET mutations and predisposing RET haplotypes. *Genet Med* **8**, 704–710.
- Ruiz-Ferrer, M., Fernandez, R. M., Antiñolo, G., Lopez-Alonso, M. & Borrego, S. (2008) NTF-3, a gene involved in the enteric nervous system development, is related to Hirschsprung disease. *J Pediatr Surg* **43**, 1308–11.

Received: 19 May 2008

Accepted: 21 July 2008



Contribution of RET, NTRK3 and EDN3 to the expression of Hirschsprung disease in a multiplex family

A Sánchez-Mejías, R M Fernández, M López-Alonso, et al.

J Med Genet 2009 46: 862-864 originally published online June 25, 2009
doi: 10.1136/jmg.2009.067819

Updated information and services can be found at:
<http://jmg.bmj.com/content/46/12/862.full.html>

	<i>These include:</i>
References	This article cites 15 articles, 3 of which can be accessed free at: http://jmg.bmj.com/content/46/12/862.full.html#ref-list-1
Email alerting service	Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Notes

To order reprints of this article go to:
<http://jmg.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to *Journal of Medical Genetics* go to:
<http://jmg.bmj.com/subscriptions>

Contribution of *RET*, *NTRK3* and *EDN3* to the expression of Hirschsprung disease in a multiplex family

A Sánchez-Mejías,^{1,2} R M Fernández,^{1,2} M López-Alonso,^{2,3} G Antiñolo,^{1,2} S Borrego^{1,2}

¹ Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain; ² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Seville, Spain; ³ Unidad de Gestión Clínica de Cirugía Infantil, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain

Correspondence to: Dr S Borrego, Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda Manuel Siurot s/n, 41013 Seville, Spain; salud.borrego.sspa@juntadeandalucia.es

Received 16 March 2009
Revised 19 May 2009
Accepted 1 June 2009
Published Online First
25 June 2009

ABSTRACT

Background: Hirschsprung disease (HSCR) is a developmental disorder caused by a defect in the neural crest neuroblast migration process. It is considered to be a paradigm of complex disorders, with many loci contributing to manifestation of the disease. Although HSCR commonly appears as a sporadic trait, ~20% of HSCR cases are familial, with complex patterns of inheritance.

Method: A multiplex HSCR family with an additive model of inheritance, in which the contribution of three genes (*RET*, *NTRK3*, *EDN3*) leads to the HSCR phenotype is reported.

Results and discussion: The findings suggest that both *RET* and *NTRK3* mutations acting together are necessary and sufficient for the appearance of the disease, and that the *EDN3* mutation is acting as a phenotype-modifier factor in the context of this family, as two different HSCR phenotypes are seen among the affected members: a short segment form, and a total colonic aganglionosis. The results therefore support the complex additive model of inheritance previously proposed for Hirschsprung disease.

Hirschsprung disease or aganglionic megacolon (HSCR, OMIM 142623) is a developmental disorder of variable penetrance and expressivity, male predominance, and an incidence of 1/5000 newborn human infants.^{1,2} It is characterised by the absence of intramural ganglion cells in the myenteric and submucosal plexuses along a variable portion of the distal intestine due to a defect in craniocaudal migration of neural-crest-derived neuroblasts. HSCR phenotype can be classified into two main groups: short segment forms (S-HSCR), which include aganglionosis as far as the splenic flexure; long segment forms (L-HSCR), when aganglionosis extends beyond that. A minority of cases present total colonic aganglionosis (TCA), the most severe form of the disease. Although HSCR commonly appears as a sporadic trait, ~20% of HSCR cases are familial, with complex patterns of inheritance and a recurrence risk in relatives up to 200 times increased depending on the length of the aganglionosis.¹

HSCR is regarded as a complex and multifactorial disorder, in which the contribution of several different loci acting in an additive manner is usually required to cause the disease. Undoubtedly, the *RET* proto-oncogene is considered the major disease-causing locus in HSCR, with traditional coding mutations accounting for up to 50% of familial cases.^{1,2} In addition, most of the families without an identifiable *RET*-coding mutation are compatible with linkage at the *RET* locus.³

Interestingly, several genes and loci have been found to modulate *RET* mutation penetrance or to interact with *RET* in HSCR. Gabriel *et al*⁴ described two loci at 3p21 and 19q12 acting as *RET*-dependent modifiers under a multiplicative model of inheritance, showing again that HSCR susceptibility is accounted for not only by *RET* mutations, but also by additional genetic events modulating *RET* expression.

Endothelin-B receptor (EDNRB) is regarded as the second major gene for HSCR,⁵ and interaction between *EDN3* and *EDNRB* is known to be essential for normal development of enteric ganglia.^{6,7} *EDN3* had been shown to play a minor, although significant, role in both syndromic and non-syndromic HSCR, acting as a rare susceptibility locus in non-syndromic forms of the disease.⁸⁻¹⁰

Besides the two major signalling pathways in enteric nervous system (ENS) formation known to be involved in HSCR, the *NTF3*-*NTRK3* pathway has recently shown evidence of also being related to HSCR, as mutations in both *NTF3* and *NTRK3* genes have been identified in isolated patients.^{11,12}

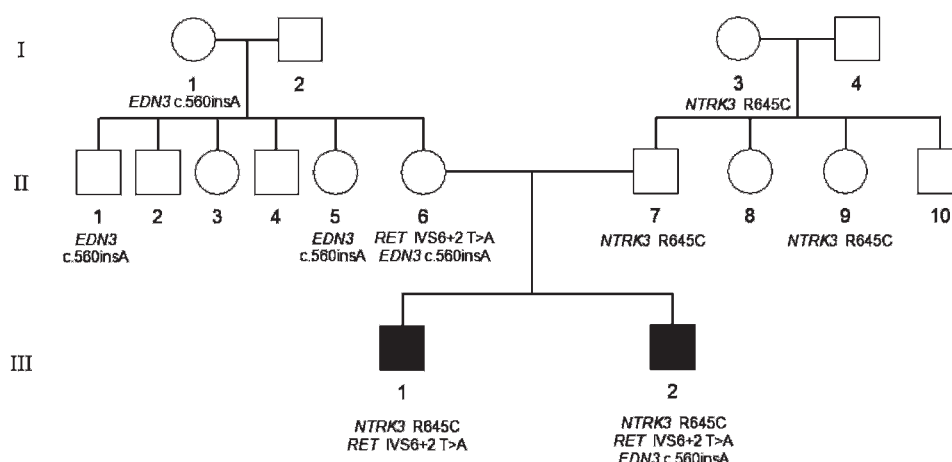
Here we report a multiplex HSCR family with two affected members, one presenting with aganglionosis extending to the descending colon and the other to the ileum. Coding germline mutations in *RET* and *NTRK3* genes had already been detected in both patients.^{12,13} Therefore, we performed a mutational analysis of other candidate genes (*GDNF*, *NTNR*, *PSPN*, *ARTN*, *NTF3*, *SOX10*, *PHOX2B*, *EDNRB* and *EDN3*) with the aim of identifying additional genetic events that may explain the different phenotypes observed in both patients.

MATERIALS AND METHODS

Subjects of study

The affected patients were two siblings of the same HSCR family; they were the only affected members in the family, as no features suggestive of HSCR were found in any of their relatives. No consanguinity was documented for this family. Figure 1 shows the whole pedigree. Isolated HSCR was diagnosed in the two patients on the basis of findings from anorectal manometry and the absence of enteric plexuses on histological examination of biopsy material. Following the criteria recommended by Chakravarti and Lyonnet¹ to define HSCR phenotype, patient III1, with aganglionosis extending to the descending colon, was catalogued as S-HSCR, and his brother, III2, was catalogued as TCA.

Figure 1 Pedigree of the multiplex HSCR family carrying an *EDN3*, *NTRK3* and *RET* mutation.



Mutational analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes from all the available family members and healthy controls, using standard protocols. Primers were designed for mutational screening of the *GDNF*, *NTNR*, *PSPN*, *ARTN*, *NTF3*, *SOX10*, *PHOX2B*, *EDNRB* and *EDN3* coding regions, the intron/exon boundaries and the untranslated regions. Primers and PCR conditions are available on request.

Mutational screening was carried out on an automated dHPLC device as previously described.¹³ Samples with aberrant wave profiles were subjected to sequence analysis using an automated sequencer ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), and sequences were compared with the wild-type *EDN3* sequence (GeneBank accession No NC_000020.9).

RESULTS

One of the most interesting findings in this particular pedigree is that the two affected members also carry the *RET* mutation, IVS6+2T>A,¹³ and the *NTRK3* mutation, R645C¹¹ (fig 1), both of which have previously been reported to be related to the HSCR phenotype, whereas only one of them harbours the *EDN3* mutation.

Mutational screening of the selected genes revealed the presence of the heterozygous variant c.560insA at exon 4 of *EDN3* in the TCA patient (fig 1, patient III.2). The mutation was found to be inherited from his unaffected mother, was present in three other healthy relatives, and absent in 300 control chromosomes tested. This insertion is located in the *EDN3*-like domain of preproendothelin, but not in mature endothelin, and it is predicted to generate changes at the protein level in two of the three *EDN3* isoforms. In isoform 1, the insertion generates a premature stop codon, resulting in a preproprotein 197 residues in length. In contrast, on isoform 2, this mutation, rather than generating a premature stop codon, results in an aberrant protein 250 residues in length. Of note, the *EDN3* mutation is only present in the patient with the more aggressive phenotype. As shown in fig 1, there are healthy carriers of *EDN3* mutation, *NTRK3* mutation and *EDN3*+*RET* mutations. In contrast, only the patients with HSCR were found to carry the combination of *RET*+*NTRK3* mutations.

DISCUSSION

The individual mutations at *RET* and *NTRK3* are proposed to be necessary, but not sufficient, to cause the disease, as both are

present in other unaffected members of the family. The fact that they appear together only in the two affected members of the family¹² indicates that it is their additive effect that leads to the manifestation of the disease.

The *EDN3* gene encodes a large inactive preproendothelin-3 precursor, which yields a biologically active 21-residue mature peptide produced by a two-step proteolytic cleavage at two furin and one endothelin-converting enzyme 1 cleavage sites. The *EDN3* mutation reported here leads to aberration of part of the protein that is cleaved off during this process. This mutation has previously been described in a patient presenting with idiopathic congenital central hypoventilation syndrome (OMIM 209880), a disease that in rare cases is found associated with HSCR,¹⁰ and in two HSCR patients.¹⁴ The functional assay performed by Bolk *et al*¹⁵ for the c.560insA mutation failed to show a deleterious effect on the protein when mutant cDNA was transfected into Chinese hamster ovary cells and levels of *EDN3* peptides produced were measured. However, the authors pointed out that the method used might be inappropriate for testing this particular sequence change and the test was not predicting what would happen in vivo. In fact, the presence of this mutation alone has no consequences in normal ENS development, as we observed in I1 and II1 family members, suggesting that either the mutant protein retains some functionality or gene dosage is not crucial in this process. However, the presence of such an aberrant polypeptide coil in the protein may, even slightly, affect translation of the *EDN3* precursor, polypeptide folding and/or proteolytic processing, resulting in less effective cleavage. We postulate that this subtle change may alter the development of the ENS and modulate the penetrance of mutations in other genes known to be responsible for the disease or for modifying HSCR phenotype.

During ENS formation, neural-crest-derived cells originating at the sacral and vagal level colonise the gut and proliferate in response to glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) via *RET* transduction. These proliferating precursors migrate in a rostrocaudal fashion and differentiate into enteric neurons and glia in response to a variety of neurotrophic factors in the microenvironment of the forming bowel. One of these neurotrophic factors is NTF-3, which exerts its function through the receptor *NTRK3*. NTF-3 has a late-acting role in the formation of the ENS, promoting survival and differentiation of a subset of enteric precursors into neurons and glia and maintaining these differentiated cells during adulthood.¹⁶ Thus,

Mutation report

mutations that impair the function of RET and NTRK3 in the same patient would result in failure of proliferation and migration of enteric precursors to the most distal portion of the gut. This would lead to the absence of ENS plexuses on that region, together with failure of differentiation of a portion of these precursors into neurons and glia and their maintenance. EDN3 prevents early differentiation of neural-crest-derived precursors.⁶ In this regard, the additional presence of an alteration in the EDN3 signalling pathway might lead to an increase in the length of the aganglionic region, as differentiation would abolish migration in an earlier state of ENS formation.

Therefore, our finding of an EDN3 mutation in a multiplex family also harbouring mutations in the RET and NTRK3 genes supports the hypothesis of an additive model of inheritance for HSCR. The presence of the EDN3 c.560insA mutation in the patient with aganglionosis extending to the ileum, and not in his affected sibling with a milder phenotype (fig 1), strongly suggests that the EDN3 gene is acting as a phenotype-modifier factor in this particular family and that the accumulation of gene variants predisposing to HSCR in the genetic background of the patient has a greater impact on expression of the disease.

Acknowledgements: We thank the family that participated in this study.

Funding: This study was funded by Fondo de Investigación Sanitaria, Spain (PI070080, and PI071315 for the E-Rare project), Consejería de Innovación Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (CTS 2570) and Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (PI0249-2008). The CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of the ISCIII. ASM is predoctoral fellow funded by Instituto de Salud Carlos III, Spain.

Competing interests: None.

Provenance and peer review: Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

1. **Chakravarti A**, Lyonnet S. Hirschsprung disease. In: Scriver CS, ed. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 2002:6231–55.
2. **Amiel J**, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S, Pelet A, Arnold S, Miao X, Griseri P, Brooks AS, Antinolo G, de Pontual L, Clement-Ziza M, Munnich A, Kashuk C, West K, Wong KK, Lyonnet S, Chakravarti A, Tam PK, Ceccherini I, Hofstra RM, Fernandez R, Hirschsprung Disease Consortium. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet* 2008;**45**:1–14.
3. **Bolk S**, Pelet A, Hofstra RM, Angrist M, Salomon R, Croaker D, Buys CH, Lyonnet S, Chakravarti A. A human model for multigenic inheritance: phenotypic expression in Hirschsprung disease requires both the RET gene and a new 9q31 locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:268–73.
4. **Gabriel S**, Salomon R, Pelet A, Angrist M, Amiel J, Fornage M, Attié-Bitach T, Olson JM, Hofstra R, Buys C, Steffann J, Munnich A, Lyonnet S, Chakravarti A. Segregation at three loci explains familial and population risk in Hirschsprung disease. *Nat Genet* 2002;**31**:89–93.
5. **Chakravarti A**. Endothelin receptor-mediated signaling in Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 1996;**5**:303–7.
6. **Wu JJ**, Chen JX, Rothman TP, Gershon MD. Inhibition of in vitro enteric neuronal development by endothelin-3: mediation by endothelin B receptors. *Development* 1999;**126**:1161–73.
7. **Stanchina L**, Baral V, Robert F, Pingault V, Lemort N, Pachnis V, Goossens M, Bondurand N. Interactions between Sox10, Edn3 and EdnrB during enteric nervous system and melanocyte development. *Dev Biol* 2006;**295**:232–49.
8. **Ederly P**, Attié T, Amiel J, Pelet A, Eng C, Hofstra RM, Martelli H, Bidaud C, Munnich A, Lyonnet S. Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat Genet* 1996;**12**:442–4.
9. **Hofstra R**, Osinga J, Tan-Sindhunata G, Wu Y, Kamsteeg EJ, Stulp RP, van Ravenswaaij-Arts C, Majoor-Krakauer D, Angrist M, Chakravarti A, Meijers C, Buys CH. A homozygous mutation in the endothelin-3 gene associated with a combined Waardenburg type 2 and Hirschsprung phenotype (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat Genet* 1996;**12**:445–7.
10. **Bidaud C**, Salomon R, Van Camp G, Pelet A, Attié T, Eng C, Bonduelle M, Amiel J, Nihoul-Fékété C, Willems PJ, Munnich A, Lyonnet S. Endothelin-3 gene mutations in isolated and syndromic Hirschsprung disease. *Eur J Hum Genet* 1997;**5**:247–51.
11. **Ruiz-Ferrer M**, Fernandez RM, Antiñolo G, Lopez-Alonso M, Borrego S. NTF-3, a gene involved in the enteric nervous system development, as a candidate gene for Hirschsprung disease. *J Pediatr Surg* 2008;**43**:1308–11.
12. **Fernández RM**, Sánchez-Mejías A, Mena MD, Ruiz-Ferrer M, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. A novel point variant in NTRK3, R645C, suggests a role of this gene in the pathogenesis of Hirschsprung disease. *Ann Hum Genet* 2008;**73**:19–25.
13. **Ruiz-Ferrer M**, Fernandez RM, Antiñolo G, López-Alonso M, Eng C, Borrego S. A complex additive model of inheritance for HSCR is supported by both RET mutations and predisposing RET haplotypes. *Genet Med* 2006;**8**:704–10.
14. **Kenny SE**, Hofstra RM, Buys CH, Vaillant CR, Lloyd DA, Edgar DH. Reduced endothelin-3 expression in sporadic Hirschsprung disease. *Br J Surg* 2000;**87**:580–5.
15. **Bolk S**, Angrist M, Xie J, Yanagisawa M, Silvestri JM, Weese-Mayer DE, Chakravarti A. Endothelin-3 frameshift mutation in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet* 1996;**13**:395–6.
16. **Chalazonitis A**. Neurotrophin-3 in the development of the enteric nervous system. *Prog Brain Res* 2004;**146**:243–63.

The *RET* Functional Variant c*587T>C Is Not Associated with Susceptibility to Sporadic Medullary Thyroid Cancer

Raquel M. Fernández,^{1,2} Avencia Sánchez-Mejías,^{1,2} Elena Navarro,^{2,3}
Manuel López-Alonso,^{2,4} Guillermo Antiñolo,^{1,2} and Salud Borrego^{1,2}

Dear Editor:

Medullary thyroid carcinoma (MTC) originates from the C cells of the thyroid and represents approximately 5–10% of all thyroid malignancies (1,2). About 75% of all MTC cases are believed to be sporadic (sMTC), whereas the remaining 25% correspond to inherited cancer syndromes known as multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN 2, OMIM 171400; Online Mendelian Inheritance in Man[®], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>). While germline gain-of-function mutations in the *RET* (rearranged during transfection) proto-oncogene (OMIM 164761) were shown to be responsible for approximately 92% of MEN 2 cases (2,3), very little is known about the mechanism causing the majority of sporadic tumors. For this reason, the search for genetic factors involved or conferring susceptibility to this phenotype is currently of great interest, especially within the *RET* proto-oncogene. Susceptibility to a disease is a polygenic discretely variable entity, whose extent depends on random combination of favorable or unfavorable gene variants. Therefore, phenotypic expression relies on both the effects of susceptibility and protective alleles. In this sense, data from different series of sMTC patients are highly discrepant. Conflicting results have been reported for the *RET* variants G691S (c.2071C>A, rs1799939), S904S (c.2712C>G, rs1800863), S836S (c.2508C>T, rs1800862), or IVS1-126G>T (rs2565206) (4–10). Based on those findings, since the direct effect of the *RET* variants considered MTC-risk factors has not been proven (4,10,11), we hypothesized about the existence of at least two still unidentified sMTC loci, in linkage disequilibrium with S836S-IVS1-126G>T or with G691S-S904S (9). Interestingly several genetic observations have been recently collected in favor of a variant located in the 3'UTR extreme of *RET*, namely c*587T>C (g.128496T>C, rs3026785), that could putatively support a pathogenic mechanism leading to the disease. First, strong linkage disequilibrium is reported between the c*587C allele and c.2508T (836S) (12), which in turn is linked to IVS1-126T, both of them being repeatedly considered as MTC-predisposing alleles (4–6,9–11). Second, and even more interesting, a recent report strongly suggests a functional effect of c*587T>C on mRNA stability (13). Those authors demonstrated that c*587C lowers *RET* mRNA degradation in human neuroblastoma cells, ultimately leading to an increase of transcription product and

probably an increase in the amount of total *RET* protein at the cell membrane (13). Therefore all this prompted us to evaluate this variant as the susceptibility factor for the development of sMTC linked to S836S in our series.

A typical case-control study was designed which included a series of 83 sporadic MTC (sMTC) patients from southern Spain and a group of 190 healthy controls comprising unrelated race-, age-, and sex-matched individuals. In addition, we also analyzed a group of 183 Spanish patients affected with Hirschsprung disease (HSCR, OMIM 142623), a developmental disorder characterized by the congenital absence of intrinsic ganglion cells in the myenteric and submucosal plexuses of the gastrointestinal tract, which is also related to *RET* mutations but by opposing mechanisms to those leading to MTC.

Informed consent was obtained from all the participants for clinical and molecular genetic studies, which conformed to the tenets of the declaration of Helsinki.

Large-scale genotyping using the Taqman technique was performed under conditions previously described (Applied Biosystems, Foster City, CA) (8). Statistical analysis of the data was done employing the SPSS Version 14.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL), and calculated using chi squared analysis, with statistical significance set at $p < 0.05$.

We observed that allelic frequencies for the c*587C allele were similar in the two groups of patients and in controls, and that the distribution was not statistically different for any of the comparisons (sMTC *versus* controls: $\chi^2 = 0.03$, $p = 0.87$; HSCR *versus* controls: $\chi^2 = 1.81$, $p = 0.18$). Since genetic inheritance operates through the transmission of chromosomal segments, haplotype information is considered essential for identifying causative/protective variations. Therefore, with the available data from previous studies (4,6,9) we analyzed the distribution of the c*587T>C variant in the context of *RET* haplotypes. More specifically, and because it seemed to be especially interesting, we tried to analyze in our series of patients and controls, the distribution of c*587T>C, according to the presence/absence of c.2508C>T (S836S) and IVS1-126G>T variants. We found that the c*587C allele was in linkage disequilibrium with c.2508T as previously reported (12,13) and with IVS1-126T. Whenever the C allele appeared at the c*587 position, the T variant was also present at c.2508 and IVS1-126, although this phenomenon did not occur in the contrary. This observation would suggest that the variant

¹Clinical Management Unit of Genetics, Reproduction, and Fetal Medicine, Virgen del Rocío University Hospital, Seville, Spain.

²The Center for Biomedical Research Network on Rare Diseases (CIBERER), Seville, Spain.

³Endocrinology Service; ⁴Clinical Management Unit of Pediatric Surgery; Virgen del Rocío University Hospital, Seville, Spain.

c*587T>C, at the 3'UTR region, is a more recent genetic event that occurred on a *RET* allele carrying both c.2508T and IVS1-126T. In any case, our findings seem to discard the involvement of the *RET* 3'UTR variant in the pathogenesis of sMTC, despite the functional role proposed for it after extensive *in silico* and *in vitro* analyses (13).

The mechanism causing the majority of sporadic medullary thyroid carcinomas remains elusive. Although the initial hypothesis about the involvement of the *RET* 3'UTR locus in the pathogenesis of sMTC was promising, our data revealed no kind of association of the studied variant with the phenotype. In fact, previous *in vitro* analysis (13) evaluating c*587T>C in MTC-TT cells showed no further variation when comparing the wild-type and the variant alleles, which not only suggests that the activity of the variant might depend on cell type, but would also corroborate our findings supporting the exclusion of the variant as a modifier locus for sMTC.

On the other hand, in contrast with what has been previously reported (13), our results would also clearly discard any kind of association of the 3'UTR variant in the context of HSCR. Therefore, the role in the posttranscriptional control of a subset of *RET* transcripts proposed for c*587T>C (13) would not be supported by the similar allelic distribution observed in our HSCR patients as compared to the normal population.

In summary and conclusion, an understanding of the genetic events that occur in sMTC is a prerequisite for identifying potential molecular therapeutic targets in this disease. Therefore further analyses similar to this, aimed at identifying the *RET* loci responsible for the sporadic forms of the disease, will be an important step contributing to improve the efficacy of *RET*-targeted therapies.

Acknowledgments

We would like to thank all the patients who participated in the study. This study was funded by Fondo de Investigación Sanitaria, Spain (PI070070 and PI071315 for the E-Rare project), Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (PI0340-2007), and Consejería de Innovación Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (CTS2790). The CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of the ISCIII. ASM is a predoctoral fellow founded by Instituto de Salud Carlos III, Spain.

References

- Hazard JB, Hawk WA, Crile G Jr 1959 Medullary (solid) carcinoma of the thyroid; a clinicopathologic entity. *J Clin Endocrinol Metab* **19**:152–161.
- Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, Ploos van Amstel HK, Lips CJM, Nishisho I, Takai SI, Marsh DJ, Robinson BG, Frank-Raue K, Raue F, Xue F, Noll WW, Romei C, Pacini F, Fink M, Niederle B, Zedenius J, Nordenskjöld M, Komminoth P, Hendy GN, Gharib H, Thibodeau SN, Lacroix A, Frilling A, Ponder BAJ, Mulligan LM 1996 The relationship between specific *RET* proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International *RET* mutation consortium analysis. *JAMA* **276**:1575–1579.
- Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, Moley JF, Pacini F, Ringel MD, Schlumberger M, Wells SA. The American Thyroid Association Guidelines Task Force

- 2009 Medullary Thyroid Cancer: Management Guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid* **19**:564–611.
- Borrego S, Wright FA, Fernandez RM, Williams N, Lopez-Alonso M, Davuluri R, Antiñolo G, Eng C 2003 A founding locus within the *RET* proto-oncogene may account for a large proportion of apparently sporadic Hirschsprung disease and a subset of cases of sporadic medullary thyroid carcinoma. *Am J Hum Genet* **72**:88–100.
- Gimm O, Neuberg DS, Marsh DJ, Dahia PL, Hoang-Vu C, Raue F, Hinze R, Dralle H, Eng C 1999 Over-representation of a germline *RET* sequence variant in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma and somatic *RET* codon 918 mutation. *Oncogene* **18**:1369–1373.
- Ruiz A, Antinolo G, Fernandez RM, Eng C, Marcos I, Borrego S 2001 Germline sequence variant S836S in the *RET* proto-oncogene is associated with low level predisposition to sporadic medullary thyroid carcinoma in the Spanish population. *Clin Endocrinol (Oxf)* **55**:399–402.
- Robledo M, Gil L, Pollan M, Cebrian A, Ruiz S, Azanedo M, Benitez J, Menarguez J, Rojas JM 2003 Polymorphisms G691S/S904S of *RET* as genetic modifiers of MEN 2A. *Cancer Res* **63**:1814–1817.
- Elisei R, Cosci B, Romei C, Bottici V, Sculli M, Lari R, Barale R, Pacini F, Pinchera A 2004 *RET* exon 11 (G691S) polymorphism is significantly more frequent in sporadic medullary thyroid carcinoma than in the general population. *J Clin Endocrinol Metab* **89**:3579–3584.
- Fernández RM, Peciña A, Antiñolo G, Navarro E, Borrego S 2006 Analysis of *RET* polymorphisms and haplotypes in the context of sporadic medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* **16**:411–417.
- Fugazzola L, Muzza M, Mian C, Cordella D, Barollo S, Alberti L, Cirello V, Dazzi D, Girelli ME, Opocher G, Beck-Peccoz P, Persani L 2008 *RET* genotypes in sporadic medullary thyroid cancer: studies in a large Italian series. *Clin Endocrinol (Oxf)* **69**:418–425.
- Griseri P, Sancandi M, Patrone G, Boccardi R, Hofstra R, Ravazzolo R, Devoto M, Romeo G, Ceccherini I 2000 A single-nucleotide polymorphic variant of the *RET* proto-oncogene is underrepresented in sporadic Hirschsprung disease. *Eur J Hum Genet* **8**:721–724.
- Lantieri F, Griseri P, Puppo F, Campus R, Martucciello M, Ravazzolo R, Devoto M, Ceccherini I 2006 Haplotypes of the human *RET* proto-oncogene associated with Hirschsprung disease in the Italian population derive from a single ancestral combination of alleles. *Ann Hum Genet* **70**:12–26.
- Griseri P, Lantieri F, Puppo F, Bachetti T, Di Cuca M, Ravazzolo R, Ceccherini I 2007 A common variant located in the 3'UTR of the *RET* gene is associated with protection from Hirschsprung disease. *Hum Mutat* **28**:168–176.

Address correspondence to:
Salud Borrego, M.D., Ph.D.
Unidad de Gestión Clínica de Genética,
Reproducción y Medicina Fetal
Hospital Universitario Virgen del Rocío,
Avda. Manuel Siurot s/n
41013 Sevilla
Spain

E-mail: salud.borrego.sspa@juntadeandalucia.es

This article has been cited by:

New roles of *EDNRB* and *EDN3* in the pathogenesis of Hirschsprung disease

Avencia Sánchez-Mejías^{1,2}, Raquel María Fernández, PhD^{1,2}, Manuel López-Alonso, MD, PhD^{2,3}, Guillermo Antiñolo, MD, PhD^{1,2}, and Salud Borrego, MD, PhD^{1,2}

Purpose: Hirschsprung disease is characterized by the absence of intramural ganglion cells in the myenteric and submucosal plexuses within distal intestine, because of a fail in the enteric nervous system formations process. Endothelin-3-endothelin receptor B signaling pathway is known to play an essential role in this process. The aim of this study was to evaluate the implication of the *EDN3* and *EDNRB* genes in a series of patients with Hirschsprung disease from Spain and determinate their mutational spectrum. **Methods:** We performed the mutational screening of both genes in 196 patients with Hirschsprung disease using denaturing high-performance liquid chromatography technology. A case-control study using TaqMan Technology was also carried out to evaluate some common polymorphisms and haplotypes as susceptibility factors for Hirschsprung disease. **Results:** Besides several novel mutations in both genes, we found a truncating mutation in an alternative isoform of *EDNRB*. Interestingly, we obtained an overrepresentation of a specific *EDN3* haplotype in cases versus controls. **Conclusions:** Our results suggest that the isoform *EDNRBΔ3* might be playing an essential role in the formation of enteric nervous system. In addition, based on the haplotype distribution, *EDN3* might be considered as a common susceptibility gene for sporadic Hirschsprung disease in a low-penetrance fashion. *Genet Med* 2010;x(x):000–000.

Key Words: *Hirschsprung disease, enteric nervous system, EDNRB, EDN3, complex disease*

Hirschsprung disease or aganglionic megacolon (HSCR, OMIM 142623) is a developmental disorder of variable penetrance and expressivity, male predominance, with an incidence of 1 of 5000 newborn human infants.^{1,2} It is characterized by the absence of intramural ganglion cells in the myenteric and submucosal plexuses within a variable portion of the distal intestine. The most widely accepted etiopathogenetic hypothesis for HSCR is based on a defect of craniocaudal migration of neuroblasts, originated from the neural crest, to the developing gut, followed by cell proliferation and differentiation. This process is crucial for the proper enteric nervous system (ENS) formations.

There are two major signaling pathways involved in the ENS formation, which are known to be involved in HSCR:

the REarranged during Transfection (RET)-cell line-derived neurotrophic factor and the endothelin-3 (EDN3)-endothelin receptor B (*EDNRB*) systems.² Although mutations in the coding and/or noncoding regions of *RET* seem to be a necessary feature in a great portion of cases with HSCR,^{2–4} *EDNRB* is regarded as the second major causal gene for HSCR.^{1,2} In contrast, the gene encoding its ligand, *EDN3*, has been demonstrated to play a minor although significant role in HSCR, with a total of nine mutations being reported so far associated to either isolated or syndromic HSCR (visit HGMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>). *EDN3* gene is more likely to play a major role in syndromic forms of HSCR, such as Shah-Waardenburg syndrome (WS4, OMIM 277580), and to act as a rare susceptibility locus in non-syndromic HSCR.^{5–7}

In this study, we report a *EDNRB* and *EDN3* complete molecular analysis in a series of cases with HSCR from Spain which, with the available data from our previous analysis of both *RET* coding mutations and haplotypes,^{8,9} means a more comprehensive view of the genetic basis of HSCR disease in our cohort of patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients and control subjects

In this study, we have included a total of 196 patients presenting with HSCR (22% female and 78% male patients) and their parents when available. One hundred seventy-six were sporadic cases, whereas 20 were familial cases belonging to 13 different families. Six of those patients presented with associated Down syndrome.

In addition, we have also analyzed a group of 150 normal controls comprising unselected, unrelated, race, age, and sex-matched individuals. An informed consent was obtained from all the participants for clinical and molecular genetic studies. The study conformed to the tenets of the Declaration of Helsinki.

Mutational screening and analysis of sequence variants

Mutational screening was carried out by denaturing high-performance liquid chromatography in a WAVE DNA Fragment Analysis system (Transgenomic, Omaha, NE). Primers, polymerase chain reaction, and denaturing high-performance liquid chromatography conditions are available on request. Those samples with aberrant wave profiles were subjected to sequence analysis using an automated sequencer ABI 3730 and the software SeqScape Ver.2.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

A large-scale genotyping of *EDNRB* single nucleotide polymorphism (SNPs) c.484-4125C>T (rs3027111), I187I (rs5349), and c.*1985G>A (rs4885491) and *EDN3* SNPs c.365 + 7474T>C (rs6064764), c.366-3935C>G (rs171969), and c.*231 + 236G>A (rs260741) was performed in our HSCR trios and controls, using Taqman-based techniques for allelic discrimination (TaqMan[®] SNP Genotyping Assay, Applied Biosystems) and according to manufacturer's recommendations, in a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). From these results, allelic, genotypic and haplotypic

From the ¹Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Seville, Spain; and ³Unidad de Gestión Clínica de Cirugía Infantil, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain.

Salud Borrego, MD, PhD, Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot s/n, 41013 Seville, Spain. E-mail: salud.borrego.sspa@juntadeandalucia.es.

Disclosure: The authors declare no conflict of interest.

Submitted for publication June 26, 2009.

Accepted for publication September 29, 2009.

DOI: 10.1097/GIM.0b013e3181c371b0

Table 1 *EDNRB* sequence variants detected in this study

Nucleotide change	Amino acid change	Exon/intron	Novel/previously described	Allelic frequency in control population (%)
c.-111del C ^a			Novel	0.48
c.-74C>T ^a			Novel	0
c.-67C>A ^a			Novel	0
c.43A>T ^a	K15X*		Novel	0
c.42_45del	L15PfsX29	1	Novel	0
c.159A>G	L53L	1	Novel	0
c.167A>C	K56T	1	Novel	0
c.169G>A	G57S	1	Previously described rs1801710	0
c.343G>A	G115R	1	Novel	0
c.360C>T	S120S	1	Novel	0
c.466C>T	P156S	1	Novel	0
c.552C>T	S184S	2	Previously described rs5348	0
c.561C>T	I187I	2	Previously described rs5349	1
c.731C>A	T244N	3	Previously described rs5350	0
c.732G>A	T244T	3	Novel	0.49
c.802-139A>G		3	Novel	0
c.802-122T>C		3	Previously described rs9530703	6.7
c.831A>G	L277L	4	Previously described rs5351	56.5
c.914G>A	S305N	4	Previously described rs5352	2.25
c.928G>A	A310T	4	Previously described	0
c.951 + 31G>C		4	Novel	0
c.951 + 82C>T		4	Novel	0
c.952-19A>G		4	Novel	0
c.1239C>G	S413S	7	Novel	0
c.*50A>T		7	Novel	0

^aAnnotated from the *EDNRB*Δ3.

frequencies, and distributions were compared between patients with HSCR and controls, using the SPSS Ver15.0 for Windows. In each analysis, statistical significance was calculated using Pearson’s χ^2 test, with statistical significance set at $\alpha = 0.05$. Haplotypes comprising the *EDNRB* and *EDN3* polymorphisms analyzed were generated based on the results of the complete triads when available (patient, father, and mother), which allowed us to reconstruct and compare the transmitted versus nontransmitted alleles. With these results, we proceeded to compare the distribution of haplotypes between the patients with HSCR and controls. Statistical estimates were calculated using the same method explained earlier.

RESULTS

***EDNRB* mutational screening**

The 25 sequence variants found in the mutational screening of *EDNRB* gene are reported in Table 1. Seven of them consisted of noncoding or polymorphic nucleotide substitutions and

another seven were silent changes in the coding region, leading to synonymous amino acidic substitutions. More interesting was the finding of six missense *EDNRB* mutations, all of them appearing in heterozygosis (Table 2). Three of these mutations had been previously reported to be responsible for the HSCR phenotype—G57S,¹⁰ A310T,¹¹ and S305N¹²—although it currently seems that S305N is a rare polymorphism not related to HSCR. The remaining three missense changes were novel variants located in Exon 1: K56T, G115R, and P156S. All the information regarding the phenotype, sex, occurrence, and parental origin of these mutations is provided in Table 2. We have used Polymorphism Phenotyping (<http://genetics.bw-h.harvard.edu.pph>) and Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) (<http://blocks.fhrc.org/sift/SIFT.html>) tools to examine the potential pathogenicity of these four novel missense *EDNRB* mutations. Both programs predicted a benign effect for the variant K56T, based in the not conserved status of the sequence among different species in this particular position. In contrast, the substitutions of

Table 2 Presumably pathogenic *EDNRB* and *EDN3* mutations^a detected in isolated HSCR patients

Gene	Patient	Nucleotide change	Amino acid change	Occurrence ^b /sex	Parent origin of the mutation	Presence in other family members ^c
<i>EDNRB</i>	HSCR 19	c.43A>T ^d	K15X ^e	Sporadic/M	Father	No
	HSCR 6	c.42_45del ^d	L15PfsX29	Sporadic/F	Mother	Yes
	HSCR 140	c.167A>C ^d	K56T	Sporadic/M	Mother	No
	HSCR 61	c.169G>A	G57S	Sporadic/M	Father	No
	HSCR 194	c.343G>A	G115R	Familial/2M	Father	No
	HSCR 113	c.466C>T ^d	P156S	Familial/2M	Father	No
	HSCR 82	c.928G>A	A310T	Sporadic/M	Father	No
	<i>EDN3</i>	HSCR 9	c.560insA	T189NfsX63	Familial/M	Mother
HSCR 130		c.572_573del ^d	K191RfsX60	Sporadic/F	Father	No

^aAll mutations found were in heterozygous state.

^bThe term “familial” is applied when more than one affected member with Hirschsprung disease is present in the same family. Otherwise, when there is no family history, the cases are considered as sporadic.

^c“Presence in other family members” refers to additional family members besides the parent from who the patient inherits the mutation.

^dNovel mutation.

^eAnnotated from the *EDNRB*Δ3 protein sequence.

hydrophobic glycine and proline for basic arginine and polar serine at Positions 115 and 156, respectively were predicted as not tolerated changes in the protein, probably having damaging effects on the protein function.

We have also found a novel frameshift mutation, consisting of a four nucleotides deletion (c.42_45del), which results in a premature stop codon at amino acid position 43, generating a protein with functional domain totally abolished.

We have also performed the mutational screening of an additional exon in the 5' direction from Exon 1,¹³ never previously analyzed in the context of HSCR. The only difference between conventional *EDNRB* and this transcript variant (*EDNRB*Δ3) would be the presence of 89 additional amino acids at the N terminus region of the protein. We detected three sequence variants at the 5' untranslated region of this additional exon (Table 1). The most striking finding has been the detection of the coding mutation K15X

(c.43A>T) in a sporadic HSCR patient. None of the variants described in this additional exon had been previously reported.

EDN3 mutational screening

Regarding the *EDN3* gene, 11 sequence variants were detected in the screened patients (Table 3). Besides the previously described *EDN3* mutation (c.560insA) found in a multiplex isolated HSCR family,¹⁴ we have identified the variant c.572_573del in Exon 4, which at the protein level is located in the *EDN3*-like domain of the preproendothelin, but not in the mature endothelin. It was absent in 300 control chromosomes tested and results in an aberrant protein of 249 amino acids residues length, with an anomalous carboxy terminus sequence from Position 190 to the end. The novel mutation c.572_573del was detected in a sporadic nonsyndromic HSCR patient.

Table 3 *EDN3* sequence variants detected in this study

Nucleotide change	Amino acid change	Exon/intron	Novel/previously described	Allelic frequency in control population (%)
c.-248G>A		1	Novel	0.5
c.53-57C>T		2	Novel	4.0
c.365 + 23G>A		2	Previously described rs11570257	4.0
c.366-56G>C		3	Previously described rs11570340	3.3
c.542 + 119C>T		3	Previously described rs11570341	0
c.560insA	T189NfsX63	4	Previously described rs11570344	0
c.572_573del	K191RfsX60	4	Novel	0
c.621-80T>C		5	Previously described rs11570349	0
c.621-30insT		5	Novel	0
c.*240_241del		3'UTR	Previously described rs34516274	28.5
c.*240delC		3'UTR	Previously described rs11475273	15.7

Analysis of the distribution of *EDNRB* and *EDN3* variants and haplotypes in the different groups

We analyzed the allelic and genotypic distribution of three *EDNRB* SNPs in HSCR and controls, and haplotypes comprising them were generated in each group as previously described.⁸ No statistical differences were found in the distribution for any of these variants or the haplotypes comprising them. Of note, regarding c.561C>T SNP, no 561T allele was detected among our patients with HSCR+ Down syndrome, in contrast with the previously published data.¹⁵

Regarding *EDN3*, no statistical differences were found in the allelic or genotypic distribution for SNPs c.366-3935C>G or c.*231 + 236 G>A, neither for the haplotypes comprising them. However, we found a statistically significant association of the c.366 + 7474T allele to HSCR when comparing the allelic distribution in cases versus controls ($\chi^2 = 4.90$, $P = 0.027$). A further analysis on haplotypic data revealed that this difference in allelic distribution seems to be due to an overrepresentation of a specific *EDN3* haplotype (c.365 + 7474T, c.366-3935C, c.*231 + 236A) in the patients group ($\chi^2 = 4.84$, $P = 0.028$).

DISCUSSION

In this report, we present a complete genetic analysis of *EDNRB* and *EDN3* in the context of HSCR in our series of 196 patients.

There are several features that led us to propose the novel *EDNRB* variants c.42_45del, K56T, G115R, and P156S as disease-causing mutations. Deletion c.42_45del causes a frameshift that originates a premature stop codon at an amino acid position 43. As a result, a truncated protein of 42 amino acids length would be generated, lacking all the seven transmembrane domains essential for the protein function. Mutation G57S has been shown to fail at the inhibition of adenylate cyclase, leading to failures in the protein-G-coupled signaling pathway responsible of neural cells differentiation in the bowel.¹⁶ Regarding mutation K56T, located nearby G57S mutation, we think both could have a similar functional consequence for the protein, because of the physical proximity of the amino acids residues. Mutations G115R and P156S sequence comparison shows that the amino acids in both cases are conserved in mammalian *EDNRB* proteins, as well as the amino acids surrounding these positions, indicating an important role of those regions in the protein function. Interestingly, both mutations G115R and P156S were found in two different multiplex HSCR families and present in all affected members. In addition, for all those patients, we have observed the concurrence of an *EDNRB* mutation and the HSCR-susceptibility *RET* haplotype.⁸ Thus, *RET* also determines the susceptibility to HSCR on those patients, supporting again that the presence of additional predisposing genetic events seems to be a necessary feature to cause megacolon.

Here we report, for the first time, a mutational screening of the extra region of this new *EDNRB* transcript variant. One of the most relevant findings has been the detection of the mutation K15X in an alternative spliced isoform of *EDNRB* protein. Tsutsumi et al.¹³ described three different subtypes of cDNA for *EDNRB* gene as a consequence of alternative splicing in the 5' region of the gene. One of those alternative isoforms (*EDNRB* Δ 3) encodes an extra protein sequence of 89 amino acids at the 5' extreme, but shares an identical coding region with the traditional protein. Tissue-specific expression and spe-

cific transcriptional regulatory sequences of *EDNRB* Δ 3 have to be clarified, but there is evidence of expression in the small intestine and colon.¹³ The detection of this mutation, in a sporadic HSCR patient, let us to hypothesize that *EDNRB* Δ 3 might play an important role in the pathogenesis of HSCR disease, indicating a putative functional implication of this particular isoform in the ENS development, opening a new field of knowledge in this area.

With regard to *EDN3*, the novel mutation c.572_573del was detected in a sporadic HSCR patient also harboring the HSCR-susceptibility *RET* haplotype in heterozygosis, but no other point mutations in other HSCR-susceptibility genes (*GDNF*, *NTNR*, *PSPN*, *ARTN*, *NTF3*, *NTRK3*, *SOX10*, *PHOX2B*, *EDNRB*, and *EDN3*). The fact that both mutation on *EDN3* and HSCR-susceptibility *RET* haplotype had been inherited from his healthy father suggests that other unidentified genes or additional factors may contribute to the occurrence of HSCR disease in this patient.

EDN3 is regarded as a rare susceptibility gene for HSCR, because of a limited number of patients who harbor point mutations at this locus, especially in the isolated forms. Interestingly, a reduced expression of *EDN3* in the colon of sporadic HSCR patients, both ganglionic and aganglionic, versus controls pointed out the importance of *EDN3* in HSCR.¹⁷ The absence of mutations at the *EDN3* locus in patients with such an aberrant *EDN3* expression led authors to propose the existence of unknown factors regulating gene expression. Our results bring a new genetic clue to explain such phenomenon. It is plausible that the association of rs6064764, with HSCR disease might be indicating the existence of linkage disequilibrium with some functional, still unidentified allele of these genes. Another possibility is that this allele might be acting as a functional variant *per se*, leading to a higher predisposition for HSCR, although its precise molecular mechanism remains to be elucidated. In any case, our evaluation of *EDN3* as a susceptibility gene for HSCR using common polymorphisms suggests that this gene might be considered as a common susceptibility gene for sporadic HSCR in a low-penetrance fashion, more than a minor gene for this disease as it is currently considered.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by Fondo de Investigación Sanitaria, Spain (PI070080, and PI071315 for the E-Rare project), Consejería de Innovación Ciencia y Empresa (CTS 2590) and Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (PI0249-2008). We thank all the patients who participated in the study as well as their families for their collaboration. The CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of the ISCIII. ASM is predoctoral fellow founded by Instituto de Salud Carlos III, Spain.

REFERENCES

1. Chakravarti A, Lyonnet S. Hirschsprung disease. In: Scriver CS, editor. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw-Hill, 2002:6231–6255.
2. Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, et al. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet* 2008;45:1–14.
3. Borrego S, Wright FA, Fernandez RM, et al. A founding locus within the *RET* proto-oncogene may account for a large proportion of apparently sporadic Hirschsprung disease and a subset of cases of sporadic medullary thyroid carcinoma. *Am J Hum Genet* 2003;72:88–100.
4. Emison ES, McCallion AS, Kashuk CS, et al. A common sex-dependent mutation in a *RET* enhancer underlies Hirschsprung disease risk. *Nature* 2005;434:857–863.
5. Edery P, Attié T, Amiel J, et al. Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat Genet* 1996;12:442–444.
6. Hofstra R, Osinga J, Tan-Sindhunata G, et al. A homozygous mutation in the

- endothelin-3 gene associated with a combined Waardenburg type 2 and Hirschsprung phenotype (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat Genet* 1996;12:445–447.
7. Bidaud C, Salomon R, Van Camp G, et al. Endothelin-3 gene mutations in isolated and syndromic Hirschsprung disease. *Eur J Hum Genet* 1997;5:247–251.
 8. Fernandez RM, Boru G, Pecina A, et al. Ancestral RET haplotype associated with Hirschsprung's disease shows linkage disequilibrium breakpoint at -1249. *J Med Genet* 2005;42:322–327.
 9. Ruiz-Ferrer M, Fernandez RM, Antiñolo G, López-Alonso M, Eng C, Borrego S. A complex additive model of inheritance for HSCR is supported by both RET mutations and predisposing RET haplotypes. *Genet Med* 2006;8:704–710.
 10. Amiel J, Attie T, Jan D, et al. Heterozygous endothelin receptor B (EDNRB) mutations in isolated Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 1996;5:355–357.
 11. Sakai T, Nirasawa Y, Itoh Y, Wakizaka A. Japanese patients with sporadic Hirschsprung: mutation analysis of the receptor tyrosine kinase proto-oncogene, endothelin-B receptor, endothelin-3, glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin genes: a comparison with similar studies. *Eur J Pediatr* 2000;159:160–167.
 12. Auricchio A, Casari G, Staiano A, Ballabio A. Endothelin-B receptor mutations in patients with isolated Hirschsprung disease from a non-inbred population. *Hum Mol Genet* 1996;5:351–354.
 13. Tsutsumi M, Liang G, Jones PA. Novel endothelin B receptor transcripts with the potential of generating a new receptor. *Gene* 1999;228:43–49.
 14. Sánchez-Mejías A, Fernández RM, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. Contribution of RET, NTRK3 and EDN3 to the expression of Hirschsprung disease in a multiplex family [published online ahead of print June 25, 2009]. *J Med Genet* doi: 10.1136/jmg.2009.067819.
 15. Zaahl MG, Du Plessis L, Warnich L, Kotze MJ, Moore SW. Significance of novel endothelin-B receptor gene polymorphisms in Hirschsprung's disease: predominance of a novel variant (561C/T) in patients with co-existing Down's syndrome. *Mol Cell Probes* 2003;17:49–54.
 16. Fuchs S, Amiel J, Claudel S, Lyonnet S, Corvol P, Pinet F. Functional characterization of three mutations of the endothelin B receptor gene in patients with Hirschsprung's disease: evidence for selective loss of Gi coupling. *Mol Med* 2001;7:115–124.
 17. Kenny SE, Hofstra RM, Buys CH, Vaillant CR, Lloyd DA, Edgar DH. Reduced endothelin-3 expression in sporadic Hirschsprung disease. *Br J Surg* 2000;87:580–585.

Involvement of *SOX10* in the pathogenesis of Hirschsprung disease: report of a truncating mutation in an isolated patient

Avencia Sánchez-Mejías · Yuli Watanabe · Raquel M. Fernández ·
Manuel López-Alonso · Guillermo Antiñolo · Nadege Bondurand · Salud Borrego

Received: 6 November 2009 / Revised: 10 December 2009 / Accepted: 30 December 2009
© Springer-Verlag 2010

Abstract *SOX10* protein is a key transcription factor during neural crest development. Mutations in *SOX10* are associated with several neurocristopathies such as Waardenburg syndrome type IV (WS4), a congenital disorder characterized by the association of hearing loss, pigmentary abnormalities, and absence of ganglion cells in the myenteric and submucosal plexus of the gastrointestinal tract, also known as aganglionic megacolon or Hirschsprung disease (HSCR). Several mutations at this *locus* are known to cause a high percentage of WS4 cases, but no

SOX10 mutations had been ever reported associated to isolated HSCR patient. Therefore, nonsyndromic HSCR was initially thought not to be associated to mutations at this particular *locus*. In the present study, we describe the evaluation of the *SOX10* gene in a series of 196 isolated HSCR cases, the largest patient series evaluated so far, and report a truncating c.153–155del mutation. This is the first time that a *SOX10* mutation is detected in an isolated HSCR patient, which completely changes the scenario for the implications of *SOX10* mutations in human disease, giving us a new tool for genetic counseling.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00109-010-0592-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Sánchez-Mejías · R. M. Fernández · G. Antiñolo ·
S. Borrego (✉)
Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina
Fetal, Hospital Universitario Virgen del Rocío,
Avda. Manuel Siurot s/n,
41013 Seville, Spain
e-mail: salud.borrego.sspa@juntadeandalucia.es

A. Sánchez-Mejías · R. M. Fernández · M. López-Alonso ·
G. Antiñolo · S. Borrego
Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades
Raras (CIBERER),
Seville, Spain

Y. Watanabe · N. Bondurand
INSERM, Unité U955,
Créteil, France

Y. Watanabe · N. Bondurand
Faculté de Médecine, Université Paris 12,
Créteil, France

M. López-Alonso
Unidad de Gestión Clínica de Cirugía Infantil,
Hospital Universitario Virgen del Rocío,
Seville, Spain

Keywords *SOX10* · Hirschsprung disease ·
Neurocristopathology · Waardenburg syndrome ·
Enteric nervous system

Introduction

SOX10 encodes a 466-amino-acid transcription factor belonging to an evolutionary conserved protein family, which contains a central high mobility group (HMG) DNA-binding/DNA-bending domain and a C-terminal transactivation domain [1, 2]. In a manner similar to all members of this family, *SOX10* exerts its function through binding to the promoters or enhancers of its target genes, alone or in association with other transcription factors [3, 4]. *SOX10* is a key transcription factor during neural crest-derived cells migration and differentiation, and *MITF*, *TYR*, *TRP2*, *MPZ*, *GJB1*, *RET*, and *EDNRB* are known to be target genes for *SOX10* regulation [3–11]. *SOX10* modulate gene expression of pluripotent neural crest cells that migrate from the neural tube throughout the embryo along several pathways during embryogenesis. Those precursors give rise to enteric neurons and glia, some of the craniofacial skeletal tissue,

and melanocytes of the skin and inner ear in addition to other cell types [12].

The first pathogenic mutations described for *SOX10* was associated with the Waardenburg syndrome type IV (WS4, OMIM 277580) [13], a congenital disorder characterized by hearing loss and pigmentary abnormalities due to an abnormal proliferation, survival, migration, or differentiation of neural crest-derived melanocytes, combined with the absence of ganglion cells in the myenteric and submucosal plexus of the gastrointestinal tract, also known as aganglionic megacolon or Hirschsprung disease (HSCR, OMIM 142623) [14]. The association of WS to intestinal pseudo-obstruction instead of HSCR is also observed in some WS4 patients [15]. Several subtypes of WS are defined on the basis of the presence of additional symptoms, being known as WS2 the presentation of clinical features of WS alone. The WS4 phenotype has been reported to be caused by *SOX10* point mutations as well as gross deletions present in 45–55% of patients [16]. Most of such *SOX10* point mutations responsible for WS4 generate premature stop codons arising as de novo events in the patients [17]. Of note, no *SOX10* mutations have been ever reported to date to be associated to isolated HSCR patient.

On the other hand, heterozygous *SOX10* mutations are associated with a large range of phenotypes beyond WS4, including WS2 (pigmentation defects and deafness but no HSCR) and clinical features that reflect an involvement of the central and/or peripheral nervous system regrouped under the name of peripheral demyelinating neuropathy, central demyelinating leukodystrophy, WS, and HSCR (PCWH; OMIM 609136) [18]. Taking the phenotype variability observed so far, *SOX10* may be regarded as an interesting candidate gene in other neurodegenerative disorders and neurocristopathies. In this sense, the implications of *SOX10* in the pathogenesis of HSCR have been largely discussed. A correlation between HSCR phenotype in WS4 patients and severity of *SOX10* mutations has been observed [19]. However, since no *SOX10* mutations could be detected in a series of patients with isolated HSCR, nonsyndromic HSCR was initially thought not to be associated to mutations at this particular *locus* [13]. In the present report, we have sought to completely determine if *SOX10* plays any kind of role in the pathogenesis of HSCR by a screening of both point mutations and gene-dosage anomalies of its coding sequence in a series of 196 HSCR patients, the largest patient series evaluated so far.

Materials and methods

Patients and control subjects

In this study, we have included a total of 196 patients presenting with HSCR (22% female, 78% male); in one

of those patients, HSCR phenotype was associated to Waardenburg–Shah syndrome, while the remaining 195 cases were isolated HSCR. One hundred seventy-six were sporadic cases, while 20 were familial cases belonging to 13 different families.

In addition, we have also analyzed a group of 150 normal controls comprising unselected, unrelated, race, age-matched, and sex-matched individuals. An informed consent was obtained from all the participants for clinical and molecular genetic studies. The study conformed to the tenets of the declaration of Helsinki.

PCR, dHPLC analysis, sequence analysis, and QMF-PCR

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes from patients and healthy controls, using standard protocols. Primers were designed for the mutational screening of the *SOX10* coding region, the intron/exon boundaries and the 5' and 3' untranslated regions (UTRs). Primers and polymerase chain reaction (PCR) conditions are available on Supplementary Table 1. The mutational screening was carried out on an automated denaturing high-performance liquid chromatograph (dHPLC) equipped with a DNA separation column using the WAVE DNA Fragment Analysis System (Transgenomic, Omaha, NE, USA). Those samples with aberrant wave profiles were subjected to sequence analysis using an automated sequencer ABI 3730 and the software SeqScape Ver. 2.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). When a novel sequence variant was detected, the exon harboring the change was also screened in a group of 150 normal controls, as well as in all available family members of the proband, in order to evaluate the putative pathogenicity of the sequence variant underlying such profile.

To evaluate gene-dosage anomalies within the *SOX10* coding sequence, we used a modification of the quantitative multiplex fluorescent–polymerase chain reaction (QMF-PCR) method described elsewhere [16]. We amplified in a multiplex reaction the three coding exons of *SOX10*, exon 4 of *POLR2F*, and a region located 5' of *SOX10* using the QIAGEN multiplex PCR kit (Qiagen, Germantown, MD, USA). In addition, two control amplicons were used: *DSCR1*, located on chromosome 21, and *F9*, located on chromosome X. Primers and PCR conditions are available on Supplementary Table 2. Fragment analysis was performed using the 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and, for data analysis, we used GeneMarker v 1.6 (Softgenetics L.L.C) comparing patients tested with controls. Dosage quotients under 0.6 were considered as indicating potential deletions.

Plasmids, cell culture, and transfection

The pECE-SOX10, pECE-SOX10-E189X, pECE-PAX3, pECE-EGR2, pGL3-MITFdel1718, and pGL3-Cx32 vectors were described elsewhere [5, 6]. To generate pCMV-Myc-SOX10, the human SOX10 cDNA (GenBank accession number AJ001183) was amplified by PCR using the primers 5'-TTGCTAAGAATTCATGGCGG-AGGAGCAGGATATC-3' and 5'-AATAATGCGGCCCGCCTTCTCCTCTGTCCAGCCTG-3' and pECE-SOX10 as a template. The PCR product was then cloned in the pCMV-Myc (Clontech, Mountain View, CA, USA) after *EcoRI* and *NotI* digestion. The mutations c.112_131del and c.153–155del were introduced independently within the pECE-SOX10 and pCMV-Myc-SOX10 constructs by site-directed mutagenesis using the Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The nucleotide sequence of each construct was verified by direct sequencing as described above.

HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum and transfected using Lipofectamine PLUS reagents (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Reporter assays

Cells were plated on 12-well plates and transfected 1 day after with 0.150 µg of each effector and reporter plasmid. The total amount of plasmid was kept constant by addition of empty pECE vector. Twenty-four hours after transfection, cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and lysed and extracts were assayed for luciferase activity using the Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, USA) as described before [5, 6, 20]. As far as competition assays are concerned, increasing amounts of mutant SOX10 plasmids (0.150, 0.300, or 0.600 µg) were mixed with a fixed amount of wild-type (WT) SOX10 (0.150 µg) and the reporter pGL3-Cx32 plasmid (0.150 µg). DNA per well was kept constant by adding empty pECE vector.

Immunostaining

Cells were plated on 24-well plates and transfected 1 day after with 350 µg of each SOX10 construct. Twenty-four hours after transfection, cultures were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature (RT). After washing twice in PBS + 0.1% Triton X-100, they were incubated with blocking solution (PBS + 1% bovine serum albumin + 0.15% glycine) at 4°C overnight. Primary antibodies were diluted in blocking solution as follows: SOX10-N20 (goat, 1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), c-Myc (mouse, 1:100; BD Biosciences,

Palo Alto, CA, USA). Incubation with primary antibody was performed at 4°C overnight. After several washes with blocking solution, secondary antibodies were added for 2 h at RT at the following dilutions in blocking solution: antigoat Alexa Fluor 568 (1:1/500; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), antimouse Alexa Fluor 568 (1:100; Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Cells were mounted in Vectashield medium containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and fluorescence images were examined with a Leica DMR epifluorescence microscope. Alternatively, cells were counterstained with TO-PRO-3-iodide (Molecular Probes; 1:5,000 in PBS), mounted using Vectashield without DAPI, and examined with Zeiss Axioplan 2 confocal microscope. Images were analyzed using the Metaphor software package.

Results

We have analyzed the coding region of *SOX10* in 196 HSCR patients using dHPLC and QMF-PCR technology. We failed to detect any gene-dosage anomalies in our HSCR cases; however, a total of 12 sequence variants were detected (Table 1). Ten out of 12 variants consisted of synonymous, intronic changes, or variants located in the untranslated regions of the gene. Because those variants generate no alteration at the protein sequence level, it was more probable that their pathogenic mechanism, if any, would affect transcript stability or RNA splicing. However, we found no evidences for those variants to produce any alteration of transcriptional and/or splicing processes when they were submitted to several splice sites and transcription factors binding sequences prediction interfaces (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html; http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/promoter.html; <http://www.ebi.ac.uk/asd-srv/wb.cgi>).

The most interesting findings in the present study are two novel *SOX10* mutations, c.112_131del and c.153–155del. Both of those heterozygous mutations cause a frameshift that alters the mRNA sequence, generating a totally different protein sequence starting at positions 38 and 52, respectively. In addition, the mutations introduce premature termination codons at positions 58 and 108, respectively. As a result, both of those truncating proteins are lacking the HMG DNA-binding domain, the two independent nuclear localization signals within this domain, and the C-terminal transactivating domain (Fig. 1) essential for the protein function. One of the two mutations (c.112_131del) was detected as a de novo event in a female WS4 patient. More interesting is the finding of the mutation c.153–155del in a male patient presenting with isolated short-segment HSCR. As long as this is the first report of a

Table 1 *SOX10* sequence variants detected in the present study

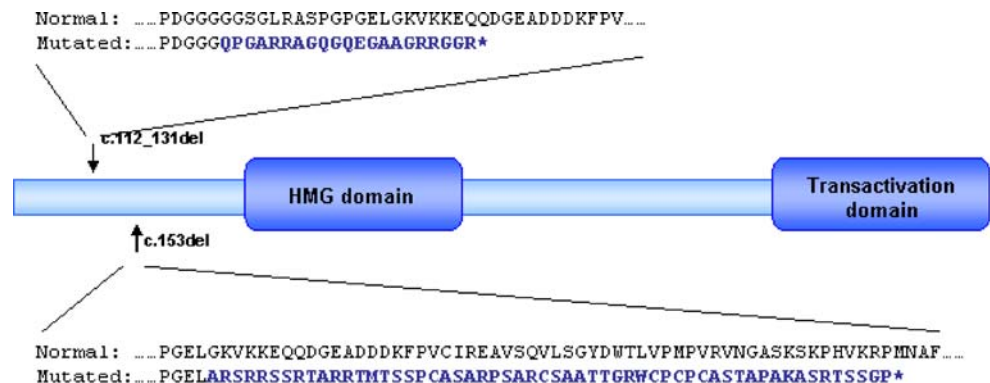
Nucleotide change	Amino acid change	Novel/previously described	Allelic frequency in control population (%)
c.-84-55G>T		Novel	0
c.-84-54G>A		Novel	0
c.-20C>G		Novel	0
c.18C>T	D6D	Novel	4.95
c.112_131del	G38Qfs21X	Novel	0
c.153–155del	G52Afs56X	Novel	0
c.249C>T	Y83Y	Novel	0.50
c.684C>T	P228P	Novel	0
c.822C>T	G274G	Novel	0
c.927T>C	H309H	Previously described rs139884	56.98
c.1257T>C	S419S	Novel	0
c.*131G>A		Novel	0

truncating *SOX10* mutation in an isolated HSCR case, a more detailed inspection of the whole clinical data of the patient at the age of 15 was fulfilled. This examination failed to detect any other phenotypic features such as pigmentary abnormalities, chronic intestinal pseudo-obstruction, microcornea, coloboma, nerve lesions, peripheral demyelinating neuropathy, or central dysmyelinating leukodystrophy associated with *SOX10* mutations [17, 18]. Heterochromia irides were also discarded as both eyes were brown. To rule out any slight loss of hearing in this patient with no auditory problems, an auditory brainstem response was performed demonstrating no sensorineural deafness in this patient. Mutation c.153–155del was inherited from his unaffected mother. No additional point mutations were detected in this patient in other HSCR susceptibility genes, namely, *RET*, *GDNF*, *NRTN*, *PSPN*, *ARTN*, *EDNRB*, *EDN3*, *NTF3*, *NTRK3*, or *PHOX2B*.

To test the functional consequences of the two mutations reported here, we first attempted to visualize the localization of the protein SOX10, WT and mutants within the cell. We introduced the two mutations independently into the *SOX10* cDNA and performed immunofluorescence experiments on HeLa cells transiently transfected with WT and

each of the mutant construct. The results revealed aberrant localization of both mutant proteins into the cytoplasm, in contrast to WT protein located only in the nucleus (Fig. 2). Due to the small protein size of the two mutants and in order to avoid a possible misrecognition of the antibody used, we replicate the experiments using the Myc-SOX construction and the same results were observed (Fig. 2). Mutant proteins could be also localized in the nucleus, as it was expected due to small protein size. Proteins below 40 kDa are known to cross the nuclear pores complexes via passive diffusion [21]. The molecular mass of our two mutants were predicted to be 5.76 and 10.67 kDa, respectively, by Compute pI/Mw tool ExPASy (http://expasy.org/tools/pi_tool-ref.html), explaining the presence of the mutants in the nucleus. To confirm that the mutant proteins present in the nucleus were not functional, we analyzed the transactivation capacity of both mutants on two promoters previously shown to contain monomeric or dimeric SOX10 binding sites, MITF and Cx32, respectively [5, 6]. Cotransfection of either promoter with WT, c.112_131del, or c.153–155del *SOX10* mutants and/or *SOX10* cofactors (PAX3 and EGR2) revealed that both mutants failed to transactivate these reporter construct,

Fig. 1 *SOX10* protein. Representation of *SOX10* protein with the transactivation domain and the HMG box, which shows the sequences for the two frameshift mutations found in a WS4 and isolated HSCR patients, respectively



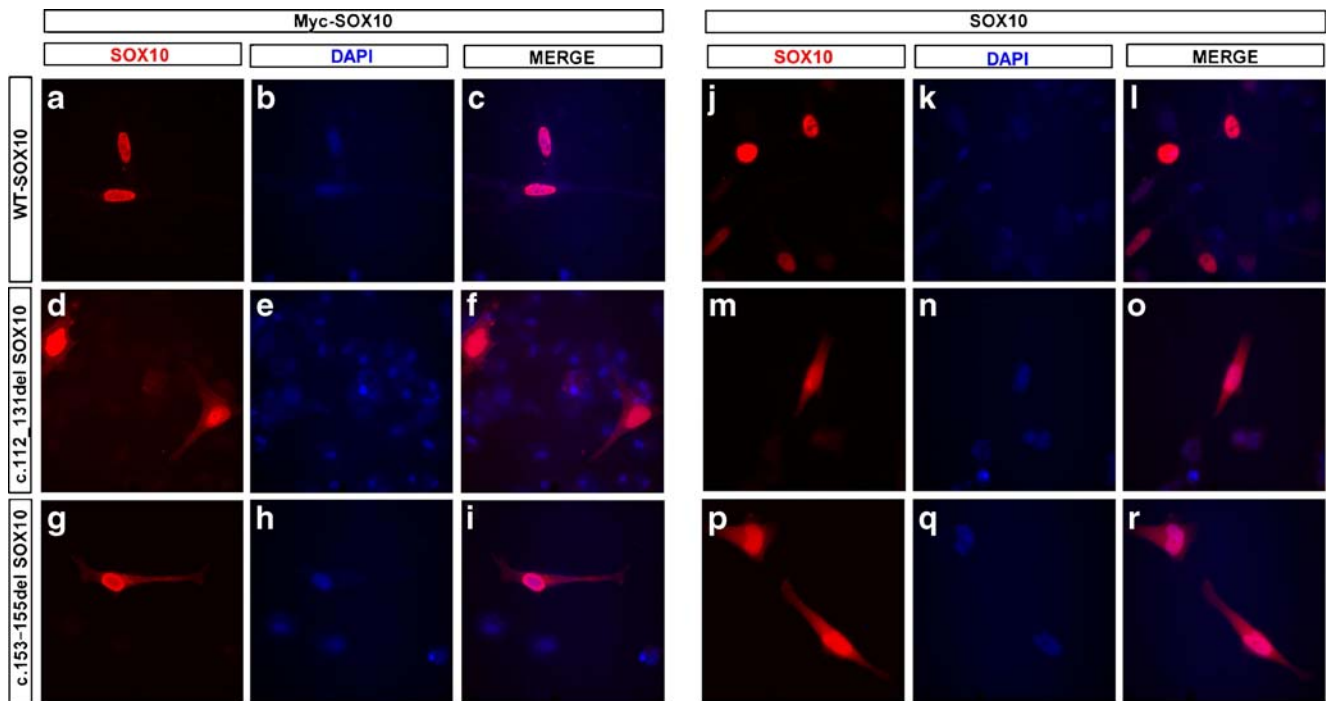


Fig. 2 Subcellular localization of WT and mutant SOX10 proteins in transfected cells. SOX10 expression is detected in *red* and DAPI fluorescence reveals nuclei in *blue* in HeLa cells transfected with WT

or mutant (c.112_131del and c.153–155del) Myc-SOX10 and SOX10 expression vectors

alone or in synergy with the cofactors, as promoter activation was drastically reduced (Fig. 3a, b). To determine the ability of SOX10 mutant proteins to interfere with WT SOX10 function, we also we carried out competition assays by cotransfecting mutant and WT SOX10-expressing vectors together with the pGL3-Cx32 reporter plasmid. As previously described, E189X mutant decreased the transcriptional activity of the WT protein [18] in a dose-dependent manner. However, the two mutants reported here showed no such effect (Fig. 3c). Their lack of dominant negative activity may explain why they are associated with a weaker phenotype.

Discussion

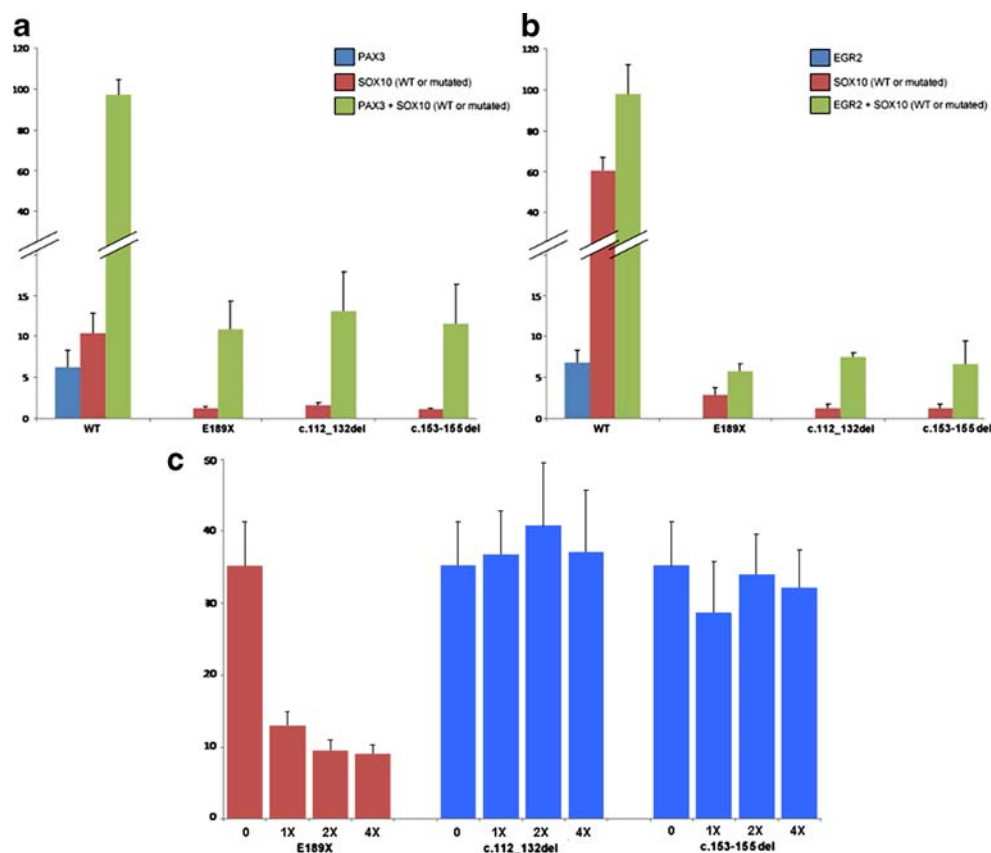
All the members of the Sox protein family contain a HMG box as their DNA-binding domain. This HMG box contains three α -helical regions arranged in a twisted L shape for sequence-specific recognition, leading to a large conformational change in the DNA. Two independent nuclear localization signals in the protein are located at the extremities of this DNA-binding domain [3]. SOX10 protein also includes a transactivation domain, a sequence of 113 amino acids in the carboxyl-terminal region, required for transcriptional activation [3]. Several in vitro studies have shown the functional consequences of different SOX10 mutations located all over its coding sequence, as no hot spots have been found for mutations at this *locus* [3,

17, 18, 22, 23]. Most of nonsense mutations affecting the first few exons of the gene encode small aberrant mRNAs that are eliminated before translation, generating haploinsufficiency due to nonsense-mediated decay (NMD) of truncated mRNA, leading to the WS4 phenotype [17, 18, 23]. In contrast, mutations affecting the last exon, which encode the transactivation domain, escape this mechanism and show a dominant negative effect resulting in more severe PCWH phenotype [18]. However, the recent observation of whole SOX10 deletions in patients presenting with PCWH suggests that mechanisms other than NMD might explain phenotype variability [16].

The two frameshift mutations reported here are lacking all functional domains, since WT sequence protein expands only to positions 37 and 52, respectively. Our in vitro functional assays demonstrate not only that mutant proteins have an aberrant cytosolic localization, but also that transactivation and dominant negative activities are absent in the two mutants tested. Therefore, we propose haploinsufficiency as the most plausible mechanism leading to WS4 and isolated HSCR in the two respective patients.

The association between syndromic HSCR and SOX10 gene has been well established, since most of the patients harboring heterozygous mutation at this locus present with HSCR as a part of their clinical features. In fact, very few patients with a mutation at SOX10 not presenting with HSCR or other enteric phenotypes have been reported [13, 16, 22, 24–26], although SOX10 mutations show a wide

Fig. 3 Transactivation capacity of WT and mutant SOX10 proteins. The *MITF* promoter (pMITF; **a**) or the *GJB1* promoter (pCx32; **b**) luciferase reporters were transfected in HeLa cells in combination with WT or mutant SOX10 proteins (c.112_131del, c.153–155del, and E189X) and/or PAX3 (**a**) or EGR2 (**b**). Competition assays were performed by increasing amounts (1X, 2X, and 4X) of mutant SOX10 expression plasmid (E189X, c.112_131del, and c.153–155del) that were mixed with a fixed amount of WT SOX10 expression plasmid and cotransfected with the *GJB1* promoter luciferase reporter plasmid (**c**). Reporter gene activations are presented as fold induction relative to the empty expression vector (pECE). Results represent the mean \pm standard error of the mean from three experiments, each performed in duplicate



phenotypic heterogeneity. Interestingly, for these patients with isolated WS features (WS2), tissue-specific compensation in the enteric nervous system (ENS) by other SOX family proteins has been suggested, so that *SOX10* mutations could only affect a certain portion of neural crest-derived cells. Other genes, responsible for the WS4 phenotype, have shown to produce the HSCR phenotype alone, as it occurs in patients with heterozygous mutations in *EDNRB* and *EDN3* genes [27–30]. Nonetheless, no mutation at the *SOX10* gene has been found in an isolated HSCR patient until now. This finding suggests that *SOX10* mutations responsible for central and peripheral myelin disorders without clinical features of WS or enteric alteration might be found in those patients despite the negative results found so far [31].

The c.153–155del mutation presented here is the first *SOX10* mutation reported in an isolated HSCR patient without any other additional WS feature. It is difficult to explain how the mutation in this patient might affect the portion of neural crest-derived cells colonizing the gut, responsible for ENS formation, and not other neural crest-derived tissues. The possibility for the patient to be a mosaic seems unlikely, as the mutation was inherited from his healthy mother who shows no clinical features of WS or HSCR phenotypes after a careful anamnesis and detailed clinical examination. The lack of clinical symptoms for the mother could be explained by the sex-dependent penetrance

of mutations generally observed in HSCR. Another possibility to explain this phenomenon could be a germline mosaicism for the mother, although the mother refused to be tested for that possibility; in any case, this phenomenon would not explain the penetrance of her condition but rather affect the recurrence risk of the family.

The lack of symptoms suggestive of WS in the HSCR patient harboring a *SOX10* mutation might be also explained by the nature of the mutation itself. It was demonstrated that mutations leading to a truncation of the SOX10 protein before the HMG domain, rather than having a dominant negative effect, are functionally equivalent to a null mutation and generate haploinsufficiency in the cell [18]. These mutations tend to be correlated with milder HSCR and WS phenotypes, and this could be the case for the c.153–155del. Haploinsufficiency could be more dramatic in the ENS development than in other neural crest derivatives (melanocytes of the skin or inner ear) in which the reduced amount of normal protein might be supplied by a redundant function in other members of SOX protein family with a differential expression pattern, such as SOX8, LSox5, or SOX22 [32]. In fact, functional redundancy between SoxE group of genes (SOX8, SOX9, and SOX10) has been proposed. Moreover, loss of function of Sox8 gene in Sox10 heterozygous mouse embryos increases penetrance and severity of colon aganglionosis [33]. This is the first time that a *SOX10* mutation do not give rise to any

feature suggestive of WS, so that additional phenomena might be occurring in this patient to explain the distinct phenotype observed, such as an enhanced expression of the WT allele in the nonaffected tissues. In addition, given that HSCR is the paradigm of a complex and polygenic disease, we could also propose an involvement of other modifier genes still unidentified, that together with SOX10 would act to produce isolated enteric phenotype.

In summary, the most relevant result of our study has been the detection of a *SOX10* mutation in a patient presenting with isolated HSCR, which points out the association of this gene with the pathogenesis of HSCR per se, not only as a part of a syndromic trait. This finding gives a new perspective of the SOX10 role in HSCR and constitutes a new step towards the dissection of the polygenic nature of this disease.

Acknowledgments We would like to thank all the patients who participated in the study as well as their families for their collaboration. This study was funded by Fondo de Investigación Sanitaria, Spain (PI070080 and PI071315 for the E-Rare project) and Consejería de Innovación Ciencia y Empresa (CTS 2590). The CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of the ISCIII. ASM is predoctoral fellow founded by Instituto de Salud Carlos III, Spain.

Competing interests None.

References

- Pevny LH, Lovell-Badge R (1997) Sox genes find their feet. *Curr Opin Genet Dev* 7:338–344
- Wegner M (1999) From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res* 27:1409–1420
- Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M (1998) Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci* 18:237–250
- Kamachi Y, Cheah KS, Kondoh H (1999) Mechanism of regulatory target selection by the SOX high-mobility-group domain proteins as revealed by comparison of SOX1/2/3 and SOX9. *Mol Cell Biol* 19:107–120
- Bondurand N, Pingault V, Goerich DE, Lemort N, Sock E, Le Caignec C, Wegner M, Goossens M (2000) Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Hum Mol Genet* 9:1907–1917
- Bondurand N, Girard M, Pingault V, Lemort N, Dubourg O, Goossens M (2001) Human Connexin 32, a gap junction protein altered in the X-linked form of Charcot–Marie–Tooth disease, is directly regulated by the transcription factor SOX10. *Hum Mol Genet* 10:2783–2795
- Peirano RI, Wegner M (2000) The glial transcription factor Sox10 binds to DNA both as monomer and dimer with different functional consequences. *Nucleic Acids Res* 28:3047–3055
- Lang D, Epstein JA (2003) Sox10 and Pax3 physically interact to mediate activation of a conserved c-RET enhancer. *Hum Mol Genet* 12:937–945
- Ludwig A, Rehberg S, Wegner M (2004) Melanocyte-specific expression of dopachrome tautomerase is dependent on synergistic gene activation by the Sox10 and Mitf transcription factors. *FEBS Lett* 556:236–244
- Zhu L, Lee HO, Jordan CS, Cantrell VA, Southard-Smith EM, Shin MK (2004) Spatiotemporal regulation of endothelin receptor-B by SOX10 in neural crest-derived enteric neuron precursors. *Nat Genet* 36:732–737
- Murisier F, Guichard S, Beermann F (2007) The tyrosinase enhancer is activated by Sox10 and Mitf in mouse melanocytes. *Pigment Cell Res* 20:173–184
- Le Douarin NM, Kalcheim C (1999) The neural crest. Cambridge University Press, Cambridge
- Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, Goerich DE, Préhu MO, Puliti A, Herbarth B, Hermans-Borgmeyer I, Legius E, Matthijs G et al (1998) SOX10 mutations in patients with Waardenburg–Hirschsprung disease. *Nat Genet* 18:171–173
- Read AP, Newton VE (1997) Waardenburg syndrome. *J Med Genet* 34:656–665
- Pingault V, Guiochon-Mantel A, Bondurand N, Faure C, Lacroix C, Lyonnet S, Goossens M, Landrieu P (2000) Peripheral neuropathy with hypomyelination, chronic intestinal pseudo-obstruction and deafness: a developmental “neural crest syndrome” related to a SOX10 mutation. *Ann Neurol* 48:671–676
- Bondurand N, Dastot-Le Moal F, Stanchina L, Collot N, Baral V, Marlin S, Attié-Bitach T, Giurgea I, Skopinski L, Reardon W et al (2007) Deletions at the SOX10 gene locus cause Waardenburg syndrome types 2 and 4. *Am J Hum Genet* 81:1169–1185
- Verheij JB, Sival DA, van der Hoeven JH, Vos YJ, Meiners LC, Brouwer OF, van Essen AJ (2006) Shah–Waardenburg syndrome and PCWH associated with SOX10 mutations: a case report and review of the literature. *Eur J Paediatr Neurol* 10:11–17
- Inoue K, Khajavi M, Ohyama T, Hirabayashi S, Wilson J, Reggin JD, Mancias P, Butler IJ, Wilkinson MF, Wegner M et al (2004) Molecular mechanism for distinct neurological phenotypes conveyed by allelic truncating mutations. *Nat Genet* 36:361–369
- Sham MH, Lui V, Chen B, Fu M, Tam P (2001) Novel mutations of SOX10 suggest a dominant negative role in Waardenburg–Shah syndrome. *J Med Genet* 38:E30
- Girard M, Goossens M (2006) Sumoylation of the SOX10 transcription factor regulates its transcriptional activity. *FEBS Lett* 580:1635–1641
- Görlich D, Mattaj IW (1996) Nucleocytoplasmic transport. *Science* 271:1513–1518
- Bondurand N, Kuhlbrodt K, Pingault V, Enderich J, Sajus M, Tommerup N, Warburg M, Hennekam RC, Read AP, Wegner M et al (1999) A molecular analysis of the yemenite deaf-blind hypopigmentation syndrome: SOX10 dysfunction causes different neurocristopathies. *Hum Mol Genet* 8:1785–1789
- Hilleren P, Parker R (1999) Mechanisms of mRNA surveillance in eukaryotes. *Annu Rev Genet* 33:229–260
- Pingault V, Girard M, Bondurand N, Dorkins H, Van Maldergem L, Mowat D, Shimotake T, Verma I, Baumann C, Goossens M (2002) SOX10 mutations in chronic intestinal pseudo-obstruction suggest a complex physiopathological mechanism. *Hum Genet* 111:198–206
- Touraine RL, Attié-Bitach T, Manceau E, Korsch E, Sarda P, Pingault V, Encha-Razavi F, Pelet A, Augé J, Nivelon-Chevallier A et al (2000) Neurological phenotype in Waardenburg syndrome type 4 correlates with novel SOX10 truncating mutations and expression in developing brain. *Am J Hum Genet* 66:1496–1503
- Sznajder Y, Coldéa C, Meire F, Delpierre I, Sekhara T, Touraine RL (2008) A de novo SOX10 mutation causing severe type 4 Waardenburg syndrome without Hirschsprung disease. *Am J Med Genet* 146A:1038–1041
- Svensson PJ, Tapper-Persson M, Anvret M, Molander ML, Eng C, Nordenskjöld A (1999) Mutations in the endothelin-receptor B gene in Hirschsprung disease in Sweden. *Clin Genet* 55:215–217
- Attié T, Till M, Pelet A, Amiel J, Edery P, Boutrand L, Munnich A, Lyonnet S (1995) Mutation of the endothelin-receptor B gene in Waardenburg–Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 4:2407–2409

29. Ederly P, Attié T, Amiel J, Pelet A, Eng C, Hofstra RM, Martelli H, Bidaud C, Munnich A, Lyonnet S (1996) Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg–Hirschsprung disease (Shah–Waardenburg syndrome). *Nat Genet* 12:442–444
30. Hofstra RMW, Osinga J, Tan-Sindhunata G, Wu Y, Kamsteeg EJ, Stulp RP, van Ravenswaaij-Arts C, Majoor-Krakauer D, Angrist M, Chakravarti A et al (1996) A homozygous mutation in the endothelin-3 gene associated with a combined Waardenburg type 2 and Hirschsprung phenotype (Shah–Waardenburg syndrome). *Nat Genet* 12:445–447
31. Pingault V, Bondurand N, Le Caignec C, Tardieu S, Lemort N, Dubourg O, Le Guern E, Goossens M, Boespflug-Tanguy O (2001) The SOX10 transcription factor: evaluation as a candidate gene for central and peripheral hereditary myelin disorders. *J Neurol* 248:496–499
32. Hong CS, Saint-Jeannet JP (2005) Sox proteins and neural crest development. *Semin Cell Dev Biol* 16:694–703
33. Maka M, Scolt CC, Werner M (2005) Identification of Sox8 as a modifier gene in a mouse model of Hirschsprung disease reveals underlying molecular defect. *Dev Biol* 277:155–169