

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**Identificación y caracterización molecular de nuevos loci de
susceptibilidad para la enfermedad de Hirschsprung y el cáncer
medular de tiroides.**

RAQUEL MARÍA FERNÁNDEZ GARCÍA

SEVILLA, 2004

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Memoria realizada en la Unidad Clínica de Genética y Reproducción de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío bajo la dirección de Dña. Salud Borrego López, Doctora en Medicina y la tutoría de D. Antonio J. Palomares Díaz, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla que presenta la Licenciada en Farmacia RAQUEL MARÍA FERNÁNDEZ GARCÍA para optar al grado de Doctor.

El Director,

El Tutor,

Fdo. Salud Borrego López
Doctora en Medicina
Hospitales Universitarios Virgen del Rocío

Fdo. Antonio J. Palomares Díaz
Catedrático de Microbiología
Universidad de Sevilla

Fdo. Raquel María Fernández García

Dedicada a mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quisiera manifestar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado y apoyado durante la realización de esta tesis doctoral.

A la Dra. Salud Borrego, directora de la presente tesis, y al Dr Guillermo Antiñolo, director de esta Unidad, por darme la oportunidad de cumplir mi sueño de introducirme en el mundo de la investigación en Genética Humana y por sus enseñanzas y apoyo.

Al Dr. Antonio Palomares, tutor de esta tesis doctoral en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia, por su cooperación y accesibilidad en todo momento.

A todos mis compañeros de laboratorio, Ana P, Ana V, Irene, Isa, Javi, Javier, José Luis, Maca, Mati y Salud C, por toda su ayuda, pero especialmente por el apoyo anímico que me han brindado en los momentos más difíciles. Mención especial para Irene por sus aportaciones a mi formación y sus sabios consejos; a Ana P por su colaboración en parte del trabajo presentado; a Maca por llevarme cada día al laboratorio y darme ánimos para comenzar el día; a Isa por ser siempre capaz de sacarme una sonrisa; a José Luis por su continua demostración de amistad y cariño.

En especial a Juan Antonio, por estar siempre a mi lado y creer en mí. Sin su ánimo y confianza hubiera sido imposible llegar a este punto.

Muchísimas gracias a todos

Raquel

ÍNDICE

A. INTRODUCCIÓN	1
A.1. Características y función del receptor tirosín-kinasa RET	2
<i>A.1.1. Aspectos moleculares del proto-oncogén RET</i>	2
<i>A.1.2 Estructura de la proteína RET</i>	3
<i>A.1.3 Mecanismo de activación del receptor RET. Formación del complejo multimérico</i>	6
<i>A.1.4 Señalización celular mediada por RET</i>	8
A.1.4.1. Activación de la ruta RAS/ERK	10
A.1.4.2. Activación de la ruta PI-3K/AKT	12
A.1.4.3. Activación de la ruta JNK	13
A.2. Aspectos clínicos y bases moleculares de la neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (MEN 2) y el cáncer medular de tiroides esporádico	13
<i>A.2.1. Clasificación clínica de los síndromes MEN 2</i>	13
<i>A.2.2. Genética de los síndromes MEN 2</i>	14
<i>A.2.3. Etiología del cáncer medular de tiroides esporádico</i>	18
<i>A.2.4. Factores de susceptibilidad genéticos para MTC esporádico</i>	18
A.3. Características clínicas y bases moleculares de la enfermedad de Hirschsprung	20
<i>A.3.1. Concepto y características clínicas de la enfermedad de Hirschsprung</i>	20
<i>A.3.2. Epidemiología de la enfermedad de Hirschsprung</i>	21
<i>A.3.3. Etiopatogenia de la enfermedad de Hirschsprung</i>	23
<i>A.3.4. Genética molecular de la enfermedad de Hirschsprung</i>	24
A.3.4.1. Mutaciones asociadas a la enfermedad de Hirschsprung en genes que participan en su ruta de señalización de RET: <i>RET</i> , <i>GDNF</i> y <i>NTN</i>	24
A.3.4.2. Mutaciones asociadas a la enfermedad de Hirschsprung en los	27

genes de la ruta de señalización de la endotelina: <i>EDNRB</i> , <i>EDN3</i> y <i>ECE1</i>	
A.3.4.3. Asociación de genes codificantes de factores de transcripción o de regulación con HSCR: <i>SOX10</i> , <i>PHOX2B</i> y <i>SIP1</i>	28
A.3.4.4. Identificación de regiones cromosómicas asociadas a HSCR mediante análisis de ligamiento	31
A.3.5. <i>Co-segregación de la enfermedad de Hirschsprung con síndromes MEN 2</i>	32
A.3.6. <i>Factores de susceptibilidad genéticos para las formas esporádicas de HSCR</i>	33
B. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO	38
B.1. Hipótesis de trabajo	39
B.2. Objetivos del estudio	40
C. PACIENTES Y MÉTODOS	41
C.1 Pacientes y controles	42
<i>C.1.1 Pacientes HSCR</i>	42
<i>C.1.2 Pacientes MTC</i>	43
<i>C.1.3 Individuos control</i>	44
<i>C.1.4 Familia MEN 2A/HSCR</i>	44
C.2 Métodos	45
<i>C.2.1 Técnicas generales utilizadas</i>	45
C.2.1.1 Extracción de ADN a partir de sangre periférica	45
C.2.1.2 Espectrofotometría de ADN	48
C.2.1.3 Amplificación de ADN genómico mediante PCR	49
C.2.1.4 Secuenciación semiautomática de los productos de PCR	51
C.2.1.5 Secuenciación automática de los productos de PCR	53

C.2.1.6 Rastreo de mutaciones mediante PCR-SSCP fluorescente	55
C.2.1.7 Rastreo de mutaciones mediante PCR-EMD fluorescente	57
C.2.1.8 Genotipación por PCR-RFLP	59
C.2.1.9 Genotipación espectral por PCR-FRET	59
C.2.1.10 Caracterización de los rearreglos génicos mediante Southern Blot	61
C.2.1.11 Tratamiento estadístico de los datos. Estudios de casos y controles	67
<i>C.2.2 Análisis molecular de la variante S836S de RET</i>	70
<i>C.2.3 Rastreo mutacional de los exones 10, 11, 13, 14, 15 y 16 del proto-oncogén RET en los pacientes MTC</i>	71
<i>C.2.4 Rastreo mutacional del gen GFRA4 en la cohorte HSCR. Análisis molecular de los polimorfismos identificados</i>	72
<i>C.2.5 Análisis molecular de las variantes de secuencia de los genes GFRA1 GFRA2 y GFRA3</i>	73
<i>C.2.6 Acotamiento de una deleción del gen GFRA1 en una familia HSCR</i>	76
C.2.6.1 Análisis de marcadores microsatélites en <i>GFRA1</i>	76
C.2.6.2 Análisis por Southern Blot	78
<i>C.2.7 Rastreo mutacional del intrón 1 y región 5'UTR del proto-oncogén RET</i>	79
<i>C.2.8 Análisis molecular de los polimorfismos localizados en el intrón 1 y la región 5' de RET</i>	81
C.2.8.1 Análisis de la variantes localizadas en el extremo 3' del intrón 1	82
C.2.8.2 Análisis del resto de polimorfismos intrónicos y de las dos variantes de la región 5' de <i>RET</i>	83

D. RESULTADOS	87
D.1. Identificación de una nueva mutación en el proto-oncogén <i>RET</i> asociada al cáncer medular de tiroides familiar (FMTC)	88
D.2. Estudio de asociación de la variante S836S (c.2439C>T) del proto-oncogén <i>RET</i> al cáncer medular de tiroides esporádico	89
D.3. Evaluación de <i>GFRA4</i> como gen de susceptibilidad para HSCR	90
D.4. Evaluación de variantes de secuencia de los genes <i>GFRA1</i> , <i>GFRA2</i> y <i>GFRA3</i> como factores de susceptibilidad para HSCR esporádico	91
D.5. Identificación de una deleción dentro del gen <i>GFRA1</i> en una familia HSCR	96
D.6. Evaluación de variantes de secuencia de los genes <i>GFRA1</i> , <i>GFRA2</i> y <i>GFRA3</i> como factores de susceptibilidad para MTC esporádico	99
D.7. Identificación de loci de susceptibilidad en el intrón 1 de <i>RET</i> para HSCR y para MTC	102
<i>D.7.1. Caracterización molecular del intrón 1 de RET mediante herramientas bioinformáticas</i>	102
<i>D.7.2. Análisis del extremo 3' del intrón 1 de RET.</i>	103
D.7.2.1 Identificación de 3 nuevos SNPs en el extremo 3' del intrón	103
D.7.2.2 Estudios de asociación entre los 3 SNPs intrónicos y HSCR o MTC esporádico	106
D.7.2.3 Análisis de haplotipos constituidos por la combinación de los 3 SNPs intrónicos	108
D.7.2.4 Análisis de haplotipos formados por la combinación de los 3 SNPs intrónicos y los 7 cSNPs de <i>RET</i> . Evidencia de la existencia de un nuevo locus fundador para HSCR	111

D.7.2.5 Asociación de IVS1-126G>T y el haplotipo 2 de RET a MTC esporádico en otra serie diferente de pacientes	111
<i>D.7.3. Análisis de la secuencia completa del intrón 1 de RET</i>	112
D.7.3.1 . Identificación de nuevos polimorfismos a lo largo del intrón 1	112
D.7.3.2 Estudios de asociación entre las variantes encontradas y los haplotipos constituidos por su combinación, y HSCR: Evidencia de ruptura del desequilibrio de ligamiento en la región 5' que limita con <i>RET</i> .	115
D.7.3.3 Estudios de asociación entre las variantes encontradas y MTC esporádico	121
D.8. Análisis molecular de <i>RET</i> en la familia MEN 2A/HSCR: Exclusión de la mutación C620S como causa del fenotipo HSCR	122
E. DISCUSIÓN	125
E.1. Identificación de una nueva mutación germinal, c.2304G>T, en el exón 13 del proto-oncogén <i>RET</i> . Implicación de este cambio en la patogénesis del cáncer medular de tiroides familiar	126
E.2. Análisis de polimorfismos genéticos como factores de susceptibilidad para el desarrollo de cáncer medular de tiroides esporádico	127
<i>E.2.1. Asociación de la variante S836S del proto-oncogén RET a MTC esporádico</i>	127
<i>E.2.2. Evaluación de variantes de secuencia de los genes GFRA1, GFRA2 y GFRA3 como factores de susceptibilidad para MTC esporádico</i>	129
E.3. Búsqueda de mutaciones germinales en <i>GFRA4</i> asociadas al fenotipo HSCR y evaluación del papel de polimorfismos de <i>GFRA1</i> , <i>GFRA2</i> , <i>GFRA3</i> y <i>GFRA4</i> en la aparición de la enfermedad	130
E.4. Identificación de un nuevo locus de susceptibilidad para HSCR en el proto-oncogén <i>RET</i>	132

E.5. Identificación de un nuevo locus de susceptibilidad para MTC esporádico en el proto-oncogén <i>RET</i>	135
E.6. Exclusión de la mutación C620S de <i>RET</i> como causante del fenotipo HSCR en una familia MEN 2A /HSCR	136
F. CONCLUSIONES	139
G. REFERENCIAS	141

A. INTRODUCCIÓN

A.1. Características y función del receptor tirosín-kinasa RET.

A.1.1. Aspectos moleculares del proto-oncogén RET.

El proto-oncogén *RET* es un gen que codifica para la proteína RET, un receptor de membrana con actividad tirosín-kinasa que se expresa en tejidos y tumores derivados de la cresta neural (Takahashi y cols, 1985, 1987, 1988; Santoro y cols, 1990; Nakamura y cols, 1994). Como su propio acrónimo sugiere, *RET* (REarranged during Transfection) fue clonado por primera vez por Takahashi y cols en 1985 como un oncogén quimérico, durante un ensayo clásico de transformación de células NIH 3T3 con ADN procedente de linfoma humano.

RET se localiza en la región cromosómica 10q11.2 (Ishizaka y cols, 1989) con una orientación 5' centromérica / 3' telomérica (Pasini y cols, 1995a). Su estructura genómica se ha podido determinar mediante diferentes estrategias (Kwok y cols, 1993; Ceccherini y cols, 1994; Pasini y cols, 1995a; Myers y cols, 1995) y hoy día se sabe que consta de 21 exones distribuidos a lo largo de 60 kilobases, resaltando que alrededor del 40% de su secuencia genómica corresponde a un inmenso intrón de 23 kb ubicado entre los exones 1 y 2.

El ARN mensajero de *Ret* ha sido ampliamente estudiado en roedores y se ha observado que su patrón de expresión está finamente regulado durante el desarrollo embrionario, apareciendo unas tasas de expresión superiores en los estadios iniciales. Durante esos estadios iniciales, *Ret* se expresa primariamente en la cresta neural, sistemas nerviosos central y periférico y sistema excretor, donde está implicado en el desarrollo, migración y supervivencia celular (Pachnis y cols, 1993; Avantaggiato y cols, 1994; Schuchardt y cols, 1994; Tsuzuki y cols, 1995). En consonancia con su patrón de expresión, se ha visto que los ratones a los que se les provoca un bloqueo de la expresión de *Ret* durante su desarrollo embrionario (*Ret* "knockout"), carecen de nervios entéricos y ganglios cervicales superiores y presentan agenesia o disgenesia renal (Schuchardt y cols, 1994; Durbec y cols, 1996). Además, en base a esos estudios realizados en los ratones mutantes, se pudo demostrar que la mayor parte del sistema nervioso entérico y los ganglios cervicales superiores se originan a partir de un pequeño grupo de células de la cresta neural derivadas del rombencéfalo en un proceso que

depende del funcionamiento de Ret (Durbec y cols, 1996). También se han realizado estudios de expresión en tejido adulto de rata, observándose bajos niveles de expresión en pulmón, corazón, bazo, e intestino delgado, y altos niveles en cerebro, timo y testículo (Tahira y cols, 1988).

En cuanto a estudios en humanos, la expresión de *RET* se detectó inicialmente en tumores derivados de la cresta neural tales como neuroblastoma, feocromocitoma y carcinoma medular de tiroides (Ikeda y cols, 1990; Santoro y cols, 1990; Takahashi y cols, 1991). Actualmente, la información sobre los perfiles de expresión de *RET* en tejidos sanos humanos está disponible en diversas bases de datos, entre las que se encuentra *GeneNote* (Gene Normal Tissue Expression), que recoge los resultados de los experimentos realizados por el Weizmann Institute of Science, basados en la tecnología “DNA array” (http://genecards.weizmann.ac.il/cgi-bin/genenote//GN_search.pl).

La importancia clínica de *RET* radica en su implicación en ciertas enfermedades humanas, tal como se describirá más adelante. Así por ejemplo, una proporción de casos de carcinoma papilar de tiroides son debidos a translocaciones somáticas que implican a *RET* y a otros genes activadores. También se han encontrado mutaciones somáticas de *RET* en un porcentaje de casos de cáncer medular de tiroides. Por último, mutaciones germinales que conducen a una ganancia de función del receptor son causantes de los síndromes de neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (MEN 2; “*Multiple Endocrine Neoplasia type 2*”), mientras que mutaciones que conllevan una pérdida de función originan la enfermedad de Hirschsprung (HSCR).

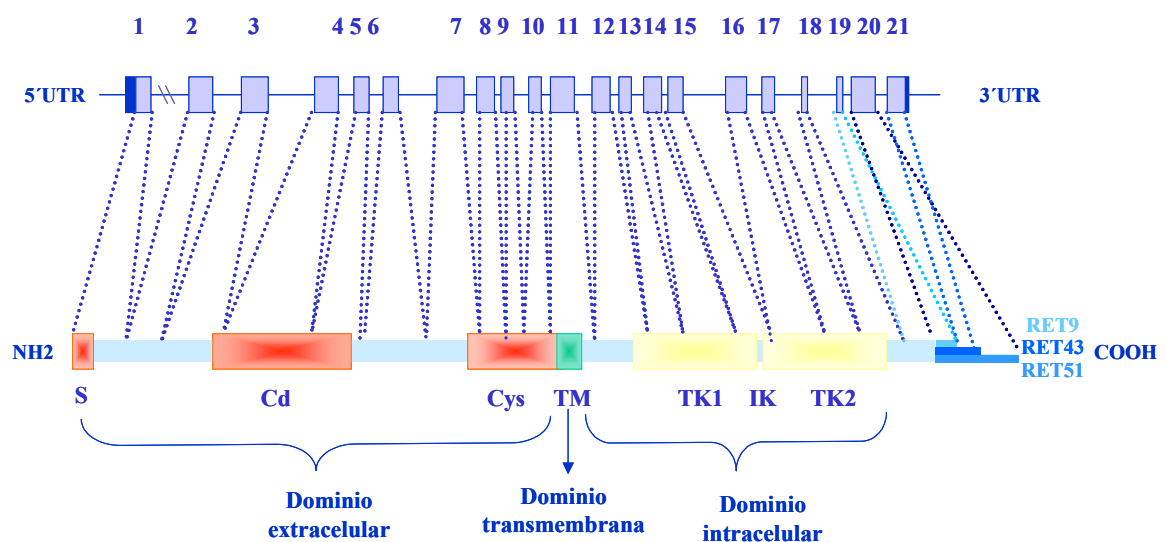
A.1.2. Estructura de la proteína RET.

Estructuralmente, la proteína RET es una molécula relativamente grande con un peso molecular de alrededor de 124 Kdaltons. Como la mayoría de los miembros de la familia de receptores tirosín kinasa (RTK), RET contiene un dominio extracelular, un dominio transmembrana, y un dominio intracelular (Figura A.1).

El dominio extracelular no presenta homología con ningún otro receptor tirosín-kinasa (Takahashi y cols, 1988, 1989). Incluye un péptido señal constituido por 28 aminoácidos, así como una región con alta homología a la familia de moléculas de adhesión intercelular cadherinas, y una región rica en cisteínas. Veintisiete de los 28 residuos cisteínicos de dicha región se conservan 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 de la proteína (Takahashi y cols, 1989; Schneider, 1992; Iwamoto y cols, 1993). Recientemente se han realizado estudios bioinformáticos para profundizar en el conocimiento de la estructura molecular del dominio extracelular de RET. En uno de esos estudios se ha encontrado que en total hay 4 dominios diferentes con homología a cadherinas, y que entre el segundo y el tercer dominio hay un sitio de unión a Ca^{2+} (Anders y cols, 2001).

Figura A.1. Esquema de la estructura genómica del proto-oncogén *RET* y de su correspondiente proteína. Se muestran cada una de las isoformas de la proteína RET resultantes de la maduración alternativa del extremo 3' de *RET*.



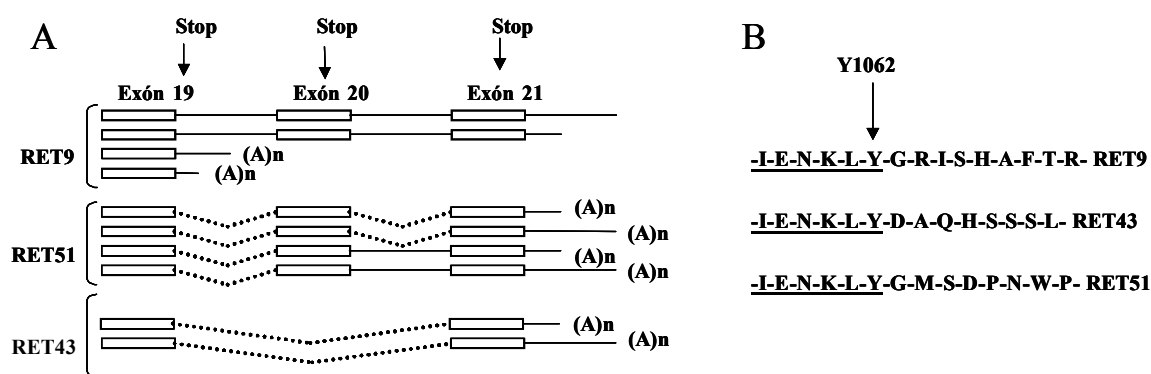
S: Péptido señal; Cd: Región con homología a cadherinas; Cys: Dominio rico en cisteínas; TM: Dominio transmembrana; TK1 y TK2: Dominios tirosín-kinasa; IK: Región entre los dominios tirosín-kinasa.

El dominio intracelular incluye al dominio con actividad tirosín-kinasa, donde reside la actividad catalítica del receptor, que se encuentra interrumpido por una región intermedia de 27 aminoácidos. Este dominio tirosín-kinasa se activa mediante la fosforilación de determinados residuos tirosínicos, desencadenando la activación de

ciertas rutas de señalización celular. Se han encontrado ciertas similitudes entre el dominio tirosín-kinasa de RET y el de los receptores de los factores de crecimiento derivados de plaquetas (Hanks y cols, 1988).

Existen varios transcritos distintos generados por la maduración alternativa del extremo 3' de *RET*, y que a su vez dan lugar a tres isoformas proteicas que difieren en su extremo carboxi-terminal (Tahira y cols, 1990; Myers y cols., 1995) (Figuras A.1 y A.2).

Figura A.2. Patrón de maduración del ARN mensajero de *RET*.



A). Los distintos transcritos de *RET* proceden de la combinación de exones alternativos en el extremo 3', y del uso de diferentes sitios de poliadenilación. (A)_n: cola de poliadeninas; línea continua: intrones presentes en el transcrito; línea punteada: intrones ausentes. B) Secuencia aminoacídica que rodea a la tirosina 1062 en las tres isoformas proteicas de RET.

Una serie de hechos indican que estas isoformas, conocidas como RET9 (1072 aa), RET43 (1106 aa) y RET51 (1114 aa), presentan distintas propiedades biológicas y bioquímicas. (i) Se ha demostrado que la tirosina Y1062 juega un papel importante en la señalización celular mediada por RET (Takahashi, 2001; Couplier y cols, 2002). Y1062 representa un sitio de unión para varias moléculas adaptadoras tales como SHC, SNT/FRS2, IRS1, DOK1, DOK4, DOK5 y Enigma (Kurokawa y cols, 2003). Como consecuencia, varias rutas de señalización entre las que se encuentran las de RAS/ERK, PI-3K/AKT, p38MAPK, JNK y ERK5, se activan principalmente a través de la fosforilación de Y1062. Pues bien, el contexto en el que se encuentra esta tirosina es

diferente en cada isoforma proteica, variando consiguientemente la afinidad de unión de las distintas moléculas efectoras. (ii) Por otra parte, RET51 presenta residuos tirosínicos adicionales que están ausentes en RET9 y RET 43. Uno de ellos es Y1096, que proporciona un sitio de unión para la molécula adaptadora GRB2. (iii) Por último, se ha comprobado que hay diferencias notorias en la expresión de las isoformas durante el desarrollo embrionario. Así por ejemplo, la cantidad relativa de transcritos de RET51 está fuertemente regulada durante el desarrollo del riñón. En este tejido, la expresión de la isoforma RET51 es muy baja en comparación con la de RET9 durante las primeras semanas de gestación, pero posteriormente aumenta rápidamente hasta multiplicarse por siete (Ivanchuk y cols, 1998). Como consecuencia de todo esto se piensa que las distintas isoformas de RET podrían jugar diferentes papeles en el desarrollo y/o en los procesos tumorigénicos en que se ha visto que RET es partícipe.

A.1.3. Mecanismo de activación del receptor RET. Formación del complejo multimérico.

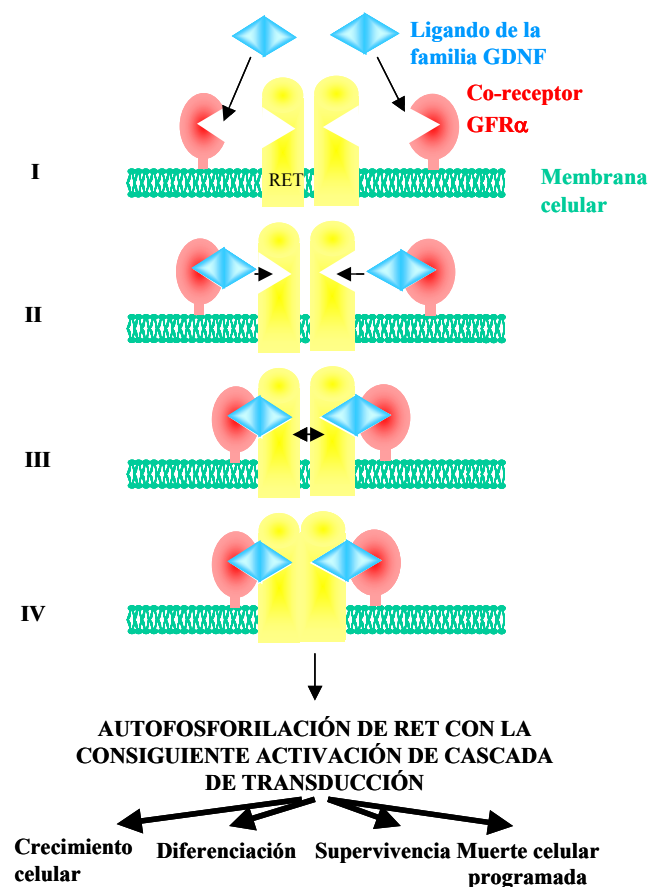
A diferencia de otros RTKs de mamíferos, la activación de la proteína RET requiere la previa formación de un complejo heterotetramérico, en el que participan miembros de dos grupos distintos de proteínas: un ligando soluble de la familia de factores neurotróficos derivados de la glía ("*Glial Derived Neurotrophic Factors*", GDNF), y un co-receptor unido a la superficie celular de la familia de receptores α de GDNF.

Los ligandos GDNF son miembros de la subfamilia TGF- β (Lin y cols, 1993) y se ha visto que todos ellos actúan como potentes factores de supervivencia neuronal (Baloh y cols, 2000). Hasta la fecha se han identificado 4 miembros pertenecientes a esta familia, que son GDNF, neurturina (NTN), artemina (ART) y persefina (PSP). Todos estos factores contienen un nodo cisteínico constituido por siete residuos cisteínicos conservados y espaciados de forma similar, y aproximadamente el 40% de su secuencia aminoacídica es idéntica. Se ha observado que GDNF, NTN y ART están implicados en la supervivencia de un amplio espectro de neuronas tanto periféricas como centrales, mientras que PSP participa en la supervivencia de neuronas

dopaminérgicas motoras y de la sustancia nigra tanto *in vivo* como *in vitro*, pero no en la de neuronas periféricas (Takahashi, 2001).

Aunque los cuatro miembros de la familia GDNF actúan como ligandos de RET, no se unen directamente a este receptor sino que han de interaccionar previamente con un co-receptor de la familia GFR α (Figura A.3).

Figura A.3. Activación del receptor RET por parte de los miembros de la familia GDNF.



Estos co-receptores no tienen dominios intracelulares, sino que se encuentran anclados a la membrana celular a través de un enlace glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (Treanor y cols, 1996; Jing y cols, 1996). Hasta el momento se han identificado 4 co-receptores GFR α , conocidos como GFR α 1, GFR α 2, GFR α 3 y GFR α 4. Cada uno de los ligandos GDNF tiene una especial afinidad por un co-receptor GFR α concreto. Así, GDNF se une preferentemente a GFR α 1, NTN a GFR α 2, ART a GFR α 3 y PSP a GFR α 4, si bien también se pueden dar otras interacciones ligando-coreceptor diferentes,

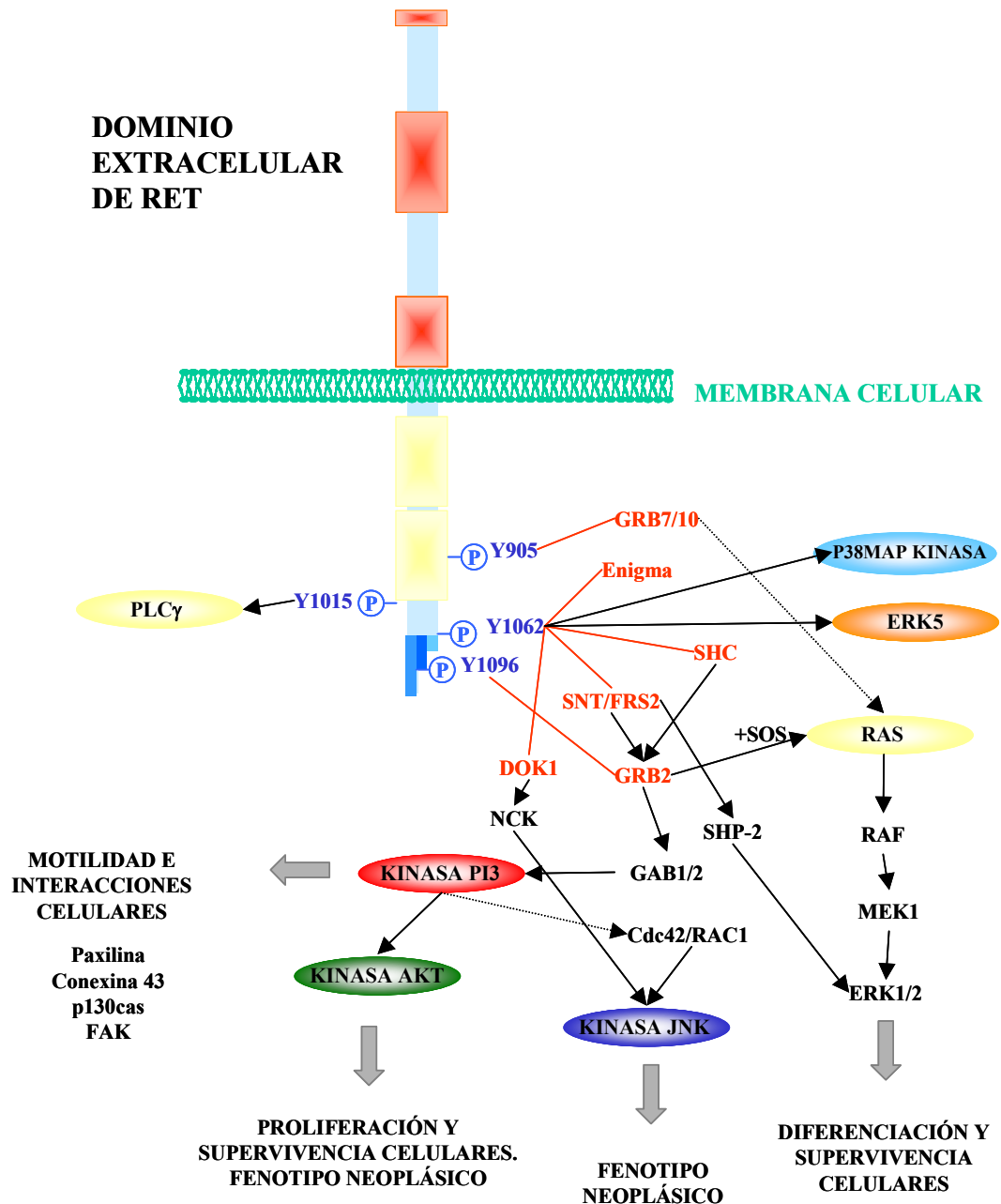
aunque con menor afinidad (Jing y cols, 1996; Treanor y cols, 1996; Buj-Bello y cols, 1997; Klein y cols, 1997; Sanicola y cols, 1997; Baloh y cols, 1998; Enokido y cols, 1998). En resumen, parece necesaria la interacción de uno de los 4 ligandos (GDNF, NTN, PSP, ART) con alguno de sus 4 correceptores ($GFR\alpha 1-4$), antes de que el complejo resultante pueda interactuar con RET, produciendo su dimerización y autofosforilación (Figura A.3). Este sería el punto de partida de la cascada de activación, dependiente de RET, que se genera en respuesta a las señales externas. Fisiológicamente, RET parece transducir intracelularmente señales externas muy diversas, en diferentes tejidos y en diferentes estadios del desarrollo; éstas irían desde señales de diferenciación, de crecimiento tisular, de supervivencia o apoptosis (Takahashi y cols, 2001).

A.1.4. Señalización celular mediada por RET.

RET ejerce sus funciones en la célula a través de una compleja serie de interacciones con varios tipos de moléculas. Así, cuando RET se activa puede desencadenar respuestas de crecimiento, diferenciación o supervivencia, dependiendo del tipo celular, así como de la etapa del desarrollo en que se dé dicha activación. Como se ha mencionado anteriormente, la dimerización de los receptores RET desencadena la autofosforilación de residuos tirosínicos intracelulares. Hasta la fecha se ha demostrado que de las 18 tirosinas intracelulares de RET, 9 pueden fosforilarse como consecuencia de la activación del receptor (Takahashi y cols, 1988; Liu y cols, 1996). Seguidamente, ciertas moléculas adaptadoras que contienen dominios SH2, reconocen la secuencia aminoacídica que rodea a los residuos fosforilados e interactúan con estos sitios de manera específica. Entre esas interacciones se encuentran la de GRB7 y GRB10 (“*Growth factor Receptor-Bound protein 7 y 10*”), que se unen a la tirosina Y905; la fosfolipasa C- γ (PLC- γ) interactúa con la tirosina Y1015; la tirosina Y1062 es diana de una gran variedad de moléculas tales como SHC, SNT/FRS2 (“*Fibroblast growth factor Receptor Substrate 2*”), IRS1 (“*Insulin Receptor Substrate 1*”), DOK1, DOK4, DOK5 (“*Docking protein 1, 4 y 5*”) y Enigma; por último GRB2 (“*Growth factor Receptor-Bound protein 2*”) se une a la tirosina Y1096 (Figura A.4) (Borrello y cols, 1994, 1996; Pandey y cols, 1995; Asai y cols, 1996; Arighi y cols, 1997; Lorenzo y

cols, 1997; Alberti y cols, 1998; Durick y cols, 1998; Grimm y cols, 2001; Kurokawa y cols, 2001; Melillo y cols, 2001a, 2001b; Murakami y cols, 2002).

Figura A.4. Rutas de señalización en las que participa RET.



Como resultado de las interacciones de las formas fosforiladas de RET con todas estas proteínas adaptadoras, se activan varias rutas de señalización conocidas, en las que participan MAP-quinasas (“*Mitogen Activated Protein kinases*”). Las cascadas de las MAP kinasas están altamente conservadas en eucariotas y participan en varias rutas de señalización celular que controlan un amplio espectro de respuestas celulares, incluyendo crecimiento, diferenciación y respuestas ante estrés. Las MAP kinasas son una familia de serín/treonín-quinasas que incluyen p42/44^{MAPK} (también conocidas como ERK1 y ERK2, “*Extracellular signal-regulated kinases*”), JNK/SAPK (proteín kinasa activada por estrés, “*c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase*”), kinasa p38 y kinasa ERK5 o MEK5.

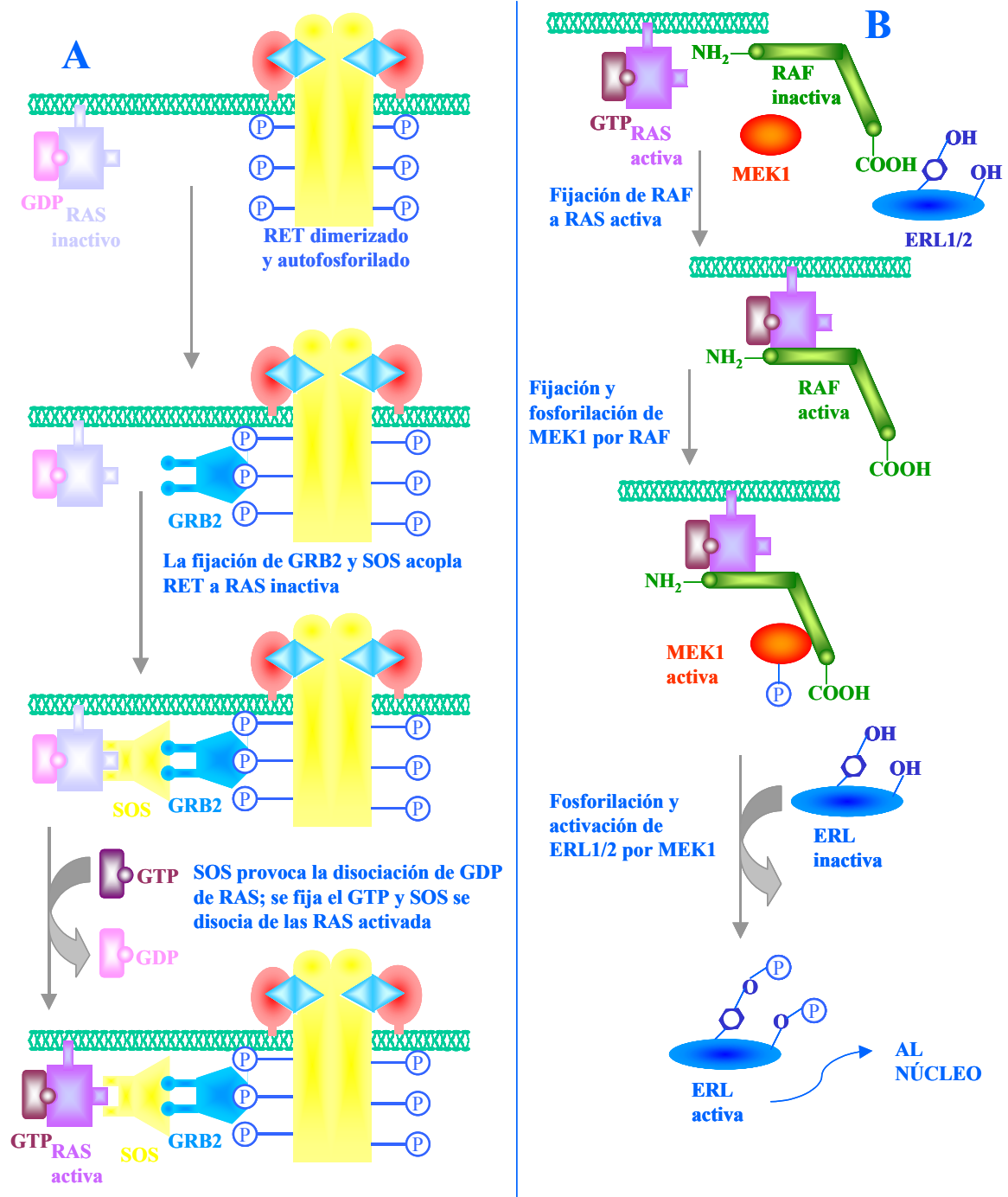
También se ha observado que RET interacciona con la fosfolipasa C- γ (PLC- γ) a través de la tirosina Y1015, desencadenando la activación de esta ruta (Borrello y cols, 1996; Hansford y Mulligan, 2000; Figura A.4).

A.1.4.1. Activación de la ruta RAS/ERK.

Se ha demostrado que RET es capaz de desencadenar la ruta de RAS-ERK, la cual es esencial tanto para la supervivencia como para la diferenciación neuronal (Figura A.4) (Califano y cols, 1995, 2000; van Weering y cols, 1995; Worby y cols, 1996). La cascada RAS-ERK se puede originar a través de la interacción de Y1062 de RET con la molécula adaptadora SHC o SNT/FRS2, lo que provoca la activación de GRB2, que a su vez activa a RAS. Alternativamente la activación de esta ruta se puede dar por interacción directa de la tirosina Y1096 con GRB2. También se ha visto que la interacción de GRB7 o GRB10 con Y905 está relacionada con la activación de esta ruta (Iwashita y cols, 1996a) (Figura A.5).

La proteína GRB2 se acopla por un lado a uno de los residuos de fosfotirosina de RET, y por el otro a otra proteína conocida como SOS que, al ser activada por GRB2, funciona como una proteína de intercambio de guanina. Concretamente la unión de SOS a la proteína RAS convierte a ésta en su forma activa asociada a GTP, dotándola entonces de capacidad para desencadenar toda una cascada de proteín-quinasas que influirán en los procesos de proliferación y diferenciación celulares. La proteína RAS activada se unirá al dominio N-terminal de RAF, una kinasa de serinas/treoninas.

Figura A.5. Cascada RAS/ERK.



RAF se unirá y fosforilará a la proteína MEK1, otra proteína-kinasa que fosforila residuos de serina y tirosina. MEK1 fosforilará y activará a la MAP-kinasa ERK1 o ERK2. Estas ERK sufren una translocación al núcleo celular, y allí pueden fosforilar a

muchas proteínas, incluidos factores de transcripción que regulan la expresión de importantes proteínas del ciclo celular y de la diferenciación (Figuras A.4, A.5).

Entre esos factores de transcripción se encuentra la proteína CREB (“*cAMP Response Element binding*”), que es capaz de activar la transcripción de genes conocidos como genes de acción inmediata o temprana (IEG, “*Inmediate Early-genes*”). Algunos de esos genes IEG codifican para otros factores de transcripción, que a su vez influirán posteriormente para activar a los genes de acción tardía.

Pues bien, se ha visto que en algunos tipos celulares la activación mediada por RET de las rutas dependientes de RAS puede dar lugar a una diferenciación celular (Califano y cols, 2001). En cambio, en otros tipos celulares RET podría llegar a bloquear la diferenciación inducida por RAS evitando la translocación nuclear de ERK, y consiguientemente la inducción de la transcripción de genes IEG (Colucci-D’Amato y cols, 2000).

A.1.4.2. Activación de la ruta PI-3K/AKT.

La activación de la enzima fosfoinositol-3-kinasa (PI-3K), probablemente a través de la interacción de RET con GRB2 y GAB1 o GAB2, también se encuentra implicada en la proliferación y la supervivencia celular (Murakami y cols, 1999; Soler y cols, 1999). La estimulación de esta ruta por parte de RET está asociada con la motilidad e interacciones celulares, y puede conducir a la formación de lamelipodios y a la fosforilación de proteínas relacionadas con la formación de adhesiones focales (como la paxilina, FAK, p130cas...), o con el aumento de expresión de la conexina-43 (Romano y cols, 1994; Xing y cols, 1996; van Weering y cols, 1998; Murakami y cols, 1999b; Segouffin-Cariou y cols, 2000). RET también actúa a través de la PI3-K para estimular a la proteín-kinasa B o AKT-kinasa, que activa al factor de transcripción NFκB, jugando así un papel importante en la supervivencia y proliferación celular, pero también pudiendo participar en procesos neoplásicos (Murakami y cols, 1999; Soler y cols, 1999; Segouffin-Cariou y cols, 2000) (Figura A.4).

A.1.4.3. Activación de la ruta JNK.

También se ha mostrado que RET activa la cascada de la kinasa JNK a través de la GTPasa cdc42/RAC1. La kinasa JNK activa varios factores de transcripción entre los que se encuentra c-jun. La regulación de c-jun por JNK modula la apoptosis inducida por estrés en ciertos tipos celulares, y podría también jugar un papel en la inducción de los procesos de reparación de ADN en respuesta a daño genotóxico. Esta ruta está implicada en procesos neoplásicos (Marshall y cols, 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 y cols, 2003) (Figura A.4).

A.2. Aspectos clínicos y bases moleculares de la neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (MEN 2) y el cáncer medular de tiroides esporádico.

A.2.1. Clasificación clínica de los síndromes MEN 2.

El cáncer medular de tiroides (MTC) representa aproximadamente el 5-10% de todos los tumores malignos de tiroides. Alrededor del 75% de todos los casos de MTC registrados son esporádicos, y los restantes (25%) están englobados en un cuadro hereditario conocido como neoplasia endocrina múltiple 2 (MEN 2) (Eng, 1999). El MEN 2 es un síndrome canceroso mendeliano autosómico dominante, que incluiría los siguientes cuadros clínicamente diferenciables: neoplasia endocrina múltiple 2A y 2B (MEN 2A y MEN 2B) y cáncer medular de tiroides familiar (FMTC). Las características clínicas de los diferentes cuadros, están resumidas en la Tabla A.1.

El síndrome MEN 2A se presenta con la clásica tríada de MTC, feocromocitoma (PHEO) en aproximadamente el 50% de los casos, e hiperparatiroidismo (HPT) 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 HPT, pero va acompañado de anomalías del desarrollo como hábito marfanoide, ganglioneuromatosis, neuromas mucosos y engrosamiento de fibras nerviosas corneales (Gorlin y cols, 1968; Eng, 1999).

Finalmente, el FMTC tiene como único fenotipo el cáncer medular de tiroides (Farndon y cols, 1986; Eng, 1999). Se piensa que el curso de MTC en estas familias es más benigno que en MEN 2A y MEN 2B, y el pronóstico es más favorable.

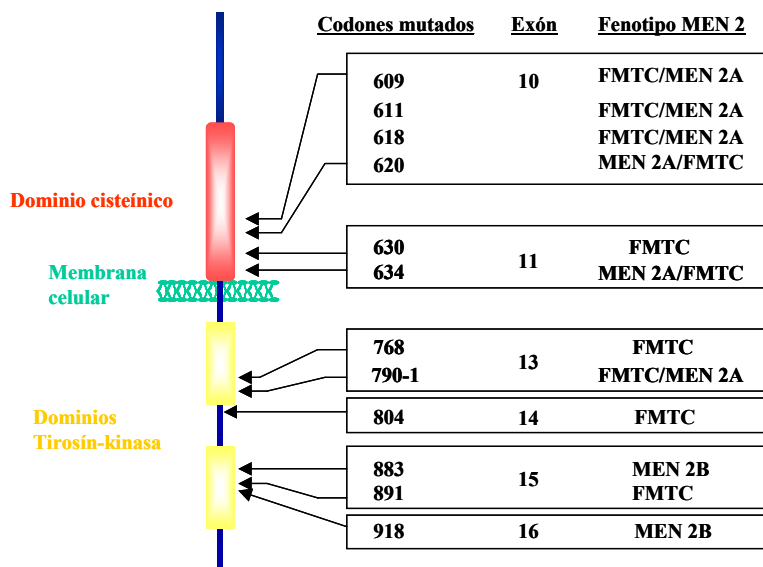
Tabla A.1. Subtipos clínicos de los síndromes MEN 2

	MTC	PHEO	HPT	OTROS RASGOS
MEN 2A	+	+	+	Es la forma más común. Normalmente no tiene otros rasgos asociados
MEN 2B	+	+	-	<ul style="list-style-type: none"> • Anormalidades músculo-esqueléticas: <ul style="list-style-type: none"> - Hábito marfanoide - Pies cavos - <i>Pectus excavatum</i> - Hipotonía y debilidad muscular • Neuromas en labios, lengua y conjuntiva • Engrosamiento de las fibras nerviosas corneales • Ganglioneuromatosis del intestino
FMTC	+	-	-	Es de manifestación tardía y curso lento

A.2.2. Genética de los síndromes MEN 2.

A diferencia de otros síndromes cancerosos, que están asociados a la inactivación de genes supresores de tumores, los síndromes MEN 2 se producen por mutaciones activadoras del proto-oncogén *RET*. Se estima que aproximadamente el 92% de los casos de MEN 2 presentan mutaciones germinales en seis exones distintos de *RET* (exones 10, 11, 13, 14, 15 y 16) (Eng y cols, 1996a; Eng, 1999) (Figura A.6, Tabla A.2).

Figura A.6. Representación de la localización de las mutaciones de *RET* causantes de los síndromes MEN 2.



En MEN 2A el 98% de los pacientes tienen mutaciones germinales identificables. Estas alteraciones aparecen agrupadas en un sitio caliente de mutaciones específico que se corresponde con 5 codones cisteínicos presentes en el dominio extracelular de la proteína (codones 609, 611, 618, 620 y 634) (Mulligan y cols, 1995; Eng y cols, 1996a). Rara vez se han observado la aparición de duplicaciones/inserciones en el exón 11 que se traducen en la inserción de 3 o 4 aminoácidos en el dominio cisteínico del receptor (Höppner y Ritter, 1997). Además, sólo en una ocasión se ha descrito una mutación afectando al codón 631, que si bien no es cisteínico se encuentra localizado próximamente a los codones cisteínicos 630 y 634 (Berndt y cols, 1998). Aproximadamente el 87% de las mutaciones MEN 2A afectan al codón 634, siendo la sustitución más frecuente la de cisteína por arginina (C634R), encontrada en más del 50% de los casos (Mulligan y cols, 1995; Eng y cols, 1996a). En España, la tasa de mutaciones de las familias MEN 2A ha ofrecido unos resultados comparables con los obtenidos en otras poblaciones. Sin embargo, cabe destacar la mayor prevalencia de la mutación C634Y, lo que sugiere un efecto fundador de esta mutación en nuestra población (Sánchez y cols, 1998; 1999). Los estudios bioquímicos efectuados con las proteínas mutadas en los codones cisteínicos, indican que los cambios de aminoácidos

localizados en esta región, conducen a la pérdida de los puentes disulfuros intramoleculares presentes en la proteína normal. En consecuencia, aún en ausencia de señales externas, las proteínas deletéreas sufren dimerizaciones espontáneas provocando a su vez una autofosforilación de los dímeros de RET, que permanecen activos de manera autónoma. La consecuencia final es la activación constitutiva de las vías metabólicas de señalización de RET, siendo ésta la alteración primaria que produce la transformación de las células parafoliculares del tiroides (Borrello y cols, 1995; Santoro y cols, 1995; Rossel y cols, 1997).

Muchas de las mutaciones causantes de MEN 2A, también pueden originar FMTC. En más del 80% de las familias FMTC se han encontrado sustituciones en los codones cisteínicos 609, 611, 618, 620 y 634, si bien su distribución es menos uniforme. Curiosamente, la mutación C634R, que es la más frecuente en MEN 2A, no aparece nunca asociada a FMTC (Mulligan y cols, 1995; Eng y cols, 1996a). Existen también descripciones de mutaciones localizadas en el codón cisteínico 630, y de inserciones que introducen nuevas cisteínas en el dominio cisteínico del receptor (Komminoth y cols, 1995; Pigny y cols, 1999). Además de las mutaciones que afectan a las cisteínas extracelulares, FMTC se encuentra también asociado a sustituciones aminoacídicas que afectan al dominio intracelular, en los codones 768, 790, 791, 804 y 891 (Eng y cols, 1995a; Bolino y cols, 1995; Fink y cols, 1996; Boccia y cols, 1997; Hofstra y cols, 1997; Berndt y cols, 1998; Dang y cols, 1999; Antiñolo y cols, 2002). El mecanismo funcional de estas últimas mutaciones no ha sido suficientemente aclarado. No obstante, se piensa que estos cambios podrían conducir a un incremento de la unión de ATP a las proteínas mutadas y/o a la alteración de la especificidad de sustrato de RET (Bolino y cols, 1995; Eng y cols, 1995a; Pasini y cols, 1997; Dang y cols, 1999; Iwashita y cols, 1999).

En el caso de MEN 2B, aproximadamente el 95% de los pacientes portan la mutación M918T (exón 16), y alrededor del 2-3% porta la mutación A883F (exón 15) (Carlson y cols, 1994; Eng y cols, 1994, 1996 a; Hofstra y cols, 1994; Mulligan y cols, 1995; Gimm y cols, 1997; Smith y cols, 1997). Ambas mutaciones, aparecen en la zona de reconocimiento y unión del sustrato a RET alterando la especificidad de la proteína, que parece fosforilar con mayor afinidad los sustratos propios de las kinasas

citoplasmáticas (Songyang y cols, 1995; Bocciardi y cols, 1997; Murakami y cols, 1999).

Tabla A.2. Mutaciones del proto-oncogén *RET* y los síndromes MEN 2 asociados

Exón	Codón	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Fenotipo	
10	609	TGC a CGC	Cys a Arg	MEN2A, FMTC	
		TGC a TAC	Cys a Tyr	MEN2A	
	611	TGC a TAC	Cys a Tyr	MEN2A	
		TGC a TGG	Cys a Trp	MEN2A, FMTC	
		TGC a GGC	Cys a Gly	FMTC	
	618	TGC a TTC	Cys a Phe	MEN2A	
		TGC a TCC	Cys a Ser	MEN2A, FMTC	
		TGC a AGC	Cys a Ser	MEN2A, FMTC	
		TGC a GGC	Cys a Gly	MEN2A	
		TGC a CGC	Cys a Arg	MEN2A, FMTC	
		TGC a TAC	Cys a Tyr	MEN2A, FMTC	
		TGC a TGA	Cys a Stop	MEN2A	
		620	TGC a CGC	Cys a Arg	MEN2A, FMTC
			TGC a TAC	Cys a Tyr	MEN2A
			TGC a TTC	Cys a Phe	MEN2A
	11	630	TGC a TCC	Cys a Ser	MEN2A
			TGC a GGC	Cys a Gly	MEN2A
		634	TGC a TTC	Cys a Phe	FMTC
			TGC a TAC	Cys a Tyr	MEN2A, FMTC
		TGC a CGC	Cys a Arg	MEN2A	
		TGC a TTC	Cys a Phe	MEN2A, FMTC	
		TGC a GGC	Cys a Gly	MEN2A	
		TGC a TGG	Cys a Trp	MEN2A	
		TGC a AGC	Cys a Ser	MEN2A	
		TGC a TCC	Cys a Ser	MEN2A, FMTC	
		TGC a TCC	Cys a Ser	MEN2A, FMTC	
13	768	GAG a GAC	Glu a Asp	FMTC	
		GAG a GAT	Glu a Asp	FMTC	
	790	TTG a TTT	Ley a Phe	MEN2A, FMTC	
TTG a TTC		Ley a Phe	MEN2A, FMTC		
14	791	TAT a TTT	Tyr a Phe	FMTC	
		804	GTG a TTG	Val a Leu	FMTC
	GTG a ATG		Val a Met	FMTC	
15	804 y 806	804-GTG a ATG	Val a Met	MEN2B	
		806-TAC a TGC	Tyr a Cys	MEN2B	
	883	GCT a TTT	Ala a Phe	MEN2B	
16	891	TCG a GCG	Ser a Ala	FMTC	
	918	ATG a ACG	Met a Thr	MEN2B	
Duplicaciones	Nº de base	Secuencia insertada	Aminoácidos insertados	Fenotipo	
8	1741-1742	Ins GAG GAG TGT	EEC 531-532	FMTC	
11	2056-2057	Ins TCG CGC ACG	CRT 636-637	MEN2A	
	2049-2050	Ins ACG AGC TGT GCC	TSCA 634-635	MEN2A	

También se ha encontrado un caso MEN 2B asociado a la doble mutación V804M e Y806C (Iwashita y cols, 2000). Se ha comprobado *in vitro* que esta

combinación de variantes tiene más capacidad transformadora que cada una de las variantes por separado, y que presenta propiedades biológicas similares a las de otras mutaciones de *RET* asociadas a MEN 2B.

A.2.3. Etiología del cáncer medular de tiroides esporádico.

El cáncer medular de tiroides esporádico, se define como un tumor de células parafoliculares del tiroides, que aparece en un paciente sin antecedentes familiares ni otras características asociadas a los cuadros de MEN 2, y sin ninguna alteración germinal característica del cuadro sindrómico (Schimke, 1984; Eng, 1999). Sin embargo varios estudios poblacionales han mostrado que un 3-7% de estos casos representan casos MEN 2 *de novo* con mutaciones germinales en *RET* (Eng y cols, 1995b; Wohllk y cols, 1996; Eng, 1999).

La etiología del MTC esporádico no se conoce bien. Se ha observado que de un 23 a un 70% de esos casos portan mutaciones somáticas en *RET* (Eng y cols, 1996b). No obstante, los análisis de subpoblaciones de células tumorales procedentes de un solo paciente revelan que las mutaciones en *RET* aparecen en subgrupos de clones, lo que sugiere que dichas mutaciones no son causantes del MTC, sino que aparecen durante la progresión de éste (Eng y cols, 1995b, 1998). Aunque se han descrito mutaciones en los exones 13 y 15, tratándose en la mayor parte de los casos de la mutación M918T, su mecanismo de aparición se desconoce por completo. Resultados de estudios realizados en la población alemana indican que existe una sobre-representación a nivel germinal de la variante de *RET* S836S (c.2439C>T) en los pacientes con MTC esporádico respecto a la población general, y curiosamente parece que la presencia de esta variante correlaciona con la aparición a nivel somático de M918T (Gimm y cols, 1999). Estos datos sugieren que S836S podría predisponer a la aparición de M918T, aunque esta hipótesis no está aún confirmada.

A.2.4. Factores de susceptibilidad genéticos para MTC esporádico.

El cSNP ("*coding Single Nucleotide Polymorphism*") S836S de *RET* es el primer factor de susceptibilidad genético descrito para MTC esporádico (Gimm y cols, 1999). Se trata de un cambio silente que fue identificado originalmente por nuestro grupo en el

exón 14 del proto-oncogén *RET*, en una familia afecta de MEN 2A y enfermedad de Hirschsprung (Borrego y cols, 1998). En un estudio de casos y controles realizado por Gimm y cols en 1999, se detectó la presencia de S836S en 9 pacientes de 49 (9%) y en sólo 5 controles sanos de 70 (3,6%). Al realizar el análisis estadístico comparativo entre pacientes y controles se observó una sobre-representación significativa de la variante en el grupo de pacientes (Test exacto de Fisher: $p= 0.03$). El mecanismo molecular de S836S es desconocido, aunque se postula que podría actuar creando tractos hipermutables hacia el segmento 3' del proto-oncogén *RET* dando lugar así a la mutación somática M918T, en lugar de participar directamente en el proceso tumorigénico. Alternativamente, se ha planteado que S836S podría aumentar la expresión de *RET* o generar la activación de sitios críticos de maduración, conduciendo a la producción de proteínas mutantes. En cualquier caso han de realizarse estudios funcionales adicionales para determinar con exactitud el mecanismo molecular por el que S836S parece predisponer a desarrollar cáncer medular de tiroides.

Con posterioridad se ha descrito la existencia de un nuevo factor de susceptibilidad para MTC esporádico localizado en el gen *GFRA1* (Gimm y cols, 2001). Este gen codifica para el co-receptor $GFR\alpha 1$ de RET que, como se ha descrito detalladamente en la sección A.1.3, es necesario para la dimerización y consiguiente activación de la cascada metabólica del receptor. Dado que las mutaciones de *RET* que generan una ganancia de función están asociadas con MTC, sería igualmente factible que mutaciones en genes que codifican para los miembros del complejo heterotetramérico de activación de RET, puedan afectar a la cascada metabólica del receptor y jugar así un papel en la patogénesis de MTC. En la población alemana se detectó la sobre-representación del polimorfismo $-193C>G$, situado en el extremo 5'UTR de *GFRA1*, y una sub-representación de $c.537T>C$ en el exón 4 del mismo gen, al realizar un estudio poblacional comparativo entre casos MTC esporádicos y controles sanos (Gimm y cols, 2001). Además, tras analizar la expresión diferencial de *GFRA1* a nivel de ARN mensajero y de proteína, estos autores encontraron una sobre-expresión en los tumores que portan el polimorfismo $-193C>G$. Estos datos podrían sugerir que $-193C>G$ actúa como un alelo de susceptibilidad de baja penetrancia para el desarrollo de MTC. Por otra parte, $c.537 T>C$ podría tener un efecto protector contra el desarrollo

de la enfermedad. Sin embargo, los mecanismos precisos de actuación de ambas variantes de secuencia siguen siendo un misterio.

Dado que los fenómenos de asociación de las variantes anteriormente mencionadas a MTC esporádico podrían quedar restringidos a la población alemana, uno de los objetivos del presente trabajo de tesis ha sido la evaluación de la implicación de dichos cambios de secuencia en la patogénesis de MTC, en la población española (Ruiz y cols, 2001; Borrego y cols, 2002).

A.3. Características clínicas y bases moleculares de la enfermedad de Hirschsprung.

A.3.1. Concepto y características clínicas de la enfermedad de Hirschsprung.

La enfermedad de Hirschsprung o megacolon agangliónico (HSCR, OMIM 142623), es una patología congénita caracterizada por la ausencia de los ganglios intramurales de Meissner y Auerbach en una porción variable del intestino grueso, dando como resultado una obstrucción intestinal funcional. 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. 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: 3-8%), o bien incluirse dentro de S-HSCR o L-HSCR (Chakravarti y Lyonnet, 2002).

En la mayoría de los casos el diagnóstico de HSCR se realiza en el período neonatal, debido a una obstrucción intestinal con los siguientes signos: (1) dificultad en expulsar el meconio durante las primeras 48 horas de vida, (2) distensión abdominal que se alivia con la estimulación rectal o la administración de enemas, (3) vómitos y (4) enterocolitis neonatal (Torfs, 1998). Algunos casos se diagnostican más tarde en la infancia o en la etapa adulta con estreñimiento severo, distensión abdominal crónica, vómitos y retraso de crecimiento (Parc y cols, 1984).

Las principales técnicas diagnósticas incluyen la visualización abdominal por rayos X, enema de bario, manometría ano-rectal y biopsia de la pared rectal. En cuanto al tratamiento, es quirúrgico tras un preoperatorio meticuloso. Básicamente el principio consiste en situar el intestino normal en el ano, y eliminar la contracción tónica del esfínter anal interno.

A.3.2. Epidemiología de la enfermedad de Hirschsprung.

Se estima que la incidencia de HSCR es de 1 de cada 5000 nacidos vivos (Bodian y Carter, 1963; Amiel y Lyonnet, 2001). Sin embargo esta incidencia varía significativamente entre los distintos grupos étnicos alcanzando valores de 1.5, 2.1 y 2.8 de cada 10000 nacidos vivos en caucasianos, afro-americanos y asiáticos respectivamente) (Torfs, 1998).

Usualmente 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 y expresión variables (Passarge, 1967). Existe una clara predominancia de varones afectados, siendo el ratio varones: mujeres = 4:1 (Badner y cols, 1990). Curiosamente este ratio varones: mujeres es significativamente más alto para S-HSCR que para L-HSCR (Badner y cols, 1990; Torfs, 1998).

Aproximadamente el 70% de los pacientes HSCR no tienen otras manifestaciones clínicas adicionales, mientras que en el 30% de casos restante este fenotipo se presenta como formas sindrómicas, asociado a otras malformaciones congénitas o a otro desorden genético adicional (Tabla A.3, Tabla A.4) (Amiel y Lyonnet, 2001). Concretamente HSCR aparece asociado a alguna anomalía cromosómica en un 12% de los casos, siendo la trisomía 21 la más frecuente (>90%). Por otra parte, el 18% de los pacientes HSCR aparecen con anomalías congénitas asociadas, tales como malformaciones gastrointestinales, fisura palatina, polidactilia, defectos en el septo cardíaco y anomalías cráneo-faciales (Spouge y Baird, 1985; Brooks y cols, 1998).

Tabla A.3. Síndromes asociados con HSCR (Amiel y Lyonnet, 2001).

Síndromes	MIM	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	209880	Hipoventilación central congénita
MEN 2A	171400	Carcinoma medular de tiroides, feocromocitoma, hiperparatiroidismo
Riley-Day	223900	Anomalías del sistema nervioso autónomo
<i>HSCR siempre asociado</i>		
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, HSCR, anomalías de ojo y oído, displasia renal
Diaplasia mesomélica tipo Werner		Mesomelia, polidactilia
<i>HSCR ocasionalmente asociado</i>		
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	Dwarfismo, displasia metafisaria, inmunodeficiencia
<i>HSCR rara vez asociado</i>		
Distrofia muscular congénita de Fukuyama	253800	Distrofia muscular, polimicrogiria, hidrocefalia, ataques
Clayton-Smith	258840	Rasgos dismórficos, dedos y uñas hipoplásticas, ictiosis
Kaplan	304100	Agénesis del cuerpo calloso, pulgares cortos, ptosis, debilidad muscular
Okamoto	308840	Hidrocefalia, fisura palatina, agénesis del cuerpo calloso
<i>Asociaciones misceláneas</i>		
Pallister-Hall (CAVE)	140510	
Fryns	229850	
Aarskog	100050	
Enfermedad de Jeune o distrofia torácica asfixiante	208500	
Displasia frontonasal	136760	
Osteopetrosis		
Goldenhar	164210	
Lesch-Nyhan	308000	
Rubinstein-Taybi	180849	
Toriello-Carey	217980	
SEMDJL	271640	

Tabla A.4. Anomalías cromosómicas asociadas a HSCR.

Cromosoma	Rasgos clave	Número de casos
+ 21	Síndrome de Down, S-HSCR, Varones: mujeres= 5.5-10.5	2-10% de casos HSCR
del 10q11	Retraso mental, L-HSCR	2 casos
del 13q22	Retraso mental y de crecimiento, rasgos dismórficos, S-HSCR	7 casos
del 2q22-q23	Retraso en el crecimiento postnatal y microcefalia, retraso mental, epilepsia, rasgos dismórficos, L-HSCR o S-HSCR	3 casos
del 17q21		4 casos
dup 17q21-q23	Síndrome MCA/MR (“ <i>Multiple Congenital Anomalies/Mental Retardation</i> ”)	4 casos
+ 22q11	Síndrome del ojo de gato	

A.3.3. Etiopatogenia de la enfermedad de Hirschsprung.

La hipótesis más aceptada acerca de la etiopatogénesis de HSCR se basa en un fallo en la migración de neuroblastos de la cresta neural (CN) que, en condiciones normales, deben alcanzar el intestino delgado en la séptima semana de gestación, y el recto en la duodécima semana (Okamoto y Ueda, 1967). Las distintas formas clínicas que presentan una extensión variable del segmento agangliónico, podrían considerarse como el resultado de interrupciones del proceso migratorio en distintos períodos gestacionales (Martucciello y cols, 2000).

La CN es una estructura muy peculiar. Tal como formuló Horstadius en 1950, “al originarse tan temprano, se considera uno de los primeros órganos en el desarrollo de los embriones de vertebrados. Sin embargo sólo tiene una existencia temporal, y sus células se dispersan por todo el cuerpo diferenciándose en varios tejidos”. Al finalizar su migración, las células de la CN se diferencian en varios tipos celulares, incluyendo neuronas de los ganglios sensoriales, simpáticos y parasimpáticos, células neuroendocrinas, médula adrenal, células pigmentadas, y cartílago facial (Bronner-Fraser, 1993). Las enfermedades que surgen por defectos en la CN son particularmente diversas en su presentación clínica, e incluyen síndromes endocrinológicos, cutáneos, neurológicos y digestivos entre otros. Entre esas neurocristopatías se encuentra la enfermedad de Hirschsprung, relacionada con fallos en el desarrollo embrionario del sistema nervioso entérico (SNE). Para contribuir al desarrollo del SNE, las células de la CN han de poder abandonar el tubo neural, migrar al intestino, entrar en él en un determinado momento, y comenzar su migración craneo-caudal a lo largo del intestino (Meijers y cols, 1992). Estos eventos se encuentran regulados por una compleja red de

mecanismos moleculares y celulares que aún no se conocen en profundidad. Se han identificado fundamentalmente dos vías metabólicas que desempeñan un papel crítico en la neurogénesis entérica de mamíferos: una de ellas es la ruta de señalización del receptor tirosín quinasa RET, y la otra es la ruta mediada por el receptor B de endotelinas (EDNRB). De hecho, y tal como se verá más adelante, los genes que hasta la fecha se han descrito como relacionados con la enfermedad de Hirschsprung están asociados de forma directa o indirecta con una de estas rutas de señalización.

A.3.4. Genética molecular de la enfermedad de Hirschsprung.

El análisis de segregación en familias de pacientes HSCR no sindrómicos, ha mostrado que el riesgo de recurrencia de la enfermedad en hermanos oscila entre un 1 y un 33%, dependiendo de la longitud del segmento agangliónico y del sexo del probando, así como del sexo de los hermanos (Badner y cols, 1990). Actualmente se asume que HSCR es una enfermedad multifactorial que resulta de la acción de varios genes en combinación con factores ambientales (Amiel y Lyonnet, 2001).

El análisis molecular de pacientes HSCR ha permitido identificar diferentes genes asociados a la aparición de este fenotipo. Hasta la fecha se han identificado 9 genes implicados en la aparición de HSCR en humanos, que son *RET*, *GDNF*, *NTN*, *EDNRB*, *EDN3*, *ECE*, *SOX10*, *PHOX2B* y *SIP1*.

A.3.4.1. Mutaciones asociadas a la enfermedad de Hirschsprung en genes que participan en la ruta de señalización de RET: *RET*, *GDNF* y *NTN*.

Hoy día se sabe que el proto-oncogén *RET* es el principal gen de susceptibilidad para HSCR. De hecho, 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 incompleta (Lyonnet y cols, 1993; Angrist y cols, 1993). Estos autores consideraron la región 10q11.2 como candidata al observar una delección intersticial en la misma, en pacientes con aganglionosis colónica total y retraso mental (Martucciello y cols, 1992). *RET*, identificado como el gen responsable de MEN 2 y localizado en 10q11.2, se consideró un buen gen candidato

debido a la concurrencia de MEN 2A y HSCR en algunas familias, y a que se expresa en células derivadas de la cresta neural. Finalmente y cumpliendo las expectativas, el rastreo molecular del gen permitió identificar mutaciones asociadas al fenotipo HSCR (Edery y cols, 1994; Romeo y cols, 1994). Hoy día se han identificado alrededor de 80 mutaciones en *RET* relacionadas con HSCR, que incluyen grandes deleciones, microdeleciones, inserciones y mutaciones con cambio de sentido (“*missense mutations*”), sin sentido (“*nonsense mutations*”) o que afectan a la maduración (“*splicing mutations*”) (Attie y cols, 1995; Angrist y cols, 1995; Seri y cols, 1997). A diferencia de MEN 2A, donde las mutaciones se encuentran localizadas en una zona caliente que abarca 6 codones cisteínicos, o de MEN 2B donde casi siempre aparece la mutación M918T, en el caso de HSCR las mutaciones de *RET* se encuentran distribuidas por todo el gen. Mientras que *in vitro* se ha visto que las mutaciones asociadas a MEN 2 conducen a una dimerización constitutiva del receptor, para HSCR el mecanismo más probable es la haploinsuficiencia (Pasini y cols, 1995b; Carlomagno y cols, 1996; Pelet y cols, 1998). Los resultados de estudios bioquímicos destinados a analizar los efectos de ciertas mutaciones en *RET* asociadas a HSCR, han mostrado que dichos efectos son variables, pudiendo afectar al plegado de la proteína, al transporte de ésta hasta la membrana celular, o incluso pudiendo abolir completamente su actividad biológica (Carlomagno y cols, 1996; Pelet y cols, 1998). En consecuencia este déficit afectaría a las rutas metabólicas en las que participa RET (Sección A.1.4), generándose un defecto en la migración y proliferación de precursores de la cresta neural al sistema nervioso entérico en desarrollo.

Aunque *RET* es el principal locus para HSCR, sólo se han identificado mutaciones asociadas a la enfermedad en un 50% de los casos familiares (Attie y cols, 1995a). Sin embargo la mayoría de las familias, con algunas excepciones, son compatibles con el ligamiento al locus *RET* (Bolk y cols, 2000; Carrasquillo y cols, 2002).

En cuanto a las formas esporádicas, los primeros estudios identificaron mutaciones en *RET* en un 10-35% de los casos dependiendo de las series (Attie y cols, 1995a; Angrist y cols, 1995). Sin embargo, el primer estudio prospectivo basado en una población homogénea, ha demostrado que las mutaciones germinales de *RET* tan sólo explicarían un 3% de los casos esporádicos (Svensson y cols, 1998). Estas diferencias

entre las series se explicarían en base a que en los primeros estudios efectuados en *RET* se emplearon cohortes de pacientes muy seleccionados y con fenotipos muy agresivos (edad de comienzo muy precoz y amplia extensión de aganglionosis).

El papel de *RET* en la enfermedad de Hirschsprung convirtió a los genes que codifican para las proteínas de su complejo de activación (*GDNF*, *NTN*, *ART*, *PSP*, *GFRA1-4*) en potenciales candidatos para el desarrollo de HSCR.

GDNF es el principal factor de supervivencia para muchos tipos de neuronas. Los ratones “*Gdnf-knockout*” presentan un fenotipo muy similar a los ratones “*Ret-knockout*” (Schuchardt y cols, 1994; Moore y cols, 1996; Sanchez y cols, 1996; Pichel y cols, 1996), consistente en megacolon de segmento largo y agenesia renal. Esto, junto con el hecho de que *GDNF* participa en varios procesos metabólicos necesarios para el desarrollo y mantenimiento de neuronas centrales y periféricas, hacen de este gen un magnífico candidato para HSCR. Sin embargo se han encontrado mutaciones en *GDNF* en muy pocos pacientes HSCR. Además, dichas mutaciones podrían no ser suficientes para originar HSCR, dado que algunos pacientes presentaban factores adicionales como mutaciones en *RET* o trisomía 21 (Salomon y cols, 1996; Angrist y cols, 1996; Ivanchuk y cols, 1996; Martucciello y cols, 2000). También se ha detectado una mutación en *GDNF* en un paciente con enfermedad de Ondine (Amiel y cols, 1998).

Por otra parte, el silenciamiento de genes que codifican la neurturina o su co-receptor *gfr α 2* en ratones (ratones *Ntn-knockout* o *Gfra2-knockout*), produce un descenso en la densidad de neuronas colinérgicas del SNE aunque no se generan anomalías renales (Heuckeroth y cols, 1999; Rossi y cols, 1999). Pues bien, se ha identificado una mutación asociada a HSCR en *NTN*, pero no se tiene certeza de su grado de implicación en la patología, puesto que ésta aparecía en conjunción con otra mutación en *RET* (Doray y cols, 1998).

Finalmente, aunque los ratones “*Gfra1-knockout*” son fenotípicamente similares a los ratones “*Ret-knockout*” y “*Gdnf-knockout*” (Enomoto y cols, 1998), aún no se han identificado mutaciones en *GFRA1* en pacientes HSCR (Angrist y cols, 1998; Myers y cols, 1999). Tampoco se han encontrado mutaciones en los genes *GFRA2* ni *GFRA3* (Vanhorne y cols, 2001; Onochie y cols, 2000). No obstante, estos hallazgos no permiten descartar de forma definitiva la implicación de estos genes en la enfermedad de Hirschsprung.

A.3.4.2. Mutaciones asociadas a la enfermedad de Hirschsprung en los genes de la ruta de señalización de la endotelina: *EDNRB*, *EDN3* y *ECE1*.

La ruta de las endotelinas fue estudiada inicialmente por su efecto vasoconstrictor y su posible papel en hipertensión. *EDNRB* y *EDNRA* (“*Endothelin receptor type B/A*”) son proteínas heptahelicales acopladas a proteína G, que transducen señales a través de las endotelinas (*EDN1*, *EDN2*, *EDN3*) (Inoue y cols, 1989; Sakurai y cols, 1992). Hoy día se sabe que la ruta de señalización inducida por las endotelinas es necesaria para el desarrollo de las células derivadas de la cresta neural destinadas a inervar el colon (Chakravarti, 1996; Martucciello y cols, 2000).

Una serie de hechos hicieron pensar que 13q22, región donde se localiza el gen *EDNRB*, podía albergar un locus de susceptibilidad para HSCR: (1) Se observó un *lod score* significativo en 13q22 al realizar un estudio de ligamiento sobre una comunidad menonita, altamente endogámica, con numerosos casos HSCR (Cohen y Gadd, 1982; Puffenberger y cols, 1994a). (2) Se detectaron deleciones intersticiales *de novo* en 13q22 en varios pacientes con HSCR (Kiss y Osztovcics, 1989; Lamont y cols, 1989; Bottani y cols, 1991). (3) En ratones el piebaldismo letal, un modelo de aganglionosis, es fenotípicamente idéntico al del ratón *Ednrb-knockout*, y en humanos el gen *EDNRB* está localizado en 13q22 (Hosoda y cols, 1994). El piebaldismo letal se considera como el modelo murino para el síndrome de Shah-Waardemburg (WS4) en humanos, y algunos de los individuos menonitas presentaban anomalías en la pigmentación y sordera además de HSCR. Este hecho incitó a que se realizara un rastreo de *EDNRB* en familias WS4, y se encontraron mutaciones en homocigosis en una fracción de las mismas (Attie y cols, 1995b). Recientemente se ha detectado también una mutación en homocigosis en *EDNRB* en un paciente con hipoventilación central congénita o enfermedad de Ondine (Verheij y cols, 2002).

Por otra parte se identificó una mutación en el gen *EDN3* en un ratón con *spotting* letal, otro modelo murino para WS4 en humanos, lo que condujo al rastreo e identificación de mutaciones de *EDN3* en pacientes WS4 (Hofstra y cols, 1996; Ederly y cols, 1996; Pingault y cols, 2001) o con enfermedad de Ondine (Bolk y cols, 1996).

El rastreo mutacional de *EDNRB* y *EDN3* en series de pacientes con HSCR esporádico, ha mostrado que mientras que las mutaciones en *EDN3* son muy poco frecuentes (Bidaud y cols, 1997), en el caso de *EDNRB* se han encontrado mutaciones en aproximadamente un 5% de los pacientes (Chakravarti, 1996; Amiel y cols, 1996; Kusafuka y cols, 1996; Auricchio y cols, 1996). Cabe mencionar que en esos pacientes estudiados, 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. La observación de deleciones intersticiales en 13q22 abarcando *EDNRB* en algunos pacientes HSCR, sugirió que el efecto de acción de estas mutaciones podría ser haploinsuficiencia. Posteriores análisis funcionales para determinar la relevancia patogénica de diferentes mutaciones en *EDNRB*, han revelado que éstas generan una pérdida de función del receptor (Abe y cols, 2000).

Las endotelinas maduras, EDN1, EDN2 y EDN3, son el resultado de la acción proteolítica de las metaloproteasas ECE1 y ECE2 (*Endothelin-Converting Enzyme 1 y 2*) sobre las respectivas preproendotelinas. Se ha observado que el ratón *Ece1-knockout* presenta defectos cráneo-faciales y anomalías cardíacas además de aganglionosis colónica (Yanagisawa y cols, 1998). Estos datos hicieron de *ECE1* un gen candidato para HSCR. De hecho, se ha podido identificar una mutación en heterocigosis en un paciente HSCR con defectos cráneo-faciales y cardíacos (Hofstra y cols, 1999).

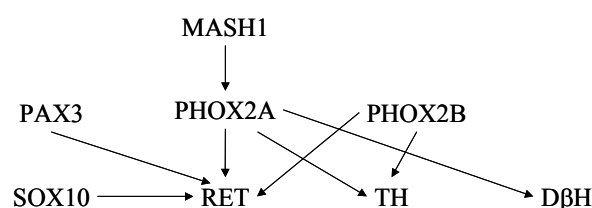
Todos estos hallazgos de mutaciones asociadas a HSCR en genes relacionados con la ruta de las endotelinas (*EDNRB*, *EDN3*, *ECE1*), ponen de manifiesto la relevancia de esta vía de señalización en el desarrollo del sistema nervioso entérico. Asimismo no se descarta la posibilidad de la implicación de otros miembros de esta cascada metabólica en la patogénesis de la enfermedad.

A.3.4.3. Asociación de genes codificantes de factores de transcripción o de regulación con HSCR: *SOX10*, *PHOX2B* y *SIP1*.

La expresión del proto-oncogén *RET* se encuentra regulada por una amplia gama de factores de transcripción que actúan sobre el gen de forma directa o indirecta. Entre esos factores de transcripción se encuentran MASH1, PHOX2A, PHOX2B, PAX3, SOX10 y HOX11L1, que evidentemente desempeñan un papel fundamental en el

desarrollo del SNE, si bien sus funciones precisas aún no se conocen en profundidad (Newgreen y Young, 2002; Figura A.6). El hecho de que estos factores de transcripción regulen la expresión de *RET* convierte a los genes que los codifican en posibles candidatos para HSCR. De hecho ya se ha podido establecer la relación entre algunos de estos genes como *SOX10* y *PHOX2B*, y algunas formas sindrómicas de la enfermedad.

Figura A.7. Factores de transcripción implicados en el desarrollo del SNE.



Por ejemplo, otro de los modelos murinos para el síndrome WS4 es el megacolon dominante (*Dom*), siendo *Sox10* (“*Sex determining region Y box 10*”) el gen causante de este fenotipo. Este gen codifica para un factor de transcripción que presenta un motivo de unión a ADN conocido como dominio HMG (“*High Mobility Group*”). Se han identificado mutaciones en heterocigosis en *SOX10* en formas familiares y esporádicas de WS4 (Pingault y cols, 1998; Southard-Smith y cols, 1999; Touraine y cols, 2000). También se han encontrado mutaciones en niños con WS4 combinado con otras neuropatías (Inoue y cols, 1999, 2002). Algunas de estas mutaciones afectan al dominio de unión a ADN, y podrían conducir a una pérdida de función, por lo que de nuevo el mecanismo propuesto más aceptable para producir el fenotipo es la haploinsuficiencia. En cambio otras mutaciones perturban el dominio de transactivación y podrían conducir a un efecto dominante negativo (Touraine y cols, 2000). Hasta el momento, sin embargo, no se han encontrado mutaciones en *SOX10* asociadas a formas no sindrómicas de HSCR.

Por otra parte, se había observado que los ratones *Phox2b-knockout* carecen de sistema nervioso autónomo. En estos ratones las células de la cresta neural llegan a la parte anterior del intestino, pero no alcanzan a migrar más allá probablemente como consecuencia de la falta de expresión de *Ret* (Pattyn y cols, 1999). *PHOX2B* (“*Paired-like Homeo bOX 2B*”) codifica para otro factor de transcripción que se expresa en el

sistema nervioso autónomo central y periférico durante el desarrollo embrionario, y que funciona regulando la expresión de *RET*. Pues bien, el rastreo mutacional de este gen en una serie de pacientes con enfermedad de Ondine ha permitido identificar mutaciones que alteran la pauta de lectura, así como expansiones de polialaninas (Amiel y cols, 2003; Sasaki y cols, 2003). Además, Benailly y cols 2003 encontraron una paciente con S-HSCR, retraso en el desarrollo, rasgos dismórficos e hipotonía severa, que presentaba una deleción de 5Mb en 4p12p13, abarcando la región donde se localiza este gen, lo que sugiere que la haploinsuficiencia de *PHOX2B* podría predisponer a HSCR. Sin embargo, el análisis de la secuencia del gen en una amplia cohorte de casos HSCR no sindrómicos no ha desvelado 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 y cols, 2003a).

Por último, en algunos pacientes HSCR que presentan microcefalia, fisura palatina y estatura pequeña (OMIM 235730) se han encontrado mutaciones en el gen *SIP1* (“*Smad Interacting Protein-1*”), también conocido como *ZFH1B* (“*Zinc Finger Homeo box 1B*”) (Cacheux y cols, 2001; Wakamatsu y cols, 2001). Con posterioridad también se han identificado grandes deleciones y otras mutaciones de este gen en varios pacientes HSCR con retraso mental y ciertas malformaciones como hipospadia y agenesia del cuerpo calloso (Amiel y cols, 2001). Se piensa que estos fenotipos son el resultado de la haploinsuficiencia de *SIP1* generada por mutaciones en uno de los alelos. Este gen se consideró un candidato para generar el fenotipo, dado que uno de los pacientes analizados en los primeros estudios presentaba una translocación *de novo* t(2;13)(q22;q22), y *SIP1* se localiza en 2q22. Además, *SIP1* parece realizar una función importante en el desarrollo de la cresta neural, hecho que queda manifiesto en los estudios de los ratones *knockout* para este gen (Van de Putte et al, 2003). Los estudios realizados en ratones han demostrado que *Sip1* es un miembro de la familia δ EF1/*Zfh-1*, que interacciona con proteínas Smad (Verschueren y cols, 1999). Estas proteínas Smad desempeñan un papel fundamental en la cascada de transducción de la familia de los factores de crecimiento TGF- β (“*Transforming Growth Factor beta*”) (Massague, 1998), que está involucrada en el desarrollo y homeostasis de varios tipos celulares. La activación de la ruta TGF- β origina la fosforilación y translocación nuclear de las proteínas Smad, las cuales participan en la regulación de la expresión de genes diana.

Los experimentos realizados en varios sistemas sugieren que Sip1 es un represor que puede actuar impidiendo la activación transcripcional llevada a cabo por Smad, por lo que su función reguladora es importante.

Siguen existiendo aún varios genes que codifican para factores de transcripción implicados en el desarrollo del SNE, cuya candidatura para generar HSCR aún no ha sido evaluada. Dichos genes resultan por tanto un interesante objeto de estudio cuyo análisis podría contribuir a profundizar en el conocimiento de la patogénesis de esta enfermedad poligénica.

A.3.4.4 Identificación de regiones cromosómicas asociadas a HSCR mediante análisis de ligamiento

Como ya se ha mencionado, HSCR es una enfermedad compleja y multifactorial. En la inmensa mayoría de los casos, mutaciones en los genes anteriormente descritos conducen a la aparición de formas sindrómicas de HSCR, o bien de formas aisladas de L-HSCR. Sin embargo estas mutaciones apenas se han identificado en las familias S-HSCR, que son mucho más frecuentes. Con el objetivo de identificar loci de susceptibilidad asociados a la aparición de esas formas S-HSCR, se han realizado estudios de ligamiento en diversas familias HSCR, utilizando una amplia variedad de marcadores microsatélite distribuidos por todo el genoma.

En un primer estudio, Bolk y cols 1999 analizaron un total de 12 familias, e identificaron un nuevo locus de susceptibilidad en la región cromosómica 9q31 que en conjunción con *RET* conduce a la aparición del fenotipo HSCR.

Posteriormente, un análisis realizado sobre 49 familias demostró la existencia de tres loci situados en 3p21, 10q11 y 19q12 tanto necesarios como suficientes para explicar la incidencia y el riesgo de recurrencia de HSCR en la cohorte estudiada (Gabriel y cols, 2002). Estos autores concluyen que el gen de susceptibilidad que reside en 10q11 es *RET*, llegando a encontrar mutaciones en este gen en 17 familias. Para el resto de las familias ligadas a 10q11, postulan que pueden existir mutaciones en la región no codificante de *RET*, si bien tampoco se puede excluir totalmente la existencia de mutaciones en otros genes situados en la región. Así pues, *RET* sería el principal causante de la aparición del fenotipo, y 3p21 y 19q12 constituirían loci modificadores.

En otro estudio similar llevado a cabo por Carrasquillo y cols en 2002, se identificaron loci de susceptibilidad para HSCR en las regiones 10q11, 13q22 y 16q23. 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 *EDNRB* correspondía con el localizado en 13q22 (previamente identificado como el principal locus HSCR en esta población, Puffenberger y cols, 1994a). 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.

Todos estos datos ponen de manifiesto nuevamente el patrón de herencia no mendeliano de HSCR, y sustentan la idea del carácter poligénico de la enfermedad.

A.3.5. Co-segregación de la enfermedad de Hirschsprung con los síndromes MEN 2.

La co-segregación de MEN 2 y HSCR es bastante infrecuente. Hasta la fecha sólo se han reportado 20 familias afectadas con ambos fenotipos (Verdy y cols, 1982; Chretien y cols, 1994; Mulligan y cols, 1994; Borst y cols, 1995; Blank y cols, 1996; Caron y cols, 1996; Peretz y cols, 1997; Borrego y cols, 1998; Decker y cols, 1998; Romeo y cols, 1998; Sijmons y cols, 1998; Pasini y cols, 2002) y todas ellas se han asociado con mutaciones en los codones 609, 618 y 620 de *RET*. Se ha sugerido que la coexistencia de ambos fenotipos debido a la misma mutación, podría explicarse por un efecto dual. En este sentido los resultados de estudios funcionales parecen demostrar que mutaciones en los codones 609, 618 y 620, disminuyen la expresión del receptor en la superficie celular pero también son capaces de inducir la formación aberrante de homodímeros de RET, conduciendo a la activación constitutiva de las proteínas mutantes (Iwashita y cols, 1996b; Ito y cols, 1997; Chappuis-Flament y cols, 1998; Takahashi y cols, 1999). Por tanto, las mutaciones activadoras darían lugar a MEN 2 mientras que la disminución de la expresión de RET en la superficie celular generaría HSCR. El mecanismo propuesto es el siguiente sugiere que las cisteínas mutadas

podrían alterar el plegado de RET, interfiriendo parcialmente con su maduración, su transporte intracelular o su expresión estable en la membrana plasmática. Aunque los niveles de dimerización de RET fuesen bajos, la actividad de las proteínas mutantes sería suficiente para desencadenar el desarrollo de carcinoma medular de tiroides así como de feocromocitoma. Y por otra parte, la disminución de la expresión de RET en la superficie celular de los neuroblastos entéricos durante la embriogénesis, transmitiría una señalización por debajo del umbral necesario para completar su diferenciación, o para prevenir una apoptosis inapropiada. Así pues, en principio podría ser factible que una sola mutación en el codón 609, 618 o 620 funcionase a la vez como “mutación con ganancia de función”, y “como mutación con pérdida de función”, dependiendo de los tipos celulares en los que se exprese (Takahashi, 2001).

A.3.6. Factores de susceptibilidad genéticos para las formas esporádicas de HSCR.

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 MEN 2A/HSCR (Borrego y cols, 1998). En ese trabajo describíamos un pedigrí en el que postulábamos que ambos fenotipos estaban asociados a la mutación puntual C620S de *RET*. Un intenso análisis genético, mediante secuenciación directa de los genes *RET* y *GDNF* en los pacientes de esta familia, descartó la posibilidad de que el cuadro de HSCR que se observa en el único miembro que presentaba ambos fenotipos se debiera a una segunda mutación en estos genes. Sin embargo, el análisis molecular resultante demostró 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 mediante la activación de un sitio crítico de maduración (*Para más detalles sobre este pedigrí, puede consultarse Figura C.1 y sección C.1.3 de Metodología*).

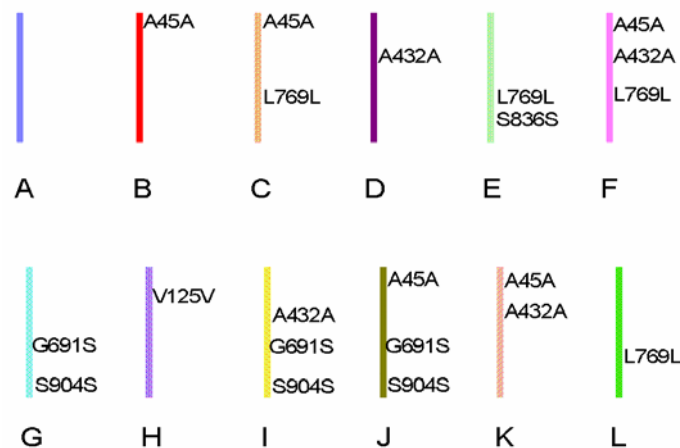
Si era cierta esa observación, la relación entre el polimorfismo A45A y el fenotipo HSCR debía contrastarse en una cohorte HSCR esporádica. Para evaluar este supuesto, nuestro grupo efectuó un estudio de casos/controles genotipando 7 cSNPs del

proto-oncogén *RET* (A45A, V125V, A432A, G691S, L769L, S836S y S904S) en 64 pacientes HSCR esporádicos y 100 controles no relacionados y sin antecedentes de enfermedades gastrointestinales relevantes (Borrego y cols, 1999). Este estudio demostró que existen dos polimorfismos silentes de *RET* (A45A y L769L) que están estrechamente asociados a la aparición del fenotipo HSCR. Específicamente, la variante A45A aparecía en 75/128 cromosomas HSCR (59%) y en 32/200 cromosomas control (16%) ($\chi^2= 62.50$, $p<<0.0001$). Por su parte, el polimorfismo L769L (c.2307T>G) se identificó en 39/128 cromosomas HSCR (30%) y en 28/200 cromosomas control (14%) ($\chi^2= 12.03$, $p= 0.0005$). Este estudio también demostró que los polimorfismos G691S (c.2071C>A) y S904S (c.2712C>G), probablemente en desequilibrio de ligamiento, aparecen subrepresentados en la cohorte HSCR respecto de la población control.

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, nuestro grupo trazó los haplotipos de *RET* constituidos por la combinación de los 7cSNPs anteriormente analizados. Este trabajo permitió identificar doce haplotipos diferentes (A-L, Figura A.8), mediante al análisis de segregación de las variantes en 57 triadas constituidas por el caso índice y sus padres. Por otra parte, los haplotipos se pudieron inferir de manera fidedigna en 65 de los 100 controles genotipados. La distribución haplotípica, demostró una desviación muy significativa al comparar casos con controles ($\chi^2= 81.4$, con 11 grados de libertad, $p<<0,0001$, Figura A.9). Todos los haplotipos que incluyen el polimorfismo A45A, estaban desviados y sobre-representados al comparar HSCR y controles. Además, la distribución de los genotipos (parejas de haplotipos) entre pacientes y controles también mostró una notoria diferencia ($\chi^2= 93.8$, con 37 grados de libertad, $p<<0,0001$). Es interesante resaltar que se identificaron genotipos exclusivos tanto en la cohorte HSCR (BB, BH, CD y BD), como en el grupo control (AA, DD, GG, GJ, AG) (Borrego y cols, 2000). El análisis de los resultados mediante test de desequilibrio de transmisión ("*Transmisión disequilibrium test*") reveló que los haplotipos B, C, F y H son los más frecuentemente transmitidos de padres a hijos afectados, mientras que los menos frecuentes son A, D y G. Consiguientemente el análisis de mapeo genético empleando desequilibrio de ligamiento, parecía indicar la existencia de al menos dos loci de susceptibilidad para HSCR independientes en nuestra población. Uno de ellos estaría en desequilibrio de

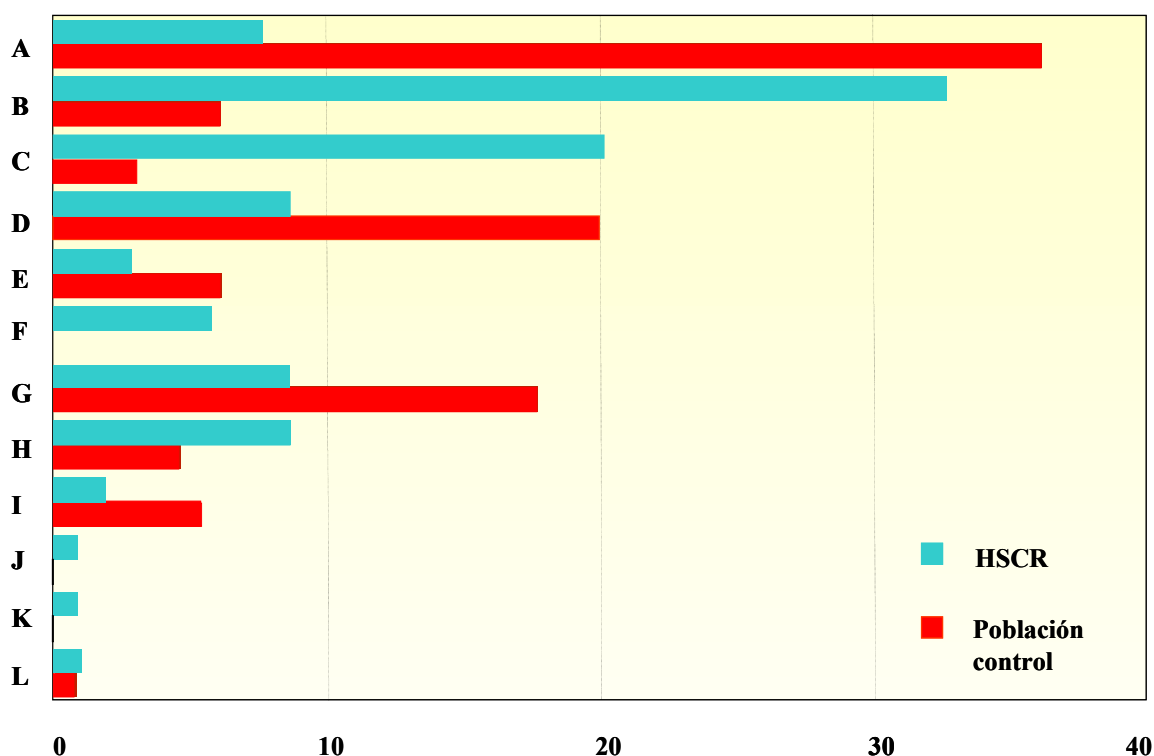
ligamiento con los haplotipos B, C y F, y el otro locus estaría asociado específicamente con el haplotipo H.

Figura A.8. Haplotipos de *RET* generados por la combinación de las siete variantes situadas en su secuencia codificante.



Los trabajos llevados a cabo por nuestro grupo supusieron la identificación de los primeros factores de susceptibilidad genéticos asociados a la enfermedad de Hirschsprung (véase OMIM 142623). Además, la relevancia de los datos aportados por nuestro grupo fue confirmada en una cohorte de 62 casos HSCR de origen alemán y un grupo de 156 controles, empleando una metodología similar (Fitze y cols, 1999). Estudios mutacionales realizados con posterioridad en esa cohorte alemana han demostrado que en pacientes HSCR con mutación en *RET*, A45A parece modificar el fenotipo mediante una interacción intragénica de esta variante con la mutación (Fitze y cols, 2002, 2003).

Figura A.9. Distribución de los haplotipos *RET* encontrados en los casos HSCR esporádicos y en los individuos control.



Los resultados obtenidos en la población española también se confirmaron en un estudio muy reciente llevado a cabo en la población china, siendo estos hallazgos particularmente interesantes al tratarse de una población genéticamente tan diferente a la nuestra (García-Barceló y cols, 2003b). En este trabajo se volvió a detectar una sobre-representación de los polimorfismos A45A y L769L en HSCR *versus* controles. Así, el análisis haplotípico reveló la clara asociación del haplotipo que porta las dos variantes (lo que nosotros denominamos haplotipo C, Borrego y cols, 2000) a la aparición de la enfermedad. La diferencia con nuestros resultados radica en que la variante A432A se encuentra significativamente sub-representada en pacientes frente a controles, hecho que no ocurre en nuestra población.

Por otra parte, en un estudio similar llevado a cabo en la población italiana, se detectó la sub-representación del polimorfismo S836S en la cohorte de 92 pacientes HSCR al comparar con un grupo control (Griseri y cols, 2000), lo que sugeriría un efecto protector de la variante frente a la aparición de HSCR. Estos autores llevaron a

cabo estudios funcionales con los que se descartó el efecto directo del polimorfismo en las interacciones ADN-proteína, en la estabilidad de los transcritos o en la maduración del ARN. En cualquier caso, este fenómeno de asociación parece quedar restringido a la población italiana, puesto que dicha sub-representación no se detectó de forma estadísticamente significativa en las poblaciones española, alemana o china (Borrego y cols, 1999; Fitze y cols, 1999; García-Barceló y cols, 2003b). Además, en un estudio realizado por los mismos autores con posterioridad en 156 casos y 40 controles de origen danés, tampoco se encontró una diferencia significativa en la distribución de la variante (Griseiri y cols 2002), si bien el análisis de alelos transmitidos y no transmitidos de los padres a sus hijos afectados, demostró que el alelo polimórfico sólo era heredado por un paciente HSCR en una de las 20 familias que presentaban algún progenitor heterocigoto, existiendo consiguientemente una fuerte desviación de transmisión (*Transmission disequilibrium test*, TDT: $p=0.00057$).

Para concluir, todos los resultados publicados por nuestro grupo sugerían la existencia de un locus ancestral asociado a los haplotipos que contienen A45A, ubicado en 5' respecto a esta variante en un intervalo de 0-20Kb, región que se corresponde con el intrón 1 de *RET*. Uno de los objetivos prioritarios de la presente tesis doctoral ha sido la identificación molecular de ese locus de susceptibilidad para Hirschsprung ligado a la variante A45A de *RET*.

B. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS
DEL ESTUDIO

B.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Diversos estudios funcionales han puesto de manifiesto que el proto-oncogén *RET* se asocia, por mecanismos contrarios, tanto a la aparición de enfermedad de Hirschsprung (HSCR) como de cáncer medular de tiroides (MTC). Así, hoy día se sabe que mutaciones germinales de *RET* que conducen a una ganancia de función del receptor originan formas familiares de MTC (síndromes MEN 2), mientras que otras mutaciones que producen una pérdida de función son causantes de HSCR.

Nuestro grupo tiene evidencias muy significativas de la asociación de la variante A45A, localizada en el exón 2 de *RET*, con el fenotipo HSCR (Borrego y cols, 1999, 2000). Todos los resultados publicados previamente por nuestro grupo sugieren la existencia de un locus ancestral asociado a los haplotipos que contienen A45A, ubicado en 5' respecto a esta variante y en un intervalo de 0-20Kb (región que se corresponde con el intrón 1 de *RET*). El principal objetivo del presente proyecto de tesis es la identificación y caracterización molecular de ese locus de susceptibilidad para HSCR. En concreto, dicho locus podría estar asociado a un dominio implicado en la regulación de la expresión de *RET*. La consecución de estos objetivos contribuiría así al esclarecimiento de la base genética de esta enfermedad. Asimismo, dada la naturaleza poligénica de HSCR, hemos pretendido desarrollar una evaluación sistemática de otros genes candidatos, con el fin de identificar factores de susceptibilidad asociados a su aparición.

Por otra parte, el conocimiento sobre la etiología del cáncer medular de tiroides esporádico es bastante escaso. No obstante, puesto que mutaciones activadoras de *RET* son responsables de las formas familiares de MTC, y que la mutación somática M918T se ha encontrado en una proporción importante de tumores esporádicos, este gen pasa a ser el principal candidato como gen de susceptibilidad para las formas MTC esporádicas. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que en el punto de partida del presente trabajo, el único factor de susceptibilidad descrito para MTC esporádico en una serie de casos alemana era el polimorfismo S836S, localizado en el exón 14 de *RET*. Por consiguiente, nos planteamos la posibilidad de que cambios de secuencia de los genes que participan en la cascada metabólica de *RET*, tales como el propio receptor, sus ligandos o co-receptores, puedan jugar un papel en la patogénesis de MTC. Partiendo de

esta idea, hemos iniciado una búsqueda de factores de susceptibilidad genéticos para esta patología en esos genes candidatos.

B.2 OBJETIVOS PLANTEADOS

1. Identificación y caracterización molecular de un nuevo locus HSCR, ligado a los haplotipos que contienen el polimorfismo A45A del gen *RET*.
2. Análisis de mutaciones y polimorfismos en otros genes candidatos para HSCR (*GFRA1*, *GFRA2*, *GFRA3*, *GFRA4*). Evaluación de su implicación en la aparición de la enfermedad.
3. Búsqueda de factores de susceptibilidad genéticos para el MTC esporádico en genes candidatos para dicha patología.

A. INTRODUCCIÓN

A.1. Características y función del receptor tirosín-kinasa RET.

A.1.1. Aspectos moleculares del proto-oncogén RET.

El proto-oncogén *RET* es un gen que codifica para la proteína RET, un receptor de membrana con actividad tirosín-kinasa que se expresa en tejidos y tumores derivados de la cresta neural (Takahashi y cols, 1985, 1987, 1988; Santoro y cols, 1990; Nakamura y cols, 1994). Como su propio acrónimo sugiere, *RET* (REarranged during Transfection) fue clonado por primera vez por Takahashi y cols en 1985 como un oncogén quimérico, durante un ensayo clásico de transformación de células NIH 3T3 con ADN procedente de linfoma humano.

RET se localiza en la región cromosómica 10q11.2 (Ishizaka y cols, 1989) con una orientación 5' centromérica / 3' telomérica (Pasini y cols, 1995a). Su estructura genómica se ha podido determinar mediante diferentes estrategias (Kwok y cols, 1993; Ceccherini y cols, 1994; Pasini y cols, 1995a; Myers y cols, 1995) y hoy día se sabe que consta de 21 exones distribuidos a lo largo de 60 kilobases, resaltando que alrededor del 40% de su secuencia genómica corresponde a un inmenso intrón de 23 kb ubicado entre los exones 1 y 2.

El ARN mensajero de *Ret* ha sido ampliamente estudiado en roedores y se ha observado que su patrón de expresión está finamente regulado durante el desarrollo embrionario, apareciendo unas tasas de expresión superiores en los estadios iniciales. Durante esos estadios iniciales, *Ret* se expresa primariamente en la cresta neural, sistemas nerviosos central y periférico y sistema excretor, donde está implicado en el desarrollo, migración y supervivencia celular (Pachnis y cols, 1993; Avantaggiato y cols, 1994; Schuchardt y cols, 1994; Tsuzuki y cols, 1995). En consonancia con su patrón de expresión, se ha visto que los ratones a los que se les provoca un bloqueo de la expresión de *Ret* durante su desarrollo embrionario (*Ret* "knockout"), carecen de nervios entéricos y ganglios cervicales superiores y presentan agenesia o disgenesia renal (Schuchardt y cols, 1994; Durbec y cols, 1996). Además, en base a esos estudios realizados en los ratones mutantes, se pudo demostrar que la mayor parte del sistema nervioso entérico y los ganglios cervicales superiores se originan a partir de un pequeño grupo de células de la cresta neural derivadas del rombencéfalo en un proceso que

depende del funcionamiento de Ret (Durbec y cols, 1996). También se han realizado estudios de expresión en tejido adulto de rata, observándose bajos niveles de expresión en pulmón, corazón, bazo, e intestino delgado, y altos niveles en cerebro, timo y testículo (Tahira y cols, 1988).

En cuanto a estudios en humanos, la expresión de *RET* se detectó inicialmente en tumores derivados de la cresta neural tales como neuroblastoma, feocromocitoma y carcinoma medular de tiroides (Ikeda y cols, 1990; Santoro y cols, 1990; Takahashi y cols, 1991). Actualmente, la información sobre los perfiles de expresión de *RET* en tejidos sanos humanos está disponible en diversas bases de datos, entre las que se encuentra *GeneNote* (Gene Normal Tissue Expression), que recoge los resultados de los experimentos realizados por el Weizmann Institute of Science, basados en la tecnología “*DNA array*” (http://genecards.weizmann.ac.il/cgi-bin/genenote//GN_search.pl).

La importancia clínica de *RET* radica en su implicación en ciertas enfermedades humanas, tal como se describirá más adelante. Así por ejemplo, una proporción de casos de carcinoma papilar de tiroides son debidos a translocaciones somáticas que implican a *RET* y a otros genes activadores. También se han encontrado mutaciones somáticas de *RET* en un porcentaje de casos de cáncer medular de tiroides. Por último, mutaciones germinales que conducen a una ganancia de función del receptor son causantes de los síndromes de neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (MEN 2; “*Multiple Endocrine Neoplasia type 2*”), mientras que mutaciones que conllevan una pérdida de función originan la enfermedad de Hirschsprung (HSCR).

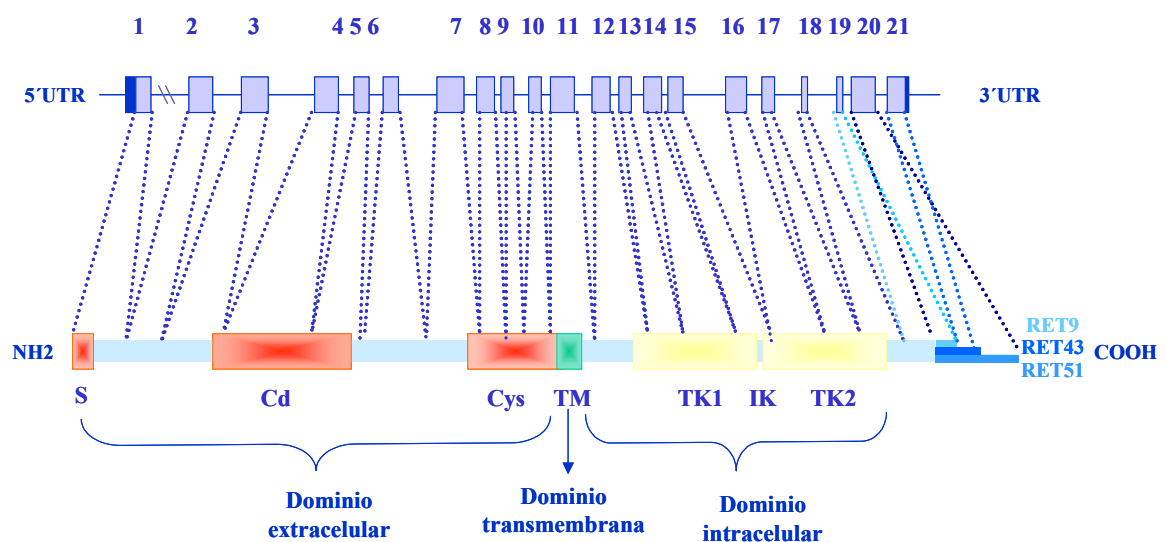
A.1.2. Estructura de la proteína RET.

Estructuralmente, la proteína RET es una molécula relativamente grande con un peso molecular de alrededor de 124 Kdaltons. Como la mayoría de los miembros de la familia de receptores tirosín kinasa (RTK), RET contiene un dominio extracelular, un dominio transmembrana, y un dominio intracelular (Figura A.1).

El dominio extracelular no presenta homología con ningún otro receptor tirosín-kinasa (Takahashi y cols, 1988, 1989). Incluye un péptido señal constituido por 28 aminoácidos, así como una región con alta homología a la familia de moléculas de adhesión intercelular cadherinas, y una región rica en cisteínas. Veintisiete de los 28 residuos cisteínicos de dicha región se conservan 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 de la proteína (Takahashi y cols, 1989; Schneider, 1992; Iwamoto y cols, 1993). Recientemente se han realizado estudios bioinformáticos para profundizar en el conocimiento de la estructura molecular del dominio extracelular de RET. En uno de esos estudios se ha encontrado que en total hay 4 dominios diferentes con homología a cadherinas, y que entre el segundo y el tercer dominio hay un sitio de unión a Ca^{2+} (Anders y cols, 2001).

Figura A.1. Esquema de la estructura genómica del proto-oncogén *RET* y de su correspondiente proteína. Se muestran cada una de las isoformas de la proteína RET resultantes de la maduración alternativa del extremo 3' de *RET*.



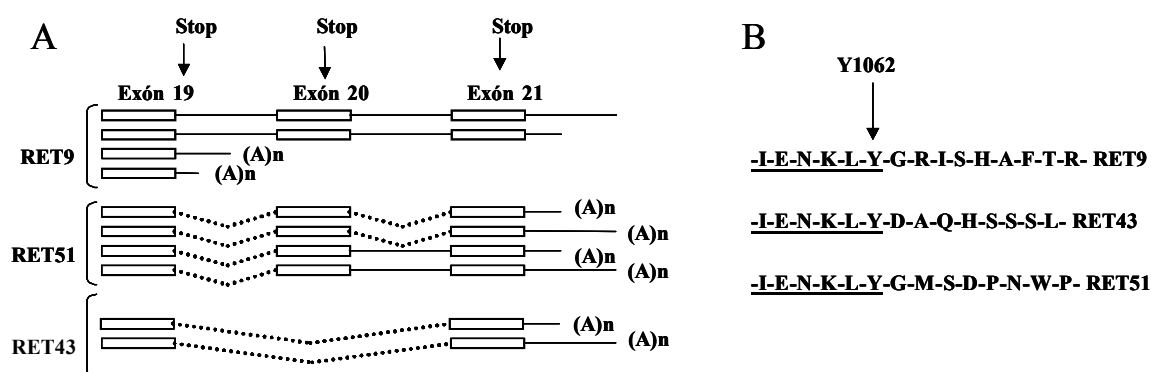
S: Péptido señal; Cd: Región con homología a cadherinas; Cys: Dominio rico en cisteínas; TM: Dominio transmembrana; TK1 y TK2: Dominios tirosín-kinasa; IK: Región entre los dominios tirosín-kinasa.

El dominio intracelular incluye al dominio con actividad tirosín-kinasa, donde reside la actividad catalítica del receptor, que se encuentra interrumpido por una región intermedia de 27 aminoácidos. Este dominio tirosín-kinasa se activa mediante la fosforilación de determinados residuos tirosínicos, desencadenando la activación de

ciertas rutas de señalización celular. Se han encontrado ciertas similitudes entre el dominio tirosín-kinasa de RET y el de los receptores de los factores de crecimiento derivados de plaquetas (Hanks y cols, 1988).

Existen varios transcritos distintos generados por la maduración alternativa del extremo 3' de *RET*, y que a su vez dan lugar a tres isoformas proteicas que difieren en su extremo carboxi-terminal (Tahira y cols, 1990; Myers y cols., 1995) (Figuras A.1 y A.2).

Figura A.2. Patrón de maduración del ARN mensajero de *RET*.



A). Los distintos transcritos de *RET* proceden de la combinación de exones alternativos en el extremo 3', y del uso de diferentes sitios de poliadenilación. (A)_n: cola de poliadeninas; línea continua: intrones presentes en el transcrito; línea punteada: intrones ausentes. B) Secuencia aminoacídica que rodea a la tirosina 1062 en las tres isoformas proteicas de RET.

Una serie de hechos indican que estas isoformas, conocidas como RET9 (1072 aa), RET43 (1106 aa) y RET51 (1114 aa), presentan distintas propiedades biológicas y bioquímicas. (i) Se ha demostrado que la tirosina Y1062 juega un papel importante en la señalización celular mediada por RET (Takahashi, 2001; Couplier y cols, 2002). Y1062 representa un sitio de unión para varias moléculas adaptadoras tales como SHC, SNT/FRS2, IRS1, DOK1, DOK4, DOK5 y Enigma (Kurokawa y cols, 2003). Como consecuencia, varias rutas de señalización entre las que se encuentran las de RAS/ERK, PI-3K/AKT, p38MAPK, JNK y ERK5, se activan principalmente a través de la fosforilación de Y1062. Pues bien, el contexto en el que se encuentra esta tirosina es

diferente en cada isoforma proteica, variando consiguientemente la afinidad de unión de las distintas moléculas efectoras. (ii) Por otra parte, RET51 presenta residuos tirosínicos adicionales que están ausentes en RET9 y RET 43. Uno de ellos es Y1096, que proporciona un sitio de unión para la molécula adaptadora GRB2. (iii) Por último, se ha comprobado que hay diferencias notorias en la expresión de las isoformas durante el desarrollo embrionario. Así por ejemplo, la cantidad relativa de transcritos de RET51 está fuertemente regulada durante el desarrollo del riñón. En este tejido, la expresión de la isoforma RET51 es muy baja en comparación con la de RET9 durante las primeras semanas de gestación, pero posteriormente aumenta rápidamente hasta multiplicarse por siete (Ivanchuk y cols, 1998). Como consecuencia de todo esto se piensa que las distintas isoformas de RET podrían jugar diferentes papeles en el desarrollo y/o en los procesos tumorigénicos en que se ha visto que RET es partícipe.

A.1.3. Mecanismo de activación del receptor RET. Formación del complejo multimérico.

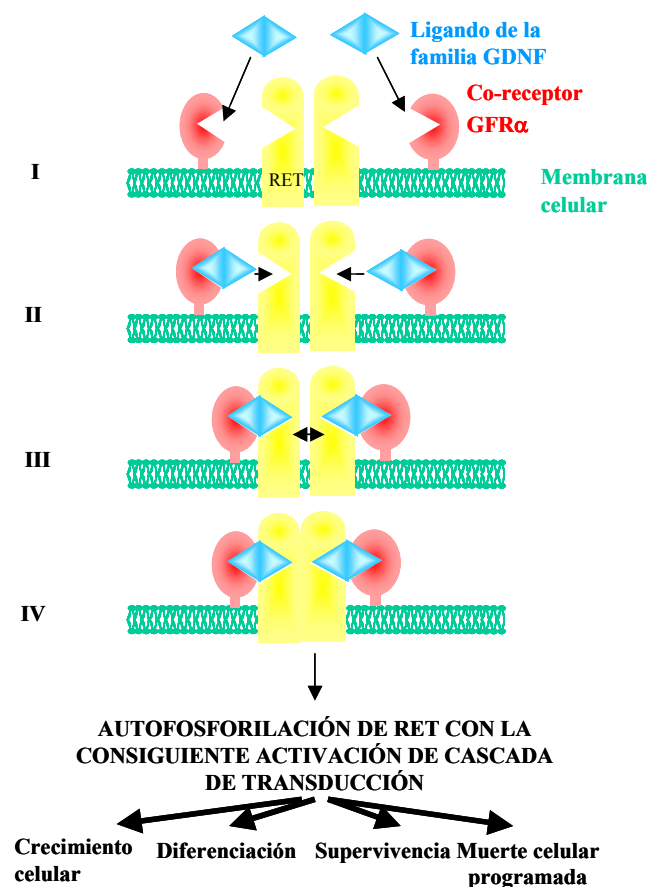
A diferencia de otros RTKs de mamíferos, la activación de la proteína RET requiere la previa formación de un complejo heterotetramérico, en el que participan miembros de dos grupos distintos de proteínas: un ligando soluble de la familia de factores neurotróficos derivados de la glía ("*Glial Derived Neurotrophic Factors*", GDNF), y un co-receptor unido a la superficie celular de la familia de receptores α de GDNF.

Los ligandos GDNF son miembros de la subfamilia TGF- β (Lin y cols, 1993) y se ha visto que todos ellos actúan como potentes factores de supervivencia neuronal (Baloh y cols, 2000). Hasta la fecha se han identificado 4 miembros pertenecientes a esta familia, que son GDNF, neurturina (NTN), artemina (ART) y persefina (PSP). Todos estos factores contienen un nodo cisteínico constituido por siete residuos cisteínicos conservados y espaciados de forma similar, y aproximadamente el 40% de su secuencia aminoacídica es idéntica. Se ha observado que GDNF, NTN y ART están implicados en la supervivencia de un amplio espectro de neuronas tanto periféricas como centrales, mientras que PSP participa en la supervivencia de neuronas

dopaminérgicas motoras y de la sustancia nigra tanto *in vivo* como *in vitro*, pero no en la de neuronas periféricas (Takahashi, 2001).

Aunque los cuatro miembros de la familia GDNF actúan como ligandos de RET, no se unen directamente a este receptor sino que han de interaccionar previamente con un co-receptor de la familia GFR α (Figura A.3).

Figura A.3. Activación del receptor RET por parte de los miembros de la familia GDNF.



Estos co-receptores no tienen dominios intracelulares, sino que se encuentran anclados a la membrana celular a través de un enlace glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (Treanor y cols, 1996; Jing y cols, 1996). Hasta el momento se han identificado 4 co-receptores GFR α , conocidos como GFR α 1, GFR α 2, GFR α 3 y GFR α 4. Cada uno de los ligandos GDNF tiene una especial afinidad por un co-receptor GFR α concreto. Así, GDNF se une preferentemente a GFR α 1, NTN a GFR α 2, ART a GFR α 3 y PSP a GFR α 4, si bien también se pueden dar otras interacciones ligando-coreceptor diferentes,

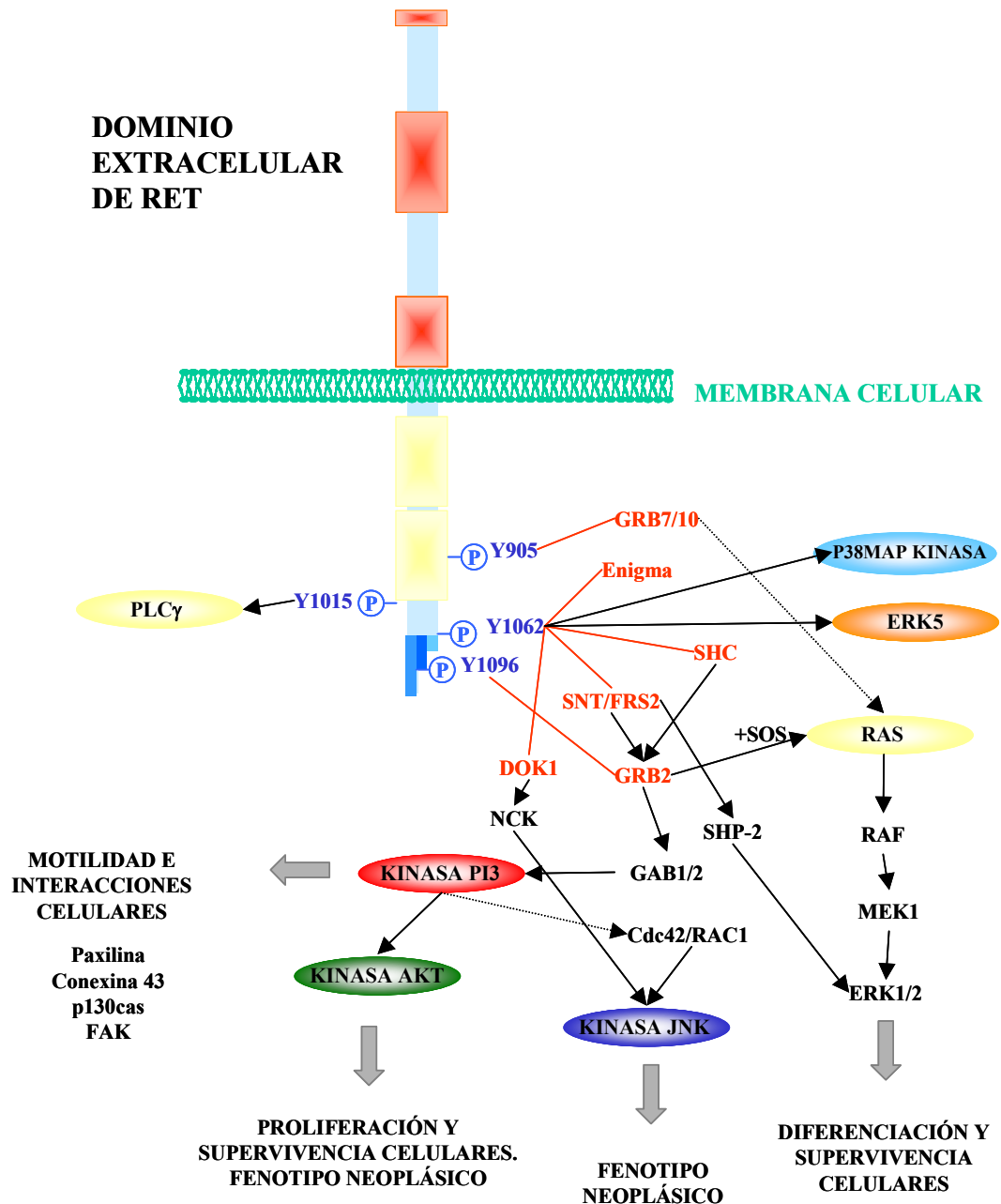
aunque con menor afinidad (Jing y cols, 1996; Treanor y cols, 1996; Buj-Bello y cols, 1997; Klein y cols, 1997; Sanicola y cols, 1997; Baloh y cols, 1998; Enokido y cols, 1998). En resumen, parece necesaria la interacción de uno de los 4 ligandos (GDNF, NTN, PSP, ART) con alguno de sus 4 correceptores ($GFR\alpha 1-4$), antes de que el complejo resultante pueda interactuar con RET, produciendo su dimerización y autofosforilación (Figura A.3). Este sería el punto de partida de la cascada de activación, dependiente de RET, que se genera en respuesta a las señales externas. Fisiológicamente, RET parece transducir intracelularmente señales externas muy diversas, en diferentes tejidos y en diferentes estadios del desarrollo; éstas irían desde señales de diferenciación, de crecimiento tisular, de supervivencia o apoptosis (Takahashi y cols, 2001).

A.1.4. Señalización celular mediada por RET.

RET ejerce sus funciones en la célula a través de una compleja serie de interacciones con varios tipos de moléculas. Así, cuando RET se activa puede desencadenar respuestas de crecimiento, diferenciación o supervivencia, dependiendo del tipo celular, así como de la etapa del desarrollo en que se dé dicha activación. Como se ha mencionado anteriormente, la dimerización de los receptores RET desencadena la autofosforilación de residuos tirosínicos intracelulares. Hasta la fecha se ha demostrado que de las 18 tirosinas intracelulares de RET, 9 pueden fosforilarse como consecuencia de la activación del receptor (Takahashi y cols, 1988; Liu y cols, 1996). Seguidamente, ciertas moléculas adaptadoras que contienen dominios SH2, reconocen la secuencia aminoacídica que rodea a los residuos fosforilados e interactúan con estos sitios de manera específica. Entre esas interacciones se encuentran la de GRB7 y GRB10 (“*Growth factor Receptor-Bound protein 7 y 10*”), que se unen a la tirosina Y905; la fosfolipasa C- γ (PLC- γ) interactúa con la tirosina Y1015; la tirosina Y1062 es diana de una gran variedad de moléculas tales como SHC, SNT/FRS2 (“*Fibroblast growth factor Receptor Substrate 2*”), IRS1 (“*Insulin Receptor Substrate 1*”), DOK1, DOK4, DOK5 (“*Docking protein 1, 4 y 5*”) y Enigma; por último GRB2 (“*Growth factor Receptor-Bound protein 2*”) se une a la tirosina Y1096 (Figura A.4) (Borrello y cols, 1994, 1996; Pandey y cols, 1995; Asai y cols, 1996; Arighi y cols, 1997; Lorenzo y

cols, 1997; Alberti y cols, 1998; Durick y cols, 1998; Grimm y cols, 2001; Kurokawa y cols, 2001; Melillo y cols, 2001a, 2001b; Murakami y cols, 2002).

Figura A.4. Rutas de señalización en las que participa RET.



Como resultado de las interacciones de las formas fosforiladas de RET con todas estas proteínas adaptadoras, se activan varias rutas de señalización conocidas, en las que participan MAP-quinasas (“*Mitogen Activated Protein kinases*”). Las cascadas de las MAP kinasas están altamente conservadas en eucariotas y participan en varias rutas de señalización celular que controlan un amplio espectro de respuestas celulares, incluyendo crecimiento, diferenciación y respuestas ante estrés. Las MAP kinasas son una familia de serín/treonín-quinasas que incluyen p42/44^{MAPK} (también conocidas como ERK1 y ERK2, “*Extracellular signal-regulated kinases*”), JNK/SAPK (proteín kinasa activada por estrés, “*c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase*”), kinasa p38 y kinasa ERK5 o MEK5.

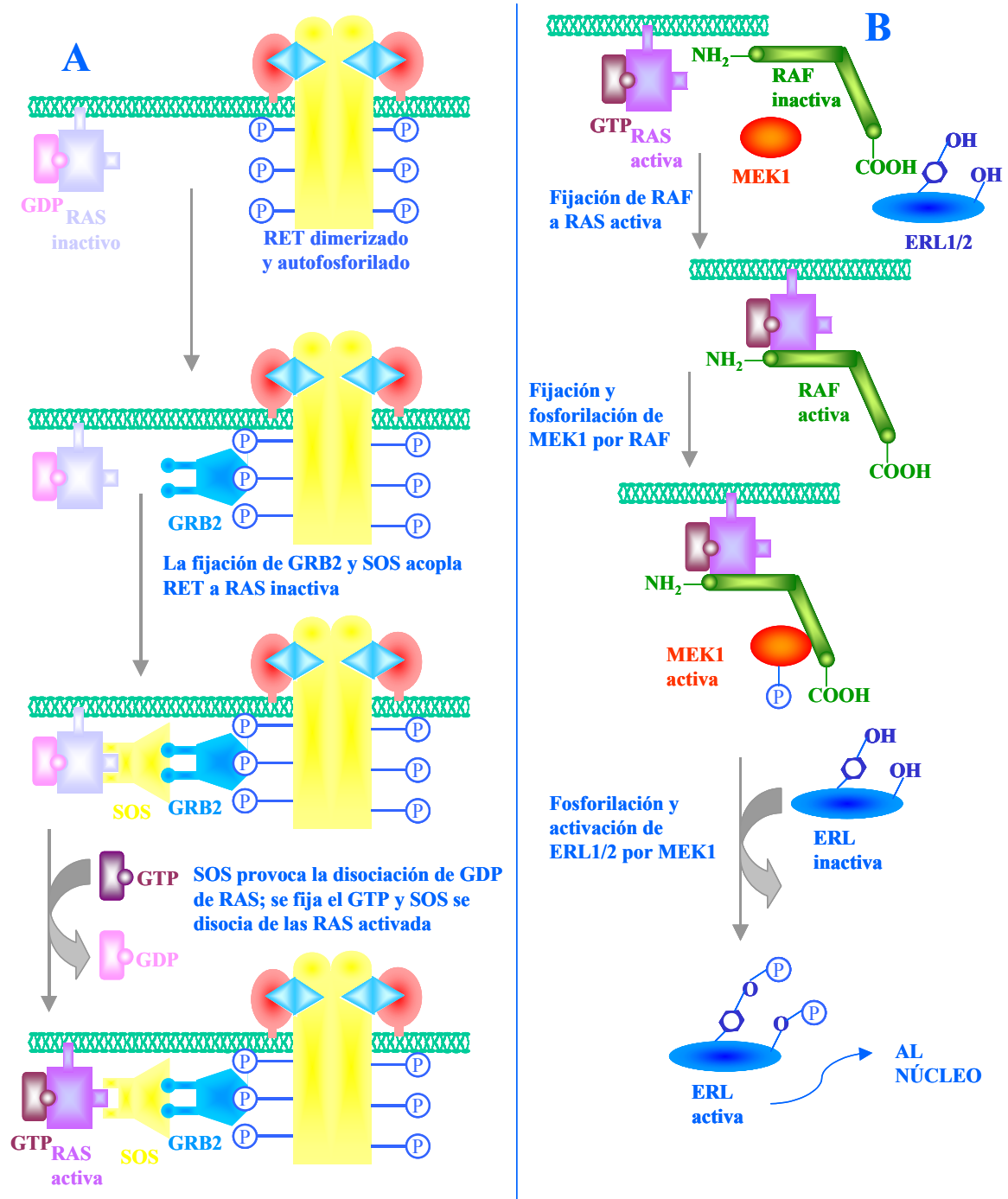
También se ha observado que RET interacciona con la fosfolipasa C- γ (PLC- γ) a través de la tirosina Y1015, desencadenando la activación de esta ruta (Borrello y cols, 1996; Hansford y Mulligan, 2000; Figura A.4).

A.1.4.1. Activación de la ruta RAS/ERK.

Se ha demostrado que RET es capaz de desencadenar la ruta de RAS-ERK, la cual es esencial tanto para la supervivencia como para la diferenciación neuronal (Figura A.4) (Califano y cols, 1995, 2000; van Weering y cols, 1995; Worby y cols, 1996). La cascada RAS-ERK se puede originar a través de la interacción de Y1062 de RET con la molécula adaptadora SHC o SNT/FRS2, lo que provoca la activación de GRB2, que a su vez activa a RAS. Alternativamente la activación de esta ruta se puede dar por interacción directa de la tirosina Y1096 con GRB2. También se ha visto que la interacción de GRB7 o GRB10 con Y905 está relacionada con la activación de esta ruta (Iwashita y cols, 1996a) (Figura A.5).

La proteína GRB2 se acopla por un lado a uno de los residuos de fosfotirosina de RET, y por el otro a otra proteína conocida como SOS que, al ser activada por GRB2, funciona como una proteína de intercambio de guanina. Concretamente la unión de SOS a la proteína RAS convierte a ésta en su forma activa asociada a GTP, dotándola entonces de capacidad para desencadenar toda una cascada de proteín-quinasas que influirán en los procesos de proliferación y diferenciación celulares. La proteína RAS activada se unirá al dominio N-terminal de RAF, una kinasa de serinas/treoninas.

Figura A.5. Cascada RAS/ERK.



RAF se unirá y fosforilará a la proteína MEK1, otra proteína-kinasa que fosforila residuos de serina y tirosina. MEK1 fosforilará y activará a la MAP-kinasa ERK1 o ERK2. Estas ERK sufren una translocación al núcleo celular, y allí pueden fosforilar a

muchas proteínas, incluidos factores de transcripción que regulan la expresión de importantes proteínas del ciclo celular y de la diferenciación (Figuras A.4, A.5).

Entre esos factores de transcripción se encuentra la proteína CREB (“*cAMP Response Element binding*”), que es capaz de activar la transcripción de genes conocidos como genes de acción inmediata o temprana (IEG, “*Immediate Early-genes*”). Algunos de esos genes IEG codifican para otros factores de transcripción, que a su vez influirán posteriormente para activar a los genes de acción tardía.

Pues bien, se ha visto que en algunos tipos celulares la activación mediada por RET de las rutas dependientes de RAS puede dar lugar a una diferenciación celular (Califano y cols, 2001). En cambio, en otros tipos celulares RET podría llegar a bloquear la diferenciación inducida por RAS evitando la translocación nuclear de ERK, y consiguientemente la inducción de la transcripción de genes IEG (Colucci-D’Amato y cols, 2000).

A.1.4.2. Activación de la ruta PI-3K/AKT.

La activación de la enzima fosfoinositol-3-kinasa (PI-3K), probablemente a través de la interacción de RET con GRB2 y GAB1 o GAB2, también se encuentra implicada en la proliferación y la supervivencia celular (Murakami y cols, 1999; Soler y cols, 1999). La estimulación de esta ruta por parte de RET está asociada con la motilidad e interacciones celulares, y puede conducir a la formación de lamelipodios y a la fosforilación de proteínas relacionadas con la formación de adhesiones focales (como la paxilina, FAK, p130cas...), o con el aumento de expresión de la conexina-43 (Romano y cols, 1994; Xing y cols, 1996; van Weering y cols, 1998; Murakami y cols, 1999b; Segouffin-Cariou y cols, 2000). RET también actúa a través de la PI3-K para estimular a la proteín-kinasa B o AKT-kinasa, que activa al factor de transcripción NFκB, jugando así un papel importante en la supervivencia y proliferación celular, pero también pudiendo participar en procesos neoplásicos (Murakami y cols, 1999; Soler y cols, 1999; Segouffin-Cariou y cols, 2000) (Figura A.4).

A.1.4.3. Activación de la ruta JNK.

También se ha mostrado que RET activa la cascada de la kinasa JNK a través de la GTPasa cdc42/RAC1. La kinasa JNK activa varios factores de transcripción entre los que se encuentra c-jun. La regulación de c-jun por JNK modula la apoptosis inducida por estrés en ciertos tipos celulares, y podría también jugar un papel en la inducción de los procesos de reparación de ADN en respuesta a daño genotóxico. Esta ruta está implicada en procesos neoplásicos (Marshall y cols, 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 y cols, 2003) (Figura A.4).

A.2. Aspectos clínicos y bases moleculares de la neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (MEN 2) y el cáncer medular de tiroides esporádico.

A.2.1. Clasificación clínica de los síndromes MEN 2.

El cáncer medular de tiroides (MTC) representa aproximadamente el 5-10% de todos los tumores malignos de tiroides. Alrededor del 75% de todos los casos de MTC registrados son esporádicos, y los restantes (25%) están englobados en un cuadro hereditario conocido como neoplasia endocrina múltiple 2 (MEN 2) (Eng, 1999). El MEN 2 es un síndrome canceroso mendeliano autosómico dominante, que incluiría los siguientes cuadros clínicamente diferenciables: neoplasia endocrina múltiple 2A y 2B (MEN 2A y MEN 2B) y cáncer medular de tiroides familiar (FMTC). Las características clínicas de los diferentes cuadros, están resumidas en la Tabla A.1.

El síndrome MEN 2A se presenta con la clásica tríada de MTC, feocromocitoma (PHEO) en aproximadamente el 50% de los casos, e hiperparatiroidismo (HPT) 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 HPT, pero va acompañado de anomalías del desarrollo como hábito marfanoide, ganglioneuromatosis, neuromas mucosos y engrosamiento de fibras nerviosas corneales (Gorlin y cols, 1968; Eng, 1999).

Finalmente, el FMTC tiene como único fenotipo el cáncer medular de tiroides (Farndon y cols, 1986; Eng, 1999). Se piensa que el curso de MTC en estas familias es más benigno que en MEN 2A y MEN 2B, y el pronóstico es más favorable.

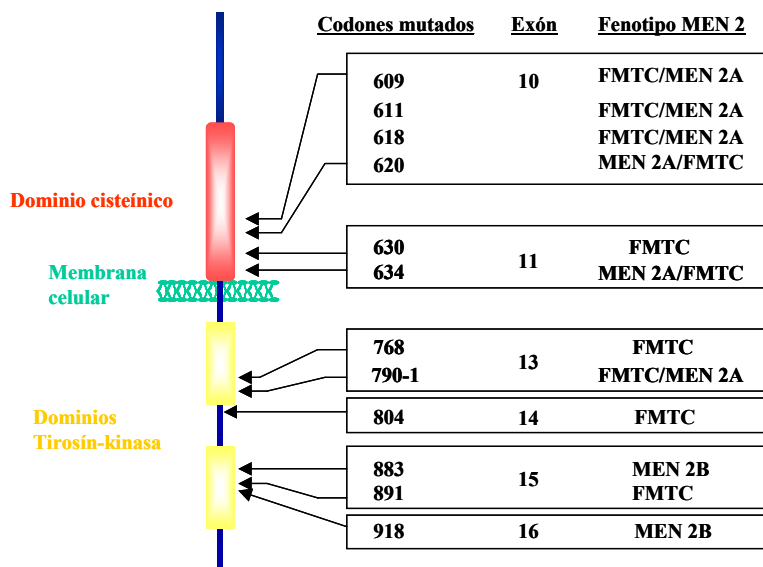
Tabla A.1. Subtipos clínicos de los síndromes MEN 2

	MTC	PHEO	HPT	OTROS RASGOS
MEN 2A	+	+	+	Es la forma más común. Normalmente no tiene otros rasgos asociados
MEN 2B	+	+	-	<ul style="list-style-type: none"> • Anormalidades músculo-esqueléticas: <ul style="list-style-type: none"> - Hábito marfanoide - Pies cavos - <i>Pectus excavatum</i> - Hipotonía y debilidad muscular • Neuromas en labios, lengua y conjuntiva • Engrosamiento de las fibras nerviosas corneales • Ganglioneuromatosis del intestino
FMTC	+	-	-	Es de manifestación tardía y curso lento

A.2.2. Genética de los síndromes MEN 2.

A diferencia de otros síndromes cancerosos, que están asociados a la inactivación de genes supresores de tumores, los síndromes MEN 2 se producen por mutaciones activadoras del proto-oncogén *RET*. Se estima que aproximadamente el 92% de los casos de MEN 2 presentan mutaciones germinales en seis exones distintos de *RET* (exones 10, 11, 13, 14, 15 y 16) (Eng y cols, 1996a; Eng, 1999) (Figura A.6, Tabla A.2).

Figura A.6. Representación de la localización de las mutaciones de *RET* causantes de los síndromes MEN 2.



En MEN 2A el 98% de los pacientes tienen mutaciones germinales identificables. Estas alteraciones aparecen agrupadas en un sitio caliente de mutaciones específico que se corresponde con 5 codones cisteínicos presentes en el dominio extracelular de la proteína (codones 609, 611, 618, 620 y 634) (Mulligan y cols, 1995; Eng y cols, 1996a). Rara vez se han observado la aparición de duplicaciones/inserciones en el exón 11 que se traducen en la inserción de 3 o 4 aminoácidos en el dominio cisteínico del receptor (Höppner y Ritter, 1997). Además, sólo en una ocasión se ha descrito una mutación afectando al codón 631, que si bien no es cisteínico se encuentra localizado próximamente a los codones cisteínicos 630 y 634 (Berndt y cols, 1998). Aproximadamente el 87% de las mutaciones MEN 2A afectan al codón 634, siendo la sustitución más frecuente la de cisteína por arginina (C634R), encontrada en más del 50% de los casos (Mulligan y cols, 1995; Eng y cols, 1996a). En España, la tasa de mutaciones de las familias MEN 2A ha ofrecido unos resultados comparables con los obtenidos en otras poblaciones. Sin embargo, cabe destacar la mayor prevalencia de la mutación C634Y, lo que sugiere un efecto fundador de esta mutación en nuestra población (Sánchez y cols, 1998; 1999). Los estudios bioquímicos efectuados con las proteínas mutadas en los codones cisteínicos, indican que los cambios de aminoácidos

localizados en esta región, conducen a la pérdida de los puentes disulfuros intramoleculares presentes en la proteína normal. En consecuencia, aún en ausencia de señales externas, las proteínas deletéreas sufren dimerizaciones espontáneas provocando a su vez una autofosforilación de los dímeros de RET, que permanecen activos de manera autónoma. La consecuencia final es la activación constitutiva de las vías metabólicas de señalización de RET, siendo ésta la alteración primaria que produce la transformación de las células parafoliculares del tiroides (Borrello y cols, 1995; Santoro y cols, 1995; Rossel y cols, 1997).

Muchas de las mutaciones causantes de MEN 2A, también pueden originar FMTC. En más del 80% de las familias FMTC se han encontrado sustituciones en los codones cisteínicos 609, 611, 618, 620 y 634, si bien su distribución es menos uniforme. Curiosamente, la mutación C634R, que es la más frecuente en MEN 2A, no aparece nunca asociada a FMTC (Mulligan y cols, 1995; Eng y cols, 1996a). Existen también descripciones de mutaciones localizadas en el codón cisteínico 630, y de inserciones que introducen nuevas cisteínas en el dominio cisteínico del receptor (Komminoth y cols, 1995; Pigny y cols, 1999). Además de las mutaciones que afectan a las cisteínas extracelulares, FMTC se encuentra también asociado a sustituciones aminoacídicas que afectan al dominio intracelular, en los codones 768, 790, 791, 804 y 891 (Eng y cols, 1995a; Bolino y cols, 1995; Fink y cols, 1996; Boccia y cols, 1997; Hofstra y cols, 1997; Berndt y cols, 1998; Dang y cols, 1999; Antiñolo y cols, 2002). El mecanismo funcional de estas últimas mutaciones no ha sido suficientemente aclarado. No obstante, se piensa que estos cambios podrían conducir a un incremento de la unión de ATP a las proteínas mutadas y/o a la alteración de la especificidad de sustrato de RET (Bolino y cols, 1995; Eng y cols, 1995a; Pasini y cols, 1997; Dang y cols, 1999; Iwashita y cols, 1999).

En el caso de MEN 2B, aproximadamente el 95% de los pacientes portan la mutación M918T (exón 16), y alrededor del 2-3% porta la mutación A883F (exón 15) (Carlson y cols, 1994; Eng y cols, 1994, 1996 a; Hofstra y cols, 1994; Mulligan y cols, 1995; Gimm y cols, 1997; Smith y cols, 1997). Ambas mutaciones, aparecen en la zona de reconocimiento y unión del sustrato a RET alterando la especificidad de la proteína, que parece fosforilar con mayor afinidad los sustratos propios de las kinasas

citoplasmáticas (Songyang y cols, 1995; Bocciardi y cols, 1997; Murakami y cols, 1999).

Tabla A.2. Mutaciones del proto-oncogén *RET* y los síndromes MEN 2 asociados

Exón	Codón	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Fenotipo	
10	609	TGC a CGC	Cys a Arg	MEN2A, FMTC	
		TGC a TAC	Cys a Tyr	MEN2A	
	611	TGC a TAC	Cys a Tyr	MEN2A	
		TGC a TGG	Cys a Trp	MEN2A, FMTC	
		TGC a GGC	Cys a Gly	FMTC	
	618	TGC a TTC	Cys a Phe	MEN2A	
		TGC a TCC	Cys a Ser	MEN2A, FMTC	
		TGC a AGC	Cys a Ser	MEN2A, FMTC	
		TGC a GGC	Cys a Gly	MEN2A	
		TGC a CGC	Cys a Arg	MEN2A, FMTC	
		TGC a TAC	Cys a Tyr	MEN2A, FMTC	
		TGC a TGA	Cys a Stop	MEN2A	
		620	TGC a CGC	Cys a Arg	MEN2A, FMTC
			TGC a TAC	Cys a Tyr	MEN2A
			TGC a TTC	Cys a Phe	MEN2A
	11	630	TGC a TCC	Cys a Ser	MEN2A
			TGC a GGC	Cys a Gly	MEN2A
		634	TGC a TTC	Cys a Phe	FMTC
			TGC a TAC	Cys a Tyr	MEN2A, FMTC
TGC a CGC			Cys a Arg	MEN2A	
TGC a TTC			Cys a Phe	MEN2A, FMTC	
TGC a GGC			Cys a Gly	MEN2A	
TGC a TGG			Cys a Trp	MEN2A	
TGC a AGC			Cys a Ser	MEN2A	
TGC a TCC			Cys a Ser	MEN2A, FMTC	
13			768	GAG a GAC	Glu a Asp
	GAG a GAT	Glu a Asp		FMTC	
	790	TTG a TTT	Ley a Phe	MEN2A, FMTC	
TTG a TTC		Ley a Phe	MEN2A, FMTC		
14	791	TAT a TTT	Tyr a Phe	FMTC	
		804	GTG a TTG	Val a Leu	FMTC
	GTG a ATG		Val a Met	FMTC	
15	804 y 806	804-GTG a ATG	Val a Met	MEN2B	
		806-TAC a TGC	Tyr a Cys		
	883	GCT a TTT	Ala a Phe	MEN2B	
16	891	TCG a GCG	Ser a Ala	FMTC	
	918	ATG a ACG	Met a Thr	MEN2B	
Duplicaciones	Nº de base	Secuencia insertada	Aminoácidos insertados	Fenotipo	
8	1741-1742	Ins GAG GAG TGT	EEC 531-532	FMTC	
11	2056-2057	Ins TCG CGC ACG	CRT 636-637	MEN2A	
	2049-2050	Ins ACG AGC TGT GCC	TSCA 634-635	MEN2A	

También se ha encontrado un caso MEN 2B asociado a la doble mutación V804M e Y806C (Iwashita y cols, 2000). Se ha comprobado *in vitro* que esta

combinación de variantes tiene más capacidad transformadora que cada una de las variantes por separado, y que presenta propiedades biológicas similares a las de otras mutaciones de *RET* asociadas a MEN 2B.

A.2.3. Etiología del cáncer medular de tiroides esporádico.

El cáncer medular de tiroides esporádico, se define como un tumor de células parafoliculares del tiroides, que aparece en un paciente sin antecedentes familiares ni otras características asociadas a los cuadros de MEN 2, y sin ninguna alteración germinal característica del cuadro sindrómico (Schimke, 1984; Eng, 1999). Sin embargo varios estudios poblacionales han mostrado que un 3-7% de estos casos representan casos MEN 2 *de novo* con mutaciones germinales en *RET* (Eng y cols, 1995b; Wohllk y cols, 1996; Eng, 1999).

La etiología del MTC esporádico no se conoce bien. Se ha observado que de un 23 a un 70% de esos casos portan mutaciones somáticas en *RET* (Eng y cols, 1996b). No obstante, los análisis de subpoblaciones de células tumorales procedentes de un solo paciente revelan que las mutaciones en *RET* aparecen en subgrupos de clones, lo que sugiere que dichas mutaciones no son causantes del MTC, sino que aparecen durante la progresión de éste (Eng y cols, 1995b, 1998). Aunque se han descrito mutaciones en los exones 13 y 15, tratándose en la mayor parte de los casos de la mutación M918T, su mecanismo de aparición se desconoce por completo. Resultados de estudios realizados en la población alemana indican que existe una sobre-representación a nivel germinal de la variante de *RET* S836S (c.2439C>T) en los pacientes con MTC esporádico respecto a la población general, y curiosamente parece que la presencia de esta variante correlaciona con la aparición a nivel somático de M918T (Gimm y cols, 1999). Estos datos sugieren que S836S podría predisponer a la aparición de M918T, aunque esta hipótesis no está aún confirmada.

A.2.4. Factores de susceptibilidad genéticos para MTC esporádico.

El cSNP ("*coding Single Nucleotide Polymorphism*") S836S de *RET* es el primer factor de susceptibilidad genético descrito para MTC esporádico (Gimm y cols, 1999). Se trata de un cambio silente que fue identificado originalmente por nuestro grupo en el

exón 14 del proto-oncogén *RET*, en una familia afecta de MEN 2A y enfermedad de Hirschsprung (Borrego y cols, 1998). En un estudio de casos y controles realizado por Gimm y cols en 1999, se detectó la presencia de S836S en 9 pacientes de 49 (9%) y en sólo 5 controles sanos de 70 (3,6%). Al realizar el análisis estadístico comparativo entre pacientes y controles se observó una sobre-representación significativa de la variante en el grupo de pacientes (Test exacto de Fisher: $p= 0.03$). El mecanismo molecular de S836S es desconocido, aunque se postula que podría actuar creando tractos hipermutables hacia el segmento 3' del proto-oncogén *RET* dando lugar así a la mutación somática M918T, en lugar de participar directamente en el proceso tumorigénico. Alternativamente, se ha planteado que S836S podría aumentar la expresión de *RET* o generar la activación de sitios críticos de maduración, conduciendo a la producción de proteínas mutantes. En cualquier caso han de realizarse estudios funcionales adicionales para determinar con exactitud el mecanismo molecular por el que S836S parece predisponer a desarrollar cáncer medular de tiroides.

Con posterioridad se ha descrito la existencia de un nuevo factor de susceptibilidad para MTC esporádico localizado en el gen *GFRA1* (Gimm y cols, 2001). Este gen codifica para el co-receptor $GFR\alpha 1$ de RET que, como se ha descrito detalladamente en la sección A.1.3, es necesario para la dimerización y consiguiente activación de la cascada metabólica del receptor. Dado que las mutaciones de *RET* que generan una ganancia de función están asociadas con MTC, sería igualmente factible que mutaciones en genes que codifican para los miembros del complejo heterotetramérico de activación de RET, puedan afectar a la cascada metabólica del receptor y jugar así un papel en la patogénesis de MTC. En la población alemana se detectó la sobre-representación del polimorfismo $-193C>G$, situado en el extremo 5'UTR de *GFRA1*, y una sub-representación de $c.537T>C$ en el exón 4 del mismo gen, al realizar un estudio poblacional comparativo entre casos MTC esporádicos y controles sanos (Gimm y cols, 2001). Además, tras analizar la expresión diferencial de *GFRA1* a nivel de ARN mensajero y de proteína, estos autores encontraron una sobre-expresión en los tumores que portan el polimorfismo $-193C>G$. Estos datos podrían sugerir que $-193C>G$ actúa como un alelo de susceptibilidad de baja penetrancia para el desarrollo de MTC. Por otra parte, $c.537 T>C$ podría tener un efecto protector contra el desarrollo

de la enfermedad. Sin embargo, los mecanismos precisos de actuación de ambas variantes de secuencia siguen siendo un misterio.

Dado que los fenómenos de asociación de las variantes anteriormente mencionadas a MTC esporádico podrían quedar restringidos a la población alemana, uno de los objetivos del presente trabajo de tesis ha sido la evaluación de la implicación de dichos cambios de secuencia en la patogénesis de MTC, en la población española (Ruiz y cols, 2001; Borrego y cols, 2002).

A.3. Características clínicas y bases moleculares de la enfermedad de Hirschsprung.

A.3.1. Concepto y características clínicas de la enfermedad de Hirschsprung.

La enfermedad de Hirschsprung o megacolon agangliónico (HSCR, OMIM 142623), es una patología congénita caracterizada por la ausencia de los ganglios intramurales de Meissner y Auerbach en una porción variable del intestino grueso, dando como resultado una obstrucción intestinal funcional. 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. 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: 3-8%), o bien incluirse dentro de S-HSCR o L-HSCR (Chakravarti y Lyonnet, 2002).

En la mayoría de los casos el diagnóstico de HSCR se realiza en el período neonatal, debido a una obstrucción intestinal con los siguientes signos: (1) dificultad en expulsar el meconio durante las primeras 48 horas de vida, (2) distensión abdominal que se alivia con la estimulación rectal o la administración de enemas, (3) vómitos y (4) enterocolitis neonatal (Torfs, 1998). Algunos casos se diagnostican más tarde en la infancia o en la etapa adulta con estreñimiento severo, distensión abdominal crónica, vómitos y retraso de crecimiento (Parc y cols, 1984).

Las principales técnicas diagnósticas incluyen la visualización abdominal por rayos X, enema de bario, manometría ano-rectal y biopsia de la pared rectal. En cuanto al tratamiento, es quirúrgico tras un preoperatorio meticuloso. Básicamente el principio consiste en situar el intestino normal en el ano, y eliminar la contracción tónica del esfínter anal interno.

A.3.2. Epidemiología de la enfermedad de Hirschsprung.

Se estima que la incidencia de HSCR es de 1 de cada 5000 nacidos vivos (Bodian y Carter, 1963; Amiel y Lyonnet, 2001). Sin embargo esta incidencia varía significativamente entre los distintos grupos étnicos alcanzando valores de 1.5, 2.1 y 2.8 de cada 10000 nacidos vivos en caucasianos, afro-americanos y asiáticos respectivamente) (Torfs, 1998).

Usualmente 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 y expresión variables (Passarge, 1967). Existe una clara predominancia de varones afectados, siendo el ratio varones: mujeres = 4:1 (Badner y cols, 1990). Curiosamente este ratio varones: mujeres es significativamente más alto para S-HSCR que para L-HSCR (Badner y cols, 1990; Torfs, 1998).

Aproximadamente el 70% de los pacientes HSCR no tienen otras manifestaciones clínicas adicionales, mientras que en el 30% de casos restante este fenotipo se presenta como formas sindrómicas, asociado a otras malformaciones congénitas o a otro desorden genético adicional (Tabla A.3, Tabla A.4) (Amiel y Lyonnet, 2001). Concretamente HSCR aparece asociado a alguna anomalía cromosómica en un 12% de los casos, siendo la trisomía 21 la más frecuente (>90%). Por otra parte, el 18% de los pacientes HSCR aparecen con anomalías congénitas asociadas, tales como malformaciones gastrointestinales, fisura palatina, polidactilia, defectos en el septo cardíaco y anomalías cráneo-faciales (Spouge y Baird, 1985; Brooks y cols, 1998).

Tabla A.3. Síndromes asociados con HSCR (Amiel y Lyonnet, 2001).

Síndromes	MIM	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	209880	Hipoventilación central congénita
MEN 2A	171400	Carcinoma medular de tiroides, feocromocitoma, hiperparatiroidismo
Riley-Day	223900	Anomalías del sistema nervioso autónomo
<i>HSCR siempre asociado</i>		
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, HSCR, anomalías de ojo y oído, displasia renal
Diaplasia mesomélica tipo Werner		Mesomelia, polidactilia
<i>HSCR ocasionalmente asociado</i>		
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	Dwarfismo, displasia metafisaria, inmunodeficiencia
<i>HSCR rara vez asociado</i>		
Distrofia muscular congénita de Fukuyama	253800	Distrofia muscular, polimicrogiria, hidrocefalia, ataques
Clayton-Smith	258840	Rasgos dismórficos, dedos y uñas hipoplásticas, ictiosis
Kaplan	304100	Agénesis del cuerpo calloso, pulgares cortos, ptosis, debilidad muscular
Okamoto	308840	Hidrocefalia, fisura palatina, agénesis del cuerpo calloso
<i>Asociaciones misceláneas</i>		
Pallister-Hall (CAVE)	140510	
Fryns	229850	
Aarskog	100050	
Enfermedad de Jeune o distrofia torácica asfixiante	208500	
Displasia frontonasal	136760	
Osteopetrosis		
Goldenhar	164210	
Lesch-Nyhan	308000	
Rubinstein-Taybi	180849	
Toriello-Carey	217980	
SEMDJL	271640	

Tabla A.4. Anomalías cromosómicas asociadas a HSCR.

Cromosoma	Rasgos clave	Número de casos
+ 21	Síndrome de Down, S-HSCR, Varones: mujeres= 5.5-10.5	2-10% de casos HSCR
del 10q11	Retraso mental, L-HSCR	2 casos
del 13q22	Retraso mental y de crecimiento, rasgos dismórficos, S-HSCR	7 casos
del 2q22-q23	Retraso en el crecimiento postnatal y microcefalia, retraso mental, epilepsia, rasgos dismórficos, L-HSCR o S-HSCR	3 casos
del 17q21		4 casos
dup 17q21-q23	Síndrome MCA/MR (“ <i>Multiple Congenital Anomalies/Mental Retardation</i> ”)	4 casos
+ 22q11	Síndrome del ojo de gato	

A.3.3. Etiopatogenia de la enfermedad de Hirschsprung.

La hipótesis más aceptada acerca de la etiopatogénesis de HSCR se basa en un fallo en la migración de neuroblastos de la cresta neural (CN) que, en condiciones normales, deben alcanzar el intestino delgado en la séptima semana de gestación, y el recto en la duodécima semana (Okamoto y Ueda, 1967). Las distintas formas clínicas que presentan una extensión variable del segmento agangliónico, podrían considerarse como el resultado de interrupciones del proceso migratorio en distintos períodos gestacionales (Martucciello y cols, 2000).

La CN es una estructura muy peculiar. Tal como formuló Horstadius en 1950, “al originarse tan temprano, se considera uno de los primeros órganos en el desarrollo de los embriones de vertebrados. Sin embargo sólo tiene una existencia temporal, y sus células se dispersan por todo el cuerpo diferenciándose en varios tejidos”. Al finalizar su migración, las células de la CN se diferencian en varios tipos celulares, incluyendo neuronas de los ganglios sensoriales, simpáticos y parasimpáticos, células neuroendocrinas, médula adrenal, células pigmentadas, y cartílago facial (Bronner-Fraser, 1993). Las enfermedades que surgen por defectos en la CN son particularmente diversas en su presentación clínica, e incluyen síndromes endocrinológicos, cutáneos, neurológicos y digestivos entre otros. Entre esas neurocristopatías se encuentra la enfermedad de Hirschsprung, relacionada con fallos en el desarrollo embrionario del sistema nervioso entérico (SNE). Para contribuir al desarrollo del SNE, las células de la CN han de poder abandonar el tubo neural, migrar al intestino, entrar en él en un determinado momento, y comenzar su migración craneo-caudal a lo largo del intestino (Meijers y cols, 1992). Estos eventos se encuentran regulados por una compleja red de

mecanismos moleculares y celulares que aún no se conocen en profundidad. Se han identificado fundamentalmente dos vías metabólicas que desempeñan un papel crítico en la neurogénesis entérica de mamíferos: una de ellas es la ruta de señalización del receptor tirosín quinasa RET, y la otra es la ruta mediada por el receptor B de endotelinas (EDNRB). De hecho, y tal como se verá más adelante, los genes que hasta la fecha se han descrito como relacionados con la enfermedad de Hirschsprung están asociados de forma directa o indirecta con una de estas rutas de señalización.

A.3.4. Genética molecular de la enfermedad de Hirschsprung.

El análisis de segregación en familias de pacientes HSCR no sindrómicos, ha mostrado que el riesgo de recurrencia de la enfermedad en hermanos oscila entre un 1 y un 33%, dependiendo de la longitud del segmento agangliónico y del sexo del probando, así como del sexo de los hermanos (Badner y cols, 1990). Actualmente se asume que HSCR es una enfermedad multifactorial que resulta de la acción de varios genes en combinación con factores ambientales (Amiel y Lyonnet, 2001).

El análisis molecular de pacientes HSCR ha permitido identificar diferentes genes asociados a la aparición de este fenotipo. Hasta la fecha se han identificado 9 genes implicados en la aparición de HSCR en humanos, que son *RET*, *GDNF*, *NTN*, *EDNRB*, *EDN3*, *ECE*, *SOX10*, *PHOX2B* y *SIP1*.

A.3.4.1. Mutaciones asociadas a la enfermedad de Hirschsprung en genes que participan en la ruta de señalización de RET: *RET*, *GDNF* y *NTN*.

Hoy día se sabe que el proto-oncogén *RET* es el principal gen de susceptibilidad para HSCR. De hecho, 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 incompleta (Lyonnet y cols, 1993; Angrist y cols, 1993). Estos autores consideraron la región 10q11.2 como candidata al observar una delección intersticial en la misma, en pacientes con aganglionosis colónica total y retraso mental (Martucciello y cols, 1992). *RET*, identificado como el gen responsable de MEN 2 y localizado en 10q11.2, se consideró un buen gen candidato

debido a la concurrencia de MEN 2A y HSCR en algunas familias, y a que se expresa en células derivadas de la cresta neural. Finalmente y cumpliendo las expectativas, el rastreo molecular del gen permitió identificar mutaciones asociadas al fenotipo HSCR (Edery y cols, 1994; Romeo y cols, 1994). Hoy día se han identificado alrededor de 80 mutaciones en *RET* relacionadas con HSCR, que incluyen grandes deleciones, microdeleciones, inserciones y mutaciones con cambio de sentido (“*missense mutations*”), sin sentido (“*nonsense mutations*”) o que afectan a la maduración (“*splicing mutations*”) (Attie y cols, 1995; Angrist y cols, 1995; Seri y cols, 1997). A diferencia de MEN 2A, donde las mutaciones se encuentran localizadas en una zona caliente que abarca 6 codones cisteínicos, o de MEN 2B donde casi siempre aparece la mutación M918T, en el caso de HSCR las mutaciones de *RET* se encuentran distribuidas por todo el gen. Mientras que *in vitro* se ha visto que las mutaciones asociadas a MEN 2 conducen a una dimerización constitutiva del receptor, para HSCR el mecanismo más probable es la haploinsuficiencia (Pasini y cols, 1995b; Carlomagno y cols, 1996; Pelet y cols, 1998). Los resultados de estudios bioquímicos destinados a analizar los efectos de ciertas mutaciones en *RET* asociadas a HSCR, han mostrado que dichos efectos son variables, pudiendo afectar al plegado de la proteína, al transporte de ésta hasta la membrana celular, o incluso pudiendo abolir completamente su actividad biológica (Carlomagno y cols, 1996; Pelet y cols, 1998). En consecuencia este déficit afectaría a las rutas metabólicas en las que participa RET (Sección A.1.4), generándose un defecto en la migración y proliferación de precursores de la cresta neural al sistema nervioso entérico en desarrollo.

Aunque *RET* es el principal locus para HSCR, sólo se han identificado mutaciones asociadas a la enfermedad en un 50% de los casos familiares (Attie y cols, 1995a). Sin embargo la mayoría de las familias, con algunas excepciones, son compatibles con el ligamiento al locus *RET* (Bolk y cols, 2000; Carrasquillo y cols, 2002).

En cuanto a las formas esporádicas, los primeros estudios identificaron mutaciones en *RET* en un 10-35% de los casos dependiendo de las series (Attie y cols, 1995a; Angrist y cols, 1995). Sin embargo, el primer estudio prospectivo basado en una población homogénea, ha demostrado que las mutaciones germinales de *RET* tan sólo explicarían un 3% de los casos esporádicos (Svensson y cols, 1998). Estas diferencias

entre las series se explicarían en base a que en los primeros estudios efectuados en *RET* se emplearon cohortes de pacientes muy seleccionados y con fenotipos muy agresivos (edad de comienzo muy precoz y amplia extensión de aganglionosis).

El papel de *RET* en la enfermedad de Hirschsprung convirtió a los genes que codifican para las proteínas de su complejo de activación (*GDNF*, *NTN*, *ART*, *PSP*, *GFRA1-4*) en potenciales candidatos para el desarrollo de HSCR.

GDNF es el principal factor de supervivencia para muchos tipos de neuronas. Los ratones “*Gdnf-knockout*” presentan un fenotipo muy similar a los ratones “*Ret-knockout*” (Schuchardt y cols, 1994; Moore y cols, 1996; Sanchez y cols, 1996; Pichel y cols, 1996), consistente en megacolon de segmento largo y agenesia renal. Esto, junto con el hecho de que *GDNF* participa en varios procesos metabólicos necesarios para el desarrollo y mantenimiento de neuronas centrales y periféricas, hacen de este gen un magnífico candidato para HSCR. Sin embargo se han encontrado mutaciones en *GDNF* en muy pocos pacientes HSCR. Además, dichas mutaciones podrían no ser suficientes para originar HSCR, dado que algunos pacientes presentaban factores adicionales como mutaciones en *RET* o trisomía 21 (Salomon y cols, 1996; Angrist y cols, 1996; Ivanchuk y cols, 1996; Martucciello y cols, 2000). También se ha detectado una mutación en *GDNF* en un paciente con enfermedad de Ondine (Amiel y cols, 1998).

Por otra parte, el silenciamiento de genes que codifican la neurturina o su co-receptor *gfr α 2* en ratones (ratones *Ntn-knockout* o *Gfra2-knockout*), produce un descenso en la densidad de neuronas colinérgicas del SNE aunque no se generan anomalías renales (Heuckeroth y cols, 1999; Rossi y cols, 1999). Pues bien, se ha identificado una mutación asociada a HSCR en *NTN*, pero no se tiene certeza de su grado de implicación en la patología, puesto que ésta aparecía en conjunción con otra mutación en *RET* (Doray y cols, 1998).

Finalmente, aunque los ratones “*Gfra1-knockout*” son fenotípicamente similares a los ratones “*Ret-knockout*” y “*Gdnf-knockout*” (Enomoto y cols, 1998), aún no se han identificado mutaciones en *GFRA1* en pacientes HSCR (Angrist y cols, 1998; Myers y cols, 1999). Tampoco se han encontrado mutaciones en los genes *GFRA2* ni *GFRA3* (Vanhorne y cols, 2001; Onochie y cols, 2000). No obstante, estos hallazgos no permiten descartar de forma definitiva la implicación de estos genes en la enfermedad de Hirschsprung.

A.3.4.2. Mutaciones asociadas a la enfermedad de Hirschsprung en los genes de la ruta de señalización de la endotelina: *EDNRB*, *EDN3* y *ECE1*.

La ruta de las endotelinas fue estudiada inicialmente por su efecto vasoconstrictor y su posible papel en hipertensión. *EDNRB* y *EDNRA* (“*Endothelin receptor type B/A*”) son proteínas heptahelicales acopladas a proteína G, que transducen señales a través de las endotelinas (*EDN1*, *EDN2*, *EDN3*) (Inoue y cols, 1989; Sakurai y cols, 1992). Hoy día se sabe que la ruta de señalización inducida por las endotelinas es necesaria para el desarrollo de las células derivadas de la cresta neural destinadas a inervar el colon (Chakravarti, 1996; Martucciello y cols, 2000).

Una serie de hechos hicieron pensar que 13q22, región donde se localiza el gen *EDNRB*, podía albergar un locus de susceptibilidad para HSCR: (1) Se observó un *lod score* significativo en 13q22 al realizar un estudio de ligamiento sobre una comunidad menonita, altamente endogámica, con numerosos casos HSCR (Cohen y Gadd, 1982; Puffenberger y cols, 1994a). (2) Se detectaron deleciones intersticiales *de novo* en 13q22 en varios pacientes con HSCR (Kiss y Osztovcics, 1989; Lamont y cols, 1989; Bottani y cols, 1991). (3) En ratones el piebaldismo letal, un modelo de aganglionosis, es fenotípicamente idéntico al del ratón *Ednrb-knockout*, y en humanos el gen *EDNRB* está localizado en 13q22 (Hosoda y cols, 1994). El piebaldismo letal se considera como el modelo murino para el síndrome de Shah-Waardemburg (WS4) en humanos, y algunos de los individuos menonitas presentaban anomalías en la pigmentación y sordera además de HSCR. Este hecho incitó a que se realizara un rastreo de *EDNRB* en familias WS4, y se encontraron mutaciones en homocigosis en una fracción de las mismas (Attie y cols, 1995b). Recientemente se ha detectado también una mutación en homocigosis en *EDNRB* en un paciente con hipoventilación central congénita o enfermedad de Ondine (Verheij y cols, 2002).

Por otra parte se identificó una mutación en el gen *EDN3* en un ratón con *spotting* letal, otro modelo murino para WS4 en humanos, lo que condujo al rastreo e identificación de mutaciones de *EDN3* en pacientes WS4 (Hofstra y cols, 1996; Ederly y cols, 1996; Pingault y cols, 2001) o con enfermedad de Ondine (Bolk y cols, 1996).

El rastreo mutacional de *EDNRB* y *EDN3* en series de pacientes con HSCR esporádico, ha mostrado que mientras que las mutaciones en *EDN3* son muy poco frecuentes (Bidaud y cols, 1997), en el caso de *EDNRB* se han encontrado mutaciones en aproximadamente un 5% de los pacientes (Chakravarti, 1996; Amiel y cols, 1996; Kusafuka y cols, 1996; Auricchio y cols, 1996). Cabe mencionar que en esos pacientes estudiados, 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. La observación de deleciones intersticiales en 13q22 abarcando *EDNRB* en algunos pacientes HSCR, sugirió que el efecto de acción de estas mutaciones podría ser haploinsuficiencia. Posteriores análisis funcionales para determinar la relevancia patogénica de diferentes mutaciones en *EDNRB*, han revelado que éstas generan una pérdida de función del receptor (Abe y cols, 2000).

Las endotelinas maduras, EDN1, EDN2 y EDN3, son el resultado de la acción proteolítica de las metaloproteasas ECE1 y ECE2 (*Endothelin-Converting Enzyme 1 y 2*) sobre las respectivas preproendotelinas. Se ha observado que el ratón *Ece1-knockout* presenta defectos cráneo-faciales y anomalías cardíacas además de aganglionosis colónica (Yanagisawa y cols, 1998). Estos datos hicieron de *ECE1* un gen candidato para HSCR. De hecho, se ha podido identificar una mutación en heterocigosis en un paciente HSCR con defectos cráneo-faciales y cardíacos (Hofstra y cols, 1999).

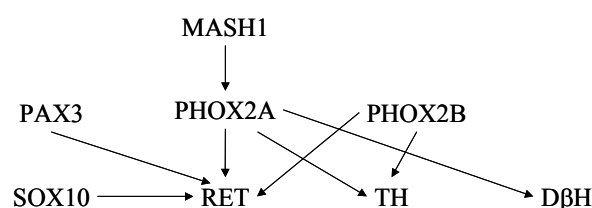
Todos estos hallazgos de mutaciones asociadas a HSCR en genes relacionados con la ruta de las endotelinas (*EDNRB*, *EDN3*, *ECE1*), ponen de manifiesto la relevancia de esta vía de señalización en el desarrollo del sistema nervioso entérico. Asimismo no se descarta la posibilidad de la implicación de otros miembros de esta cascada metabólica en la patogénesis de la enfermedad.

A.3.4.3. Asociación de genes codificantes de factores de transcripción o de regulación con HSCR: *SOX10*, *PHOX2B* y *SIP1*.

La expresión del proto-oncogén *RET* se encuentra regulada por una amplia gama de factores de transcripción que actúan sobre el gen de forma directa o indirecta. Entre esos factores de transcripción se encuentran MASH1, PHOX2A, PHOX2B, PAX3, SOX10 y HOX11L1, que evidentemente desempeñan un papel fundamental en el

desarrollo del SNE, si bien sus funciones precisas aún no se conocen en profundidad (Newgreen y Young, 2002; Figura A.6). El hecho de que estos factores de transcripción regulen la expresión de *RET* convierte a los genes que los codifican en posibles candidatos para HSCR. De hecho ya se ha podido establecer la relación entre algunos de estos genes como *SOX10* y *PHOX2B*, y algunas formas sindrómicas de la enfermedad.

Figura A.7. Factores de transcripción implicados en el desarrollo del SNE.



Por ejemplo, otro de los modelos murinos para el síndrome WS4 es el megacolon dominante (*Dom*), siendo *Sox10* (“*Sex determining region Y box 10*”) el gen causante de este fenotipo. Este gen codifica para un factor de transcripción que presenta un motivo de unión a ADN conocido como dominio HMG (“*High Mobility Group*”). Se han identificado mutaciones en heterocigosis en *SOX10* en formas familiares y esporádicas de WS4 (Pingault y cols, 1998; Southard-Smith y cols, 1999; Touraine y cols, 2000). También se han encontrado mutaciones en niños con WS4 combinado con otras neuropatías (Inoue y cols, 1999, 2002). Algunas de estas mutaciones afectan al dominio de unión a ADN, y podrían conducir a una pérdida de función, por lo que de nuevo el mecanismo propuesto más aceptable para producir el fenotipo es la haploinsuficiencia. En cambio otras mutaciones perturban el dominio de transactivación y podrían conducir a un efecto dominante negativo (Touraine y cols, 2000). Hasta el momento, sin embargo, no se han encontrado mutaciones en *SOX10* asociadas a formas no sindrómicas de HSCR.

Por otra parte, se había observado que los ratones *Phox2b-knockout* carecen de sistema nervioso autónomo. En estos ratones las células de la cresta neural llegan a la parte anterior del intestino, pero no alcanzan a migrar más allá probablemente como consecuencia de la falta de expresión de *Ret* (Pattyn y cols, 1999). *PHOX2B* (“*Paired-like Homeo bOX 2B*”) codifica para otro factor de transcripción que se expresa en el

sistema nervioso autónomo central y periférico durante el desarrollo embrionario, y que funciona regulando la expresión de *RET*. Pues bien, el rastreo mutacional de este gen en una serie de pacientes con enfermedad de Ondine ha permitido identificar mutaciones que alteran la pauta de lectura, así como expansiones de polialaninas (Amiel y cols, 2003; Sasaki y cols, 2003). Además, Benailly y cols 2003 encontraron una paciente con S-HSCR, retraso en el desarrollo, rasgos dismórficos e hipotonía severa, que presentaba una deleción de 5Mb en 4p12p13, abarcando la región donde se localiza este gen, lo que sugiere que la haploinsuficiencia de *PHOX2B* podría predisponer a HSCR. Sin embargo, el análisis de la secuencia del gen en una amplia cohorte de casos HSCR no sindrómicos no ha desvelado 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 y cols, 2003a).

Por último, en algunos pacientes HSCR que presentan microcefalia, fisura palatina y estatura pequeña (OMIM 235730) se han encontrado mutaciones en el gen *SIP1* (“*Smad Interacting Protein-1*”), también conocido como *ZFH1B* (“*Zinc Finger Homeo box 1B*”) (Cacheux y cols, 2001; Wakamatsu y cols, 2001). Con posterioridad también se han identificado grandes deleciones y otras mutaciones de este gen en varios pacientes HSCR con retraso mental y ciertas malformaciones como hipospadia y agenesia del cuerpo calloso (Amiel y cols, 2001). Se piensa que estos fenotipos son el resultado de la haploinsuficiencia de *SIP1* generada por mutaciones en uno de los alelos. Este gen se consideró un candidato para generar el fenotipo, dado que uno de los pacientes analizados en los primeros estudios presentaba una translocación *de novo* t(2;13)(q22;q22), y *SIP1* se localiza en 2q22. Además, *SIP1* parece realizar una función importante en el desarrollo de la cresta neural, hecho que queda manifiesto en los estudios de los ratones *knockout* para este gen (Van de Putte et al, 2003). Los estudios realizados en ratones han demostrado que *Sip1* es un miembro de la familia δ EF1/*Zfh-1*, que interacciona con proteínas Smad (Verschueren y cols, 1999). Estas proteínas Smad desempeñan un papel fundamental en la cascada de transducción de la familia de los factores de crecimiento TGF- β (“*Transforming Growth Factor beta*”) (Massague, 1998), que está involucrada en el desarrollo y homeostasis de varios tipos celulares. La activación de la ruta TGF- β origina la fosforilación y translocación nuclear de las proteínas Smad, las cuales participan en la regulación de la expresión de genes diana.

Los experimentos realizados en varios sistemas sugieren que Sip1 es un represor que puede actuar impidiendo la activación transcripcional llevada a cabo por Smad, por lo que su función reguladora es importante.

Siguen existiendo aún varios genes que codifican para factores de transcripción implicados en el desarrollo del SNE, cuya candidatura para generar HSCR aún no ha sido evaluada. Dichos genes resultan por tanto un interesante objeto de estudio cuyo análisis podría contribuir a profundizar en el conocimiento de la patogénesis de esta enfermedad poligénica.

A.3.4.4 Identificación de regiones cromosómicas asociadas a HSCR mediante análisis de ligamiento

Como ya se ha mencionado, HSCR es una enfermedad compleja y multifactorial. En la inmensa mayoría de los casos, mutaciones en los genes anteriormente descritos conducen a la aparición de formas sindrómicas de HSCR, o bien de formas aisladas de L-HSCR. Sin embargo estas mutaciones apenas se han identificado en las familias S-HSCR, que son mucho más frecuentes. Con el objetivo de identificar loci de susceptibilidad asociados a la aparición de esas formas S-HSCR, se han realizado estudios de ligamiento en diversas familias HSCR, utilizando una amplia variedad de marcadores microsatélite distribuidos por todo el genoma.

En un primer estudio, Bolk y cols 1999 analizaron un total de 12 familias, e identificaron un nuevo locus de susceptibilidad en la región cromosómica 9q31 que en conjunción con *RET* conduce a la aparición del fenotipo HSCR.

Posteriormente, un análisis realizado sobre 49 familias demostró la existencia de tres loci situados en 3p21, 10q11 y 19q12 tanto necesarios como suficientes para explicar la incidencia y el riesgo de recurrencia de HSCR en la cohorte estudiada (Gabriel y cols, 2002). Estos autores concluyen que el gen de susceptibilidad que reside en 10q11 es *RET*, llegando a encontrar mutaciones en este gen en 17 familias. Para el resto de las familias ligadas a 10q11, postulan que pueden existir mutaciones en la región no codificante de *RET*, si bien tampoco se puede excluir totalmente la existencia de mutaciones en otros genes situados en la región. Así pues, *RET* sería el principal causante de la aparición del fenotipo, y 3p21 y 19q12 constituirían loci modificadores.

En otro estudio similar llevado a cabo por Carrasquillo y cols en 2002, se identificaron loci de susceptibilidad para HSCR en las regiones 10q11, 13q22 y 16q23. 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 *EDNRB* correspondía con el localizado en 13q22 (previamente identificado como el principal locus HSCR en esta población, Puffenberger y cols, 1994a). 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.

Todos estos datos ponen de manifiesto nuevamente el patrón de herencia no mendeliano de HSCR, y sustentan la idea del carácter poligénico de la enfermedad.

A.3.5. Co-segregación de la enfermedad de Hirschsprung con los síndromes MEN 2.

La co-segregación de MEN 2 y HSCR es bastante infrecuente. Hasta la fecha sólo se han reportado 20 familias afectadas con ambos fenotipos (Verdy y cols, 1982; Chretien y cols, 1994; Mulligan y cols, 1994; Borst y cols, 1995; Blank y cols, 1996; Caron y cols, 1996; Peretz y cols, 1997; Borrego y cols, 1998; Decker y cols, 1998; Romeo y cols, 1998; Sijmons y cols, 1998; Pasini y cols, 2002) y todas ellas se han asociado con mutaciones en los codones 609, 618 y 620 de *RET*. Se ha sugerido que la coexistencia de ambos fenotipos debido a la misma mutación, podría explicarse por un efecto dual. En este sentido los resultados de estudios funcionales parecen demostrar que mutaciones en los codones 609, 618 y 620, disminuyen la expresión del receptor en la superficie celular pero también son capaces de inducir la formación aberrante de homodímeros de RET, conduciendo a la activación constitutiva de las proteínas mutantes (Iwashita y cols, 1996b; Ito y cols, 1997; Chappuis-Flament y cols, 1998; Takahashi y cols, 1999). Por tanto, las mutaciones activadoras darían lugar a MEN 2 mientras que la disminución de la expresión de RET en la superficie celular generaría HSCR. El mecanismo propuesto es el siguiente sugiere que las cisteínas mutadas

podrían alterar el plegado de RET, interfiriendo parcialmente con su maduración, su transporte intracelular o su expresión estable en la membrana plasmática. Aunque los niveles de dimerización de RET fuesen bajos, la actividad de las proteínas mutantes sería suficiente para desencadenar el desarrollo de carcinoma medular de tiroides así como de feocromocitoma. Y por otra parte, la disminución de la expresión de RET en la superficie celular de los neuroblastos entéricos durante la embriogénesis, transmitiría una señalización por debajo del umbral necesario para completar su diferenciación, o para prevenir una apoptosis inapropiada. Así pues, en principio podría ser factible que una sola mutación en el codón 609, 618 o 620 funcionase a la vez como “mutación con ganancia de función”, y “como mutación con pérdida de función”, dependiendo de los tipos celulares en los que se exprese (Takahashi, 2001).

A.3.6. Factores de susceptibilidad genéticos para las formas esporádicas de HSCR.

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 MEN 2A/HSCR (Borrego y cols, 1998). En ese trabajo describíamos un pedigrí en el que postulábamos que ambos fenotipos estaban asociados a la mutación puntual C620S de *RET*. Un intenso análisis genético, mediante secuenciación directa de los genes *RET* y *GDNF* en los pacientes de esta familia, descartó la posibilidad de que el cuadro de HSCR que se observa en el único miembro que presentaba ambos fenotipos se debiera a una segunda mutación en estos genes. Sin embargo, el análisis molecular resultante demostró 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 mediante la activación de un sitio crítico de maduración (*Para más detalles sobre este pedigrí, puede consultarse Figura C.1 y sección C.1.3 de Metodología*).

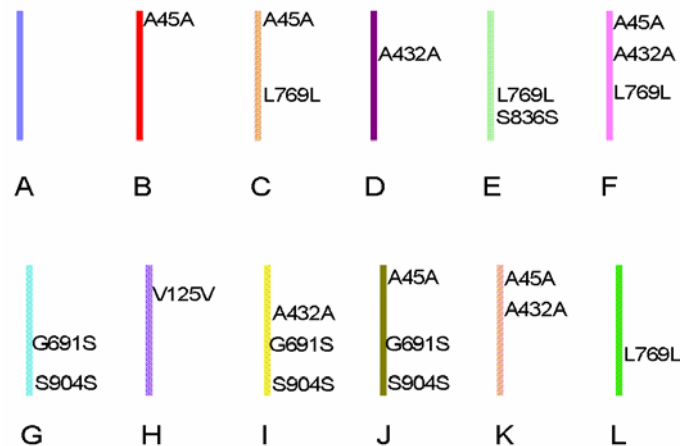
Si era cierta esa observación, la relación entre el polimorfismo A45A y el fenotipo HSCR debía contrastarse en una cohorte HSCR esporádica. Para evaluar este supuesto, nuestro grupo efectuó un estudio de casos/controles genotipando 7 cSNPs del

proto-oncogén *RET* (A45A, V125V, A432A, G691S, L769L, S836S y S904S) en 64 pacientes HSCR esporádicos y 100 controles no relacionados y sin antecedentes de enfermedades gastrointestinales relevantes (Borrego y cols, 1999). Este estudio demostró que existen dos polimorfismos silentes de *RET* (A45A y L769L) que están estrechamente asociados a la aparición del fenotipo HSCR. Específicamente, la variante A45A aparecía en 75/128 cromosomas HSCR (59%) y en 32/200 cromosomas control (16%) ($\chi^2= 62.50$, $p << 0.0001$). Por su parte, el polimorfismo L769L (c.2307T>G) se identificó en 39/128 cromosomas HSCR (30%) y en 28/200 cromosomas control (14%) ($\chi^2= 12.03$, $p= 0.0005$). Este estudio también demostró que los polimorfismos G691S (c.2071C>A) y S904S (c.2712C>G), probablemente en desequilibrio de ligamiento, aparecen subrepresentados en la cohorte HSCR respecto de la población control.

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, nuestro grupo trazó los haplotipos de *RET* constituidos por la combinación de los 7cSNPs anteriormente analizados. Este trabajo permitió identificar doce haplotipos diferentes (A-L, Figura A.8), mediante al análisis de segregación de las variantes en 57 triadas constituidas por el caso índice y sus padres. Por otra parte, los haplotipos se pudieron inferir de manera fidedigna en 65 de los 100 controles genotipados. La distribución haplotípica, demostró una desviación muy significativa al comparar casos con controles ($\chi^2= 81.4$, con 11 grados de libertad, $p << 0,0001$, Figura A.9). Todos los haplotipos que incluyen el polimorfismo A45A, estaban desviados y sobre-representados al comparar HSCR y controles. Además, la distribución de los genotipos (parejas de haplotipos) entre pacientes y controles también mostró una notoria diferencia ($\chi^2= 93.8$, con 37 grados de libertad, $p << 0,0001$). Es interesante resaltar que se identificaron genotipos exclusivos tanto en la cohorte HSCR (BB, BH, CD y BD), como en el grupo control (AA, DD, GG, GJ, AG) (Borrego y cols, 2000). El análisis de los resultados mediante test de desequilibrio de transmisión ("*Transmisión disequilibrium test*") reveló que los haplotipos B, C, F y H son los más frecuentemente transmitidos de padres a hijos afectos, mientras que los menos frecuentes son A, D y G. Consiguientemente el análisis de mapeo genético empleando desequilibrio de ligamiento, parecía indicar la existencia de al menos dos loci de susceptibilidad para HSCR independientes en nuestra población. Uno de ellos estaría en desequilibrio de

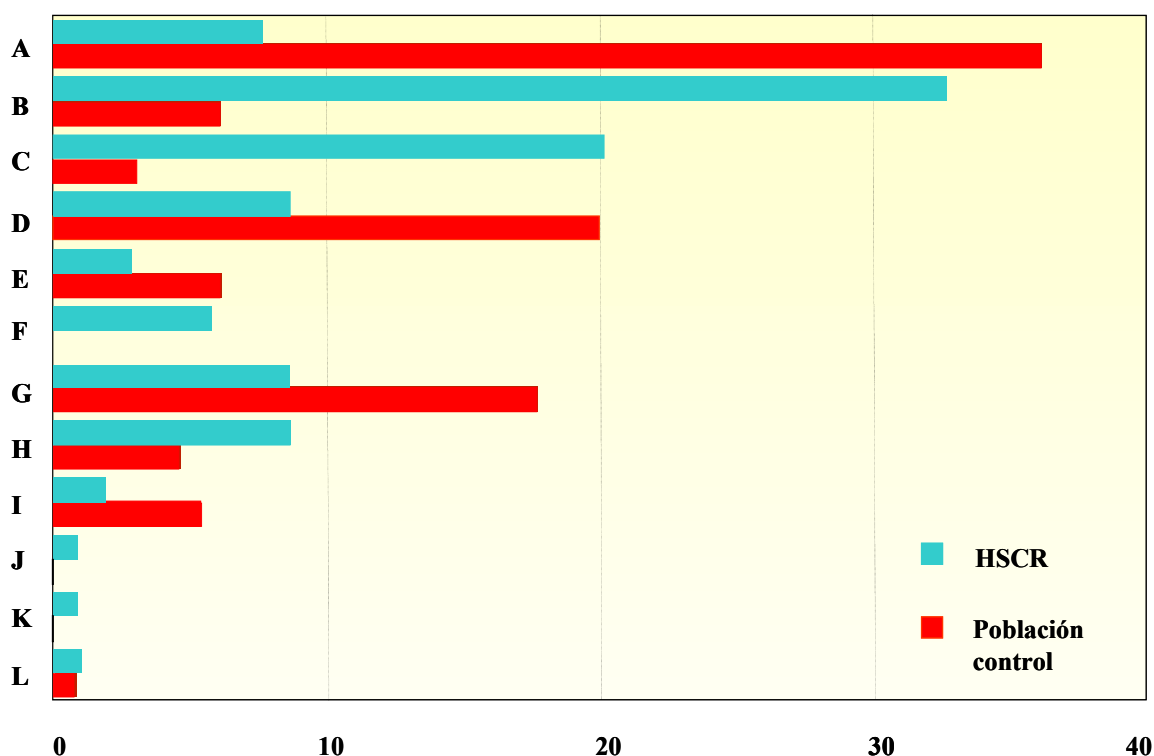
ligamiento con los haplotipos B, C y F, y el otro locus estaría asociado específicamente con el haplotipo H.

Figura A.8. Haplotipos de *RET* generados por la combinación de las siete variantes situadas en su secuencia codificante.



Los trabajos llevados a cabo por nuestro grupo supusieron la identificación de los primeros factores de susceptibilidad genéticos asociados a la enfermedad de Hirschsprung (véase OMIM 142623). Además, la relevancia de los datos aportados por nuestro grupo fue confirmada en una cohorte de 62 casos HSCR de origen alemán y un grupo de 156 controles, empleando una metodología similar (Fitze y cols, 1999). Estudios mutacionales realizados con posterioridad en esa cohorte alemana han demostrado que en pacientes HSCR con mutación en *RET*, A45A parece modificar el fenotipo mediante una interacción intragénica de esta variante con la mutación (Fitze y cols, 2002, 2003).

Figura A.9. Distribución de los haplotipos *RET* encontrados en los casos HSCR esporádicos y en los individuos control.



Los resultados obtenidos en la población española también se confirmaron en un estudio muy reciente llevado a cabo en la población china, siendo estos hallazgos particularmente interesantes al tratarse de una población genéticamente tan diferente a la nuestra (García-Barceló y cols, 2003b). En este trabajo se volvió a detectar una sobre-representación de los polimorfismos A45A y L769L en HSCR *versus* controles. Así, el análisis haplotípico reveló la clara asociación del haplotipo que porta las dos variantes (lo que nosotros denominamos haplotipo C, Borrego y cols, 2000) a la aparición de la enfermedad. La diferencia con nuestros resultados radica en que la variante A432A se encuentra significativamente sub-representada en pacientes frente a controles, hecho que no ocurre en nuestra población.

Por otra parte, en un estudio similar llevado a cabo en la población italiana, se detectó la sub-representación del polimorfismo S836S en la cohorte de 92 pacientes HSCR al comparar con un grupo control (Griseri y cols, 2000), lo que sugeriría un efecto protector de la variante frente a la aparición de HSCR. Estos autores llevaron a

cabo estudios funcionales con los que se descartó el efecto directo del polimorfismo en las interacciones ADN-proteína, en la estabilidad de los transcritos o en la maduración del ARN. En cualquier caso, este fenómeno de asociación parece quedar restringido a la población italiana, puesto que dicha sub-representación no se detectó de forma estadísticamente significativa en las poblaciones española, alemana o china (Borrego y cols, 1999; Fitze y cols, 1999; García-Barceló y cols, 2003b). Además, en un estudio realizado por los mismos autores con posterioridad en 156 casos y 40 controles de origen danés, tampoco se encontró una diferencia significativa en la distribución de la variante (Griseri y cols 2002), si bien el análisis de alelos transmitidos y no transmitidos de los padres a sus hijos afectados, demostró que el alelo polimórfico sólo era heredado por un paciente HSCR en una de las 20 familias que presentaban algún progenitor heterocigoto, existiendo consiguientemente una fuerte desviación de transmisión (*Transmission disequilibrium test*, TDT: $p=0.00057$).

Para concluir, todos los resultados publicados por nuestro grupo sugerían la existencia de un locus ancestral asociado a los haplotipos que contienen A45A, ubicado en 5' respecto a esta variante en un intervalo de 0-20Kb, región que se corresponde con el intrón 1 de *RET*. Uno de los objetivos prioritarios de la presente tesis doctoral ha sido la identificación molecular de ese locus de susceptibilidad para Hirschsprung ligado a la variante A45A de *RET*.

B. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS
DEL ESTUDIO

B.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Diversos estudios funcionales han puesto de manifiesto que el proto-oncogén *RET* se asocia, por mecanismos contrarios, tanto a la aparición de enfermedad de Hirschsprung (HSCR) como de cáncer medular de tiroides (MTC). Así, hoy día se sabe que mutaciones germinales de *RET* que conducen a una ganancia de función del receptor originan formas familiares de MTC (síndromes MEN 2), mientras que otras mutaciones que producen una pérdida de función son causantes de HSCR.

Nuestro grupo tiene evidencias muy significativas de la asociación de la variante A45A, localizada en el exón 2 de *RET*, con el fenotipo HSCR (Borrego y cols, 1999, 2000). Todos los resultados publicados previamente por nuestro grupo sugieren la existencia de un locus ancestral asociado a los haplotipos que contienen A45A, ubicado en 5' respecto a esta variante y en un intervalo de 0-20Kb (región que se corresponde con el intrón 1 de *RET*). El principal objetivo del presente proyecto de tesis es la identificación y caracterización molecular de ese locus de susceptibilidad para HSCR. En concreto, dicho locus podría estar asociado a un dominio implicado en la regulación de la expresión de *RET*. La consecución de estos objetivos contribuiría así al esclarecimiento de la base genética de esta enfermedad. Asimismo, dada la naturaleza poligénica de HSCR, hemos pretendido desarrollar una evaluación sistemática de otros genes candidatos, con el fin de identificar factores de susceptibilidad asociados a su aparición.

Por otra parte, el conocimiento sobre la etiología del cáncer medular de tiroides esporádico es bastante escaso. No obstante, puesto que mutaciones activadoras de *RET* son responsables de las formas familiares de MTC, y que la mutación somática M918T se ha encontrado en una proporción importante de tumores esporádicos, este gen pasa a ser el principal candidato como gen de susceptibilidad para las formas MTC esporádicas. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que en el punto de partida del presente trabajo, el único factor de susceptibilidad descrito para MTC esporádico en una serie de casos alemana era el polimorfismo S836S, localizado en el exón 14 de *RET*. Por consiguiente, nos planteamos la posibilidad de que cambios de secuencia de los genes que participan en la cascada metabólica de *RET*, tales como el propio receptor, sus ligandos o co-receptores, puedan jugar un papel en la patogénesis de MTC. Partiendo de

esta idea, hemos iniciado una búsqueda de factores de susceptibilidad genéticos para esta patología en esos genes candidatos.

B.2 OBJETIVOS PLANTEADOS

1. Identificación y caracterización molecular de un nuevo locus HSCR, ligado a los haplotipos que contienen el polimorfismo A45A del gen *RET*.
2. Análisis de mutaciones y polimorfismos en otros genes candidatos para HSCR (*GFRA1*, *GFRA2*, *GFRA3*, *GFRA4*). Evaluación de su implicación en la aparición de la enfermedad.
3. Búsqueda de factores de susceptibilidad genéticos para el MTC esporádico en genes candidatos para dicha patología.

C. PACIENTES Y MÉTODOS

C.1 PACIENTES Y CONTROLES

De acuerdo con la normativa de protección de los sujetos humanos, se ha obtenido el consentimiento informado de todos los individuos que han participado en nuestros estudios.

C.1.1 Pacientes HSCR

Los pacientes HSCR incluidos en el presente estudio han sido remitidos a la Unidad Clínica de Genética y Reproducción procedentes del departamento de Cirugía Pediátrica de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, centro de referencia regional para esta patología. El protocolo de estudio clínico de los pacientes HSCR incluye:

- Estudio radiológico mediante enema opaco
- Manometría anorrectal
- 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 conseguido obtener muestra de ADN genómico de un total de 153 pacientes HSCR recibidos en nuestras consultas de genética clínica. De estos pacientes, 124 son esporádicos y los 29 restantes son casos familiares incluidos en 19 familias (15 con herencia autosómica recesiva y 4 con herencia autosómica dominante). La tasa de casos familiares registrados en nuestra cohorte hasta el presente momento es de un 13% (19/143 HSCR) y disponemos de ADN germinal de 75 familiares en primer grado (padres y hermanos) de dichas familias. Asimismo hemos logrado completar la triada (paciente, padre y madre), necesaria para efectuar los estudios de desequilibrio de ligamiento, en 108 de los 124 pacientes esporádicos, mientras que para otros 12 casos sólo se dispone de uno de los padres, y sólo en los 4 casos restantes no hemos podido acceder a ninguno de ellos.

C.1.2 Pacientes MTC

Los casos de MTC que han participado en el presente trabajo han sido remitidos a nuestra Unidad procedentes de los Servicios de Endocrinología de nuestro hospital y otros hospitales de la provincia, así como de hospitales de Almería, Badajoz, Cádiz, Córdoba, Granada, Huelva, Jaén, Jerez de la Frontera, Málaga y Madrid. El protocolo de estudio clínico para estos pacientes incluye:

- Test de estimulación con pentagastrina
- Determinación de catecolaminas urinarias por HPLC
- Determinación de PTH mediante RIA.
- Estudio anatomopatológico de las piezas con MTC
- Estudios de genética clínica mediante realización del árbol genealógico, valoración de la transmisión familiar, clasificación de los sujetos en riesgo, análisis de la heterogeneidad intra y extrafamiliar, y extracción protocolizada de muestras de sangre del paciente índice y de sus familiares para el estudio molecular.

Hasta el término del presente trabajo hemos obtenido ADN germinal de 180 pacientes MTC, contando tanto formas familiares como esporádicas de la enfermedad. El 26% de los casos registrados corresponden a formas familiares de MEN 2 (15 familias MEN 2A con 67 pacientes; 4 familias MEN 2B con 4 pacientes y 9 familias FMTC con 31 pacientes). Tenemos 78 pacientes con MTC esporádico, lo que corresponde a un 74% de los casos. El MTC esporádico se caracteriza por la no existencia de historia familiar o personal indicativa de un cuadro MEN 2, y por la ausencia de mutaciones germinales en *RET* causantes de cualquier subtipo MEN 2.

Gracias a un trabajo de colaboración con el grupo de Neoplasias Endocrinas Familiares del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas dirigido por la Dra Mercedes Robledo, hemos podido acceder a muestras de ADN germinal de otros 106 pacientes esporádicos de MTC, que han sido incluidos en algunos de nuestros estudios.

C.1.3 Individuos control

Para la evaluación de polimorfismos genéticos como factores de susceptibilidad para una determinada patología, es preciso comparar la frecuencia y distribución de dichas variantes en el grupo de casos con las de un grupo control. Este grupo está constituido por 250 individuos sanos no relacionados, agrupados según edad y sexo, y sin ningún antecedente personal o familiar relacionado con las patologías en estudio.

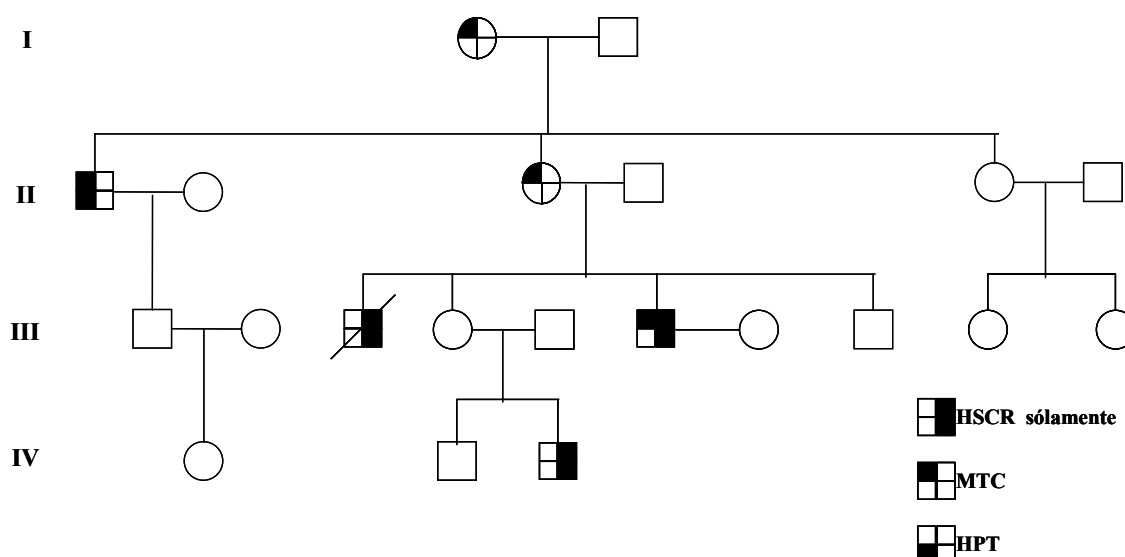
C.1.4 Familia MEN 2A/HSCR

La cosegregación del síndrome de neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (MEN 2) con la enfermedad de Hirschsprung es un fenómeno poco frecuente, conociéndose en el mundo solamente 20 familias con estas características. Una de estas familias asistió a nuestras consultas de Genética en 1997, y su pedigrí se muestra en la Figura C.1. El paciente III.6, en el que cosegregan MEN2A y HSCR, fue intervenido quirúrgicamente de HSCR a la edad de 4 años, y con 24 años le apareció un nódulo tiroideo. La historia familiar reveló que su madre (paciente II.3) fue sometida a tiroidectomía total a la edad de 46 años, y diagnosticada inicialmente como afecta de cáncer papilar de tiroides. Dado que se sospechaba un error en el diagnóstico, se realizó un estudio de los niveles de calcitonina tras estimulación con pentagastrina en el paciente III.6. El nivel de calcitonina fue de 1285ng/L, transcurridos 5 minutos después de la administración de pentagastrina. Los niveles de catecolaminas y metanefrina en la orina total de un día, así como los valores de calcio total y de hormona paratiroidea en suero fueron normales. En este paciente también se realizó una tiroidectomía total, y tras el examen histológico del material de resección, se verificó la existencia de MTC bilateral. Seis meses después de la intervención, los niveles de calcitonina tras estimulación con pentagastrina permanecían elevados. La realización de una tomografía en el cuello reveló una masa paratraqueal en el lado derecho de 2 cm. Estos resultados llevaron a revisar la muestra de la tiroidectomía de la madre (II.3), siendo los datos concordantes con un diagnóstico de MTC. En ese momento los niveles de calcitonina tras estimulación con pentagastrina de este individuo (II.3) eran elevados, pero se descartó la presencia de feocromocitoma o hiperparatiroidismo. El hermano del probando, paciente III.3, murió por complicaciones de HSCR a la edad de 8 años. El examen clínico y los estudios

hormonales y bioquímicos de los otros hermanos del probando (pacientes III.1 y III.4) fueron normales. El tío materno del índice (II.1) presentaba MTC e hiperparatiroidismo, mientras que la abuela (I.1) también desarrolló MTC a la edad de 78 años.

Recientemente ha aparecido un nuevo miembro familiar con fenotipo HSCR, sobrino del paciente MEN 2A/HSCR (paciente IV.3). A este individuo se le diagnosticó HSCR a los 4 meses de edad, momento en el que fue intervenido quirúrgicamente, encontrándose que presentaba segmento agangliónico corto.

Figura C.1. Pedigrí de la familia MEN2/HSCR estudiada en nuestro laboratorio.



C.2 METODOS

C.2.1 Técnicas generales utilizadas

C.2.1.1 Extracción de ADN a partir de sangre periférica

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es el material genético de todos los seres vivos y se encuentra en el núcleo de las células de los organismos eucariotas y en el citoplasma de procariontes. Para efectuar el análisis de ADN utilizando técnicas de genética molecular es necesario la obtención del mismo. En nuestro laboratorio

usualmente se obtiene de una muestra de sangre periférica de los pacientes y familiares relacionados.

Los reactivos necesarios para la extracción de ADN partiendo de una muestra de sangre periférica son:

- TRIS con función de tampón ácido-base.
- $MgCl_2$ mantiene la integridad de la pared de los leucocitos (células nucleadas de las cuales se obtiene la muestra de ADN).
- EDTA secuestra cationes Mg^{2+} y Ca^{2+} inhibiendo de esta manera las ADNasas.
- SDS detergente empleado para disolver los lípidos de las membranas celulares.
- PROTEINASA K digiere las proteínas.
- NaCl precipita las proteínas.
- ETANOL precipita el ADN.

Tampones y soluciones utilizados durante el proceso de extracción:

Tampón de lisis de eritrocitos (solución extemporánea).

Tris 2M (pH=7.5)	5mL
$MgCl_2$ 1M	2.5mL
H_2O csp	500mL

Tampón de lisis de leucocitos (WCLB)(pH=8.2)(Esterilizar y mantener a 4°C).

NaCl 5M	40mL
EDTA 250mM (pH=8.0)	4mL
Tris 2M (pH=7.5)	2.5mL
H_2O csp	500mL

Solución de proteínasa K (Guardar a -20°C).

Proteínasa K	100mg
SDS 10%	5mL
EDTA 250mM (pH=8.0)	400 μ L
H_2O csp	50mL

Tris 10mM/EDTA 0.2mM (pH=7.5) (esterilizar y guardar a 4°C).

Tris 2M (pH=7.5)	1mL
EDTA 250mM (pH=8.0)	8µL
H ₂ O csp	100mL

Solución de cloroformo/alcohol isoamílico (conservar a 4°C y en botella oscura).

Solución A		Solución B	
Cloroformo	480mL	TRIS 2M pH=8.1	5mL
Alcohol isoamílico	20mL	H ₂ O csp	500mL

Mezclar las soluciones A y B y agitar durante toda la noche.

Etanol 70% (conservar a -20°C).

Etanol absoluto	700mL
H ₂ O csp	1000mL

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

1) Lavado de muestras de sangre

- Lavar aproximadamente 15mL de sangre total con suero fisiológico. Para ello se utilizan tubos Nunc de 50mL de polipropileno y estériles. Centrifugar 5-10 minutos a 2000-2500 rpm (7-8g.) y a 4°C sin freno.

- Desechar el sobrenadante dejando la capa celular. Añadir tampón de lisis de eritrocitos hasta alcanzar un volumen de 50mL y agitar suavemente hasta alcanzar la total disolución de la mezcla. Centrifugar 15 minutos a 3500 rpm (10g.) y a 4°C sin freno.

- Decantar el tubo con cuidado y añadir nuevamente tampón de lisis de eritrocitos hasta un volumen total de 50mL. Centrifugar 15 minutos a 3500 rpm (10g.) y a 4°C sin freno.

- Desechar el sobrenadante.

2) Digestión de proteínas

- Añadir tampón de lisis de leucocitos (WCLB), SDS 10% y solución de proteinasa K. La cantidad de cada uno de estos reactivos depende del tamaño del pellet obtenidos en la fase de lavado. Posteriormente, agitar con vórtex hasta observar un aspecto homogéneo. Dejar a 37°C en baño-maría o estufa y agitación durante una noche.

WCLB	3mL	4mL	5mL	6mL
SDS 10%	200µL	266µL	333µL	400µL
Sol. Proteinasa K	500µL	666µL	833µL	1000µL

3) Extracción de ADN

- Añadir 1mL de NaCl 5.5M. Agitar durante 15 segundos en vórtex y centrifugar 15 minutos a 3500 rpm (10 g.) y a 4°C sin freno.

- Con el objeto de eliminar el exceso de sales, traspasar el sobrenadante a otro tubo Nunc y centrifugar 15 minutos a 3500 rpm (10g.) y a 4°C sin freno.

- Añadir v/v de cloroformo. Agitar manualmente durante 15 segundos y centrifugar 15-20 minutos a 3500 rpm (10g) y a 4°C sin freno. Traspasar la fase superior a otro tubo con cuidado para no llevarse las fases intermedia e inferior.

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

- Recuperar el ADN y lavarlo con etanol al 70% a -20°C. Posteriormente pasarlo a un criotubo Nunc. Añadir 0.5-1mL (según el tamaño de la medusa obtenida) de Tris 10mM/EDTA 0.2mM y dejarlo unas horas a 37°C en agitación para que se disuelva. Conservar posteriormente a -80°C.

C.2.1.2. Espectrofotometría de ADN

Preparar una disolución 1:20 del stock de ADN y leer las absorbancias (densidades ópticas, D.O.) a 260nm y 280nm de la solución resultante (ambas del espectro de ultravioleta).

Para poder determinar la concentración y la pureza de los stocks de ADN se determina la absorbancia de la muestra a distintas longitudes de onda. La D.O. 260nm corresponde al ADN de manera que 1 D.O. 260nm equivale a 50µg/mL de ADN de doble cadena. La D.O. 280nm equivale a las proteínas. Para estimar la pureza de la solución de ADN se utiliza el cociente D.O. 260/D.O.280. Cuando la extracción de ADN ha sido adecuada este valor oscila entre 1.6 y 2.

Para calcular la cantidad de ADN (µg/mL) basta con multiplicar la D.O. 260nm por 20 (factor de dilución) y por 50 (concentración de ADN que equivale a 1 D.O. 260nm).

C.2.1.3 Amplificación de ADN genómico mediante PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) nos ha permitido sintetizar in vitro grandes cantidades de un fragmento específico de ADN, para su posterior análisis por diferentes técnicas. Desde que Saiki y colaboradores publicaron, en 1985, el primer experimento de amplificación de ADN humano específico, 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 ADN 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 o primers. Dichos cebadores son secuencias cortas de ADN de unas 15 a 30 bases complementarias a cada una de las cadenas de la región que se quiere amplificar. También son necesarios los desoxinucleótidos trifosfato, dATP, dCTP, dGTP y dTTP, que actúan como precursores del ADN, así como una ADN polimerasa.

La PCR se desarrolla normalmente en tres pasos:

- Desnaturalización: esta fase se realiza a 94°C y consiste en la separación de la doble cadena de ADN.

- Hibridación: fase en la que los cebadores se unen a su molde. La temperatura de hibridación es específica de cada fragmento y de los cebadores empleados.

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

La tecnología de la PCR no se reduce a un único dictado de instrucciones que trabajan en cualquier situación (Innis y cols., 1990), por lo que es necesario ajustar algunos parámetros del proceso para cada fragmento de ADN que se quiera amplificar. Posteriormente trataremos de realizar una descripción de las condiciones experimentales de la PCR *tipo* utilizada en nuestro laboratorio. Sobre estas condiciones se han realizado modificaciones específicas, que se detallaran posteriormente, para cada una de las reacciones puestas a punto durante el presente trabajo.

Protocolo de amplificación mediante PCR

1) Reactivos utilizados en la PCR (volumen final 10µL)

ADN molde (ADN genómico)*	25ng
Solución de desoxinucleotidos trifosfato (Roche Diagnostics)	75µM (cada uno)
Tampón de PCR (Tampón comercial Roche Diagnostics)	1µL
Solución de cada cebador (10pmol/µL)**	1µL
Taq ADN polimerasa (5U/µL, Roche Diagnostics)	0.2µL
H ₂ O csp	10µL

*25ng de ADN genómico humano, equivalen a 7500 copias de cualquier segmento monocopia (Innis y cols., 1990).

**Una parte de los cebadores utilizados durante este trabajo se han sintetizado en nuestro laboratorio utilizando un sintetizador Beckman Oligo 1000 a escala 30nM o 200nM, siguiendo las instrucciones del fabricante. El resto de los cebadores han sido suministrados por Roche Diagnostics. Los cebadores utilizados para la amplificación de microsatélites han sido marcados con fluorescencia en su extremo 5' utilizando el fluorocromo Cy5-amyditeTM (Amersham Biosciences), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este marcaje permite la detección de los amplicones en el secuenciador

automático ALF-ExpressTM (Amersham Biosciences). Para disminuir el coste y aumentar la reproducibilidad de las técnicas empleadas para la búsqueda y caracterización de mutaciones (SSCP, EMD o secuenciación), todos los cebadores necesarios para la amplificación de fragmentos que posteriormente van a ser analizados, llevan incorporados en su extremo 5' la secuencia de los cebadores universales M13 (M13F: cgccagggttttcccagtcacgac y M13R: ttccacaggaacagctatgac), de manera que los productos específicos son posteriormente reamplificados con los cebadores M13F y M13R marcados con el fluorocromo Cy5-amyditeTM (Amersham Biosciences). De esta manera los productos pueden ser analizados bajo condiciones estándar en el secuenciador automático.

2) Amplificación con el termociclador PTC-100TM (MJ Research, Inc.)

Las condiciones de amplificación de cada uno de los fragmentos aislados por PCR en el presente trabajo varían y se indicarán específicamente en cada apartado, utilizando una modificación de la fórmula [(TaD-TiD)->(TaH-TiH)->(TaE-TiE)]xN, publicada por nuestro grupo (Ruiz y cols., 1997):

(Di)-> [(TaD-TiD)->(TaH-TiH)->(TaE-TiE)]xN(R)->(Ef)

Di: Ciclo de desnaturalización inicial.

TaD: Temperatura de Desnaturalización.

TiD: Tiempo de Desnaturalización.

TaH: Temperatura de Hibridación.

TiH: Tiempo de Hibridación.

TaE: Temperatura de Extensión.

TiE: Tiempo de Extensión.

N: Número de ciclos.

Ef: Ciclo de Extensión final de la PCR.

C.2.1.4 Secuenciación semiautomática de los productos de PCR

La secuenciación de ADN a partir de productos obtenidos de la reacción en cadena de la polimerasa, se lleva a cabo como método de rastreo y caracterización de mutaciones. Para la secuenciación semiautomática utilizamos el secuenciador Alf-

Express™ (Amersham Biosciences). En este caso, el proceso de secuenciación comienza con la amplificación por PCR de la región a analizar, para lo que es absolutamente imprescindible que los cebadores utilizados lleven unidas las colas universales M13F y M13R. Posteriormente se procede a la purificación del producto de PCR, que ya llevará incorporados los dos cebadores M13. Para ello se realiza la electroforesis del producto en un gel de agarosa al 1-2%, se escinde la banda de ADN correspondiente al fragmento amplificado y se purifica el producto utilizando el kit de Agarose gel DNA extraction Kit™ (Roche Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante. Alternativamente, se ha utilizado otro proceso que consiste en la electroforesis de la muestra en un gel de agarosa al 2% con doble peine. La muestra se carga en los pocillos del peine superior y posteriormente se va localizando la banda de interés con una lámpara de ultravioleta hasta que observemos que llega a la altura del segundo peine. Poco antes de que la muestra llegue al segundo pocillo se procede a limpiar este último y llenarlo de agua para posteriormente recoger la muestra una vez que haya llegado al pocillo.

Una vez obtenido el producto purificado se llevan a cabo las reacciones de secuenciación en el termociclador PTC100 MJ Research, utilizando el sistema *fmol*™ DNA sequencing Kit (Promega) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Esta técnica está basada en el método bioquímico de Sanger utilizando dideoxinucleótidos como terminadores. Para la secuenciación en dirección 5', utilizamos como cebador el oligonucleótido M13F y aplicamos el programa de PCR siguiente: (94°-5')->[(94°-30'')->(70°-30'')]x30. En cuanto a la secuenciación en dirección 3', el cebador utilizado es el oligonucleótido M13R, y el programa aplicado es: (94°-5')->[(94°-30'')->(42°-30'')->(70°-1')]x30.

Es necesario que el cebador de la reacción de secuenciación, en nuestro caso el cebador M13F o M13R, esté marcado en su extremo 5' con el fluorocromo Cy5-amidite™ (Amersham Biosciences). De esta manera, durante la electroforesis, cuando el fragmento marcado llega a la altura del láser, el fluorocromo Cy5 es excitado y emite fluorescencia que es detectada por los diodos localizados en esta posición del secuenciador.

Para llevar a cabo la electroforesis de los productos secuenciados hemos empleado matrices Long Ranger Singel™ (FMC) y tampón de electroforesis al 0.5x

preparado según las indicaciones del fabricante (44.5mM TRIS, 44.5mM ácido bórico, 1mM EDTA).

Las condiciones de electroforesis son 1500V/60mA/25W a 50°C con un tiempo de carrera variable dependiendo del tamaño del fragmento que se esté secuenciando. Como norma, el tiempo de carrera se calcula estimando 1-1,5 minutos por cada base del producto.

La lectura e interpretación de la secuencia se realiza utilizando el programa Alfmanager™ (Amersham Biosciences). Para llevar a cabo el alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas disponemos de una actualización del software AlfWin Sequence Analyser™ 2.00 (Amersham Biosciences) que nos permite realizar directamente los alineamientos de las secuencias obtenidas e importar otras secuencias en formato ASCII para su comparación.

Este tipo de secuenciación semiautomática se ha utilizado en el presente trabajo para la búsqueda y caracterización de mutaciones y polimorfismos en el extremo 3' del proto-oncogén *RET*.

C.2.1.5 Secuenciación automática de los productos de PCR

En este caso, la secuenciación se lleva a cabo en un secuenciador automático MegaBACE (Amersham Biosciences), dotado de 48 capilares. El proceso de secuenciación comienza con la amplificación por PCR de la región que queremos analizar. Posteriormente, se procede a la purificación del producto de PCR mediante electroforesis de la muestra en un gel de agarosa al 1-2%, excisión de la banda de ADN (correspondiente al fragmento amplificado) y purificación de la banda utilizando el kit Quiaquick gel extraction (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el producto purificado se llevan a cabo las reacciones de secuenciación en el termociclador PTC100 MJ Research, utilizando el kit DYEnamic ET Dye terminator cycle sequencing (Amersham Biosciences). Este método está basado en el método bioquímico de Sanger utilizando dideoxinucleótidos marcados como terminadores. Para este tipo de secuenciación utilizamos dos programas alternativos que aplicamos en virtud de la temperatura de hibridación (TaH) de los cebadores. Como rutina, la primera opción es utilizar el programa de secuenciación en dos pasos: (94°-2')->[(94°-20'')->(65°-1')]x50. Sólo cuando la TaH de los cebadores es muy baja es más conveniente

aplicar el programa de secuenciación en tres pasos: (94°-2')->[(94°-20'')->(55°-15'')->(62°-1')]x50.

En este caso cada uno de los 4 dideoxinucleótidos está marcado con dos fluorocromos diferentes: un fluorocromo donador que es la fluoresceína, y un fluorocromo aceptor que es diferente para cada uno de los 4 dideoxinucleótidos (rodamina 110, rodamina 6 G, tetrametil rodamina y rodamina X). La fluoresceína actúa como fluorocromo donador, de manera que cuando el láser incide sobre el capilar ésta absorbe la energía y la transfiere al fluorocromo derivado de rodamina del mismo dideoxinucleótido. Cada fluorocromo aceptor emite a su correspondiente longitud de onda, de manera que dicha emisión es registrada por el aparato, consiguiéndose así la detección e identificación del nucleótido terminador de cada fragmento obtenido en la reacción de secuenciación.

Previamente a la inyección de las muestras en el secuenciador automático, procedemos a la purificación de los productos de secuenciación mediante el empleo de las placas AutoSeq96 que contienen sephadex G-50 prehidratado (Amersham Biosciences), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez realizado este paso, las muestras quedan purificadas y dispuestas ordenadamente en placas de 96 pocillos (8 filas x 12 columnas, MJ Research), que son las que se introducen en el correspondiente dispositivo del secuenciador para proceder a la inyección. Las condiciones generales de inyección son 2 KV durante 80 segundos, aunque en función del producto a secuenciar se pueden modificar los parámetros de tiempo y voltaje.

Las matrices empleadas para llevar a cabo la electroforesis de los productos secuenciados son columnas MegaBACE™ Long Read Matrix, y el tampón de electroforesis utilizado es 10X MegaBACE™ LPA Buffer (Amersham Biosciences). Las condiciones generales de electroforesis son 9 KV durante 60 minutos, aunque dependiendo del tamaño de los productos se puede variar el tiempo de carrera.

La lectura e interpretación de la secuencia se realiza utilizando el programa Sequence Analyzer que incluye el software del secuenciador MegaBACE (Amersham Biosciences). Para llevar a cabo el alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas disponemos del software BioEdit Sequence Alignment Editor versión 5.0.9 que nos permite realizar directamente los alineamientos de las secuencias obtenidas e importar otras secuencias en formato ASCII para su comparación.

En el presente trabajo hemos utilizado esta técnica de secuenciación automática para el rastreo mutacional de la secuencia codificante del proto-oncogén *RET*.

C.2.1.6 Rastreo de mutaciones mediante PCR-SSCP fluorescente

Una de las técnicas empleadas para el rastreo de mutaciones es el análisis mediante SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) de productos de PCR. Este método se basa en la propiedad que tiene el ADN de cadena sencilla de adquirir una conformación tridimensional específica, dependiente de su estructura primaria, al someterlo a una electroforesis en condiciones no desnaturizantes (Orita y cols., 1989).

La técnica del SSCP se caracteriza por su bajo coste y su simplicidad, ya que básicamente consiste en la amplificación por PCR del fragmento que se quiere estudiar, digestión mediante enzimas de restricción en aquellos casos en los que sea necesario, desnaturización de las muestras, electroforesis vertical de las mismas en geles no desnaturizantes y detección de los fragmentos utilizando el programa Fragment Analyser.

Sin embargo, la sensibilidad de esta técnica es variable, detectando el 60-80% de las mutaciones (Glavac y Dean, 1993), siendo el tamaño de los productos de PCR el factor que más limita la sensibilidad de esta técnica (Grompe, 1993). Es por ello por lo que se aconseja la digestión con enzimas de restricción de los fragmentos de tamaño superior a 300 pares de bases (Iwahana y cols., 1992).

Para llevar a cabo la técnica de SSCP, los productos de PCR de las regiones en estudio se someten a una reacción de reamplificación utilizando los cebadores fluorescentes M13F y M13R y el producto de PCR como ADN molde para esta reacción. La PCR se realiza a volumen final 10µL, con 75µM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTPs), 1mM de cada oligonucleótido, 1µL del producto de PCR y 1UI de Taq ADN polimerasa (Roche Diagnostics). El programa de amplificación es: (94°-5')->[(94°-30'')->(62°-30'')->(72°-30'')]x15->(72°-10'). Es conveniente amplificar y cargar por duplicado cada una de las muestras que se estén analizando para cada fragmento, con el objeto de comparar el patrón de ambas y minimizar la posibilidad de artefactos debidos a una mala desnaturización, bandeo inespecífico de la PCR o un carril del gel en mal estado. Posteriormente, se somete a digestión con endonucleasas de restricción

aquellos fragmentos cuyo tamaño no esté dentro de los límites del SSCP. El producto de PCR marcado se diluye en agua hasta un volumen final de 50 μ L. Se separan 3 μ L y se mezcla v/v con tampón de carga (formamida desionizada 100% y azul de dextrano 5mg/mL). Antes de la carga, las muestras se desnaturalizan a 95°C durante 3 minutos y se mantienen en hielo hasta proceder a su carga en un gel no desnaturalizante de MDE^R (AT Biochem) al 0.5%. Normalmente, polimerizamos dos tipos de matrices, una de ellas sin glicerol y otra al 10% de glicerol. Tras dejar polimerizar el gel al menos 1 hora, se lleva a cabo la electroforesis a temperatura ambiente en el secuenciador automático Alf-ExpressTM (Amersham Biosciences) durante 4-6 horas, limitando la potencia a 15W, y utilizando placas de 15X30 y matrices de 0.5mm de espesor. El tampón utilizado en la electroforesis es TBE 0.6x, descrito previamente.

Una vez concluida la electroforesis se analizan los patrones de migración mediante el programa AlfWin Fragment AnalyserTM 1.01 (Amersham Biosciences).

Con el objeto de disponer de controles positivos para cada fragmento analizado y controlar así la sensibilidad de la técnica de SSCP en cada carrera, hemos aplicado la técnica del LMP (Longer Mismatch Primer) desarrollada por Ruiz y cols., 1997. Esta técnica es un sistema sencillo de incorporar mutaciones, mediante PCR-mutagénesis, para convertir *in vitro* controles negativos en controles positivos específicos del segmento genómico analizado. La técnica LMP se basa en la capacidad de hibridar, bajo determinadas condiciones, cebadores con bases desapareadas respecto a su ADN molde durante la PCR (Newton y cols.; Okayama y cols.; Wu y cols., 1989). La técnica consiste en añadir al tubo de reacción de un control negativo un cebador más largo que incorpora una base desapareada en la zona no común con el cebador silvestre. El cebador LMP se diseña más largo en su extremo 3' de manera que el tamaño del producto de PCR no se altera. Esto permite la generación *in vitro* de un control positivo, ya que el 100% del producto amplificado se mutageniza (Ruiz y cols., 1997). Aunque este método no resuelve completamente el problema de los controles de SSCP, ya que la detección de un solo cambio no es indicativa de que las condiciones experimentales nos permitan detectar el 100% de las posibles alteraciones de una secuencia, la detección de un patrón aberrante indica que la técnica se está realizando correctamente. En nuestro caso, como todos los productos llevan incorporados los cebadores universales M13F y M13R, hemos diseñado un cebador LMP que tiene una

base desapareada con respecto al cebador M13F. Este cebador que denominamos LMP-M13F (X-CGCCATGGTTTTCCCAGTCACGAC) se añade al tubo de PCR de un control negativo en el paso de reamplificación, obteniendo de esta manera un control para cada fragmento analizado mediante SSCP.

Utilizando la técnica SSCP comenzamos a rastrear el extremo 3' del intrón 1 del proto-oncogén *RET*, tal como se expondrá más adelante.

C.2.1.7 Rastreo de mutaciones mediante PCR-EMD fluorescente

La técnica de EMD (*Enzymatic Mutation Detection*) es un método de detección de mutaciones de gran fiabilidad y reproducibilidad (sensibilidad del 100%; 94.3% de especificidad) (del Tito y cols., 1998). Este método utiliza una enzima resolvasa, concretamente la T4 Endonucleasa VII, involucrada en la reparación del ADN y en el reconocimiento de los intermediarios del ADN autoplegado que se forman durante la replicación y empaquetamiento del ADN. Por otra parte, es capaz de reconocer zonas desapareadas a lo largo de la doble cadena de ADN, produciendo un corte a unas 6 pares de bases hacia el extremo 3' de la mutación. Esta actividad es la que se emplea en la técnica de detección de mutaciones mediante PCR-EMD fluorescente.

Metodológicamente consta de 4 fases:

1. Fase de amplificación: amplificación del fragmento de ADN que se quiere analizar.
2. Formación de heterodúplex: los productos de PCR se someten a un ciclo de 95°C 5 minutos y posteriormente se mantienen a temperatura ambiente de 5 a 30 minutos, favoreciendo así la formación del heterodúplex.
3. Digestión con la resolvasa T4 endonucleasa VII a 37°C durante 30 minutos.
4. Resolución de los productos digeridos en geles desnaturalizantes.

La técnica de EMD aporta una serie de ventajas en comparación con otras técnicas de rastreo como el SSCP. Además de presentar una sensibilidad del 100%, se trata de una técnica estandarizada para el análisis de cualquier tipo de fragmento, sea cual sea su tamaño. Sin embargo, la técnica de EMD nos plantea una limitación ya que sólo puede detectar cambios que estén presentes en heterozigosis. Para solventar este

problema el ADN de los pacientes se mezcla en una proporción 1:1 con un ADN control, de manera que cualquier mutación pueda ser detectada.

Por todas sus ventajas, esta técnica pasó a ser la de elección para el rastreo de mutaciones en nuestro laboratorio, de forma complementaria a la secuenciación automática bidireccional. Concretamente, en el presente trabajo se aplicó esta técnica para realizar la búsqueda de mutaciones y polimorfismos en el extremo 3' del intrón 1 del proto-oncogén *RET*, tal y como se explicará más adelante.

El protocolo estándar empleado consiste en una reamplificación inicial siguiendo las mismas indicaciones de la amplificación realizada en la técnica de SSCP con objeto de obtener fragmentos marcados con fluorescencia y que puedan ser detectados en el secuenciador automático. La única diferencia es que los fragmentos purificados de las regiones a analizar se mezclan siempre con el fragmento correspondiente del ADN control. Paralelamente, este ADN control también se emplea para amplificar el control positivo utilizando la técnica de LMP descrita anteriormente. Los productos de ADN obtenidos en la reacción de reamplificación se someten a un proceso de desnaturalización de 5 minutos a 95°C seguido de 5-30 minutos a temperatura ambiente, favoreciendo así la formación de heterodúplex. Transcurrido este tiempo se añade la endonucleasa T4 y se mantiene a 37°C durante 30 minutos (Passport mutation scanning kit, Amersham Biosciences). Posteriormente 5µL de muestra se mezclan con 3µL de tampón de carga (formamida desionizada 100% y azul de dextrano 5mg/mL) y se desnaturaliza 3 minutos a 94°C. Finalmente, se cargan en geles desnaturalizantes, en concreto la matriz empleada es ReproGel™ High Resolution (Amersham Biosciences) que polimeriza tras 10 minutos de exposición a luz UV. La electroforesis se lleva a cabo a 500W y a 60°C utilizando placas de 15X30 y matrices de 0.5mm de espesor. El tiempo de carrera variará dependiendo del tamaño del fragmento. El tampón de carga es TBE al 0.5X (TRIS 50mM, 41.5mM ácido bórico y 0.5mM EDTA).

Posteriormente, los datos obtenidos son procesados utilizando el programa AlWin Fragment Analyser™ 1.00 (Amersham Biosciences) y el tamaño de los fragmentos obtenidos se determina utilizando como referencia un marcador de tamaño fluorescente comercial (Cy5-syzer 50-500, Amersham Biosciences).

C.2.1.8 Genotipación por PCR-RFLP

La PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) es una herramienta clásica de genética molecular para la genotipación de cualquier variación de secuencia puntual. Se aplica seleccionando una enzima que distinga las variantes de ADN mediante la pérdida o ganancia de algún punto de corte, cuando aparece la mutación en su secuencia de reconocimiento. Amplificamos por PCR la región genómica que contiene la mutación que se desea genotipar y el producto de PCR se incuba con la enzima de restricción que distingue la mutación problema. Posteriormente, se efectúa una electroforesis del producto de la digestión en geles de acrilamida o agarosa para analizar el patrón de bandas. Estas técnicas son muy útiles para rastrear rápidamente cualquier mutación específica en un grupo grande de pacientes, para efectuar el análisis de segregación de las variantes en las familias o bien para la estimación de la frecuencia poblacional de un determinado polimorfismo y la realización de controles. Para seleccionar las endonucleasas se efectúa el análisis comparado de los mapas de restricción de la secuencia normal obtenida de Genbank y de la secuencia mutada, empleando el programa MAP (GCG Wisconsin Package). Posteriormente el programa MAPSORT (GCG Wisconsin Package) indica el tamaño de los fragmentos de la digestión seleccionada y los ordena en ambas secuencias (normal y mutada). El objetivo de este segundo análisis es comparar ambos mapas y seleccionar el método de resolución más adecuado para cada una de ellas (usualmente geles de agarosa o acrilamida según el tamaño de los fragmentos de PCR).

En este trabajo se ha empleado la técnica PCR-RFLP para la genotipación de diferentes variantes de secuencia del proto-oncogén *RET*, cuyas condiciones específicas se explican con detalle más adelante.

C.2.1.9 Genotipación espectral por PCR-FRET

La transferencia de energía mediante resonancia fluorescente (FRET/*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) es una técnica novedosa que permite la rápida evaluación de cambios de secuencia en un gran número de pacientes, sin necesidad de resolución mediante electroforesis. El proceso de genotipación completo, que consta de una reacción de PCR seguida del fenómeno FRET propiamente dicho, se

realiza en el sistema LightCycler™ (Roche Diagnostics). Este sistema combina la tecnología fluorescente con un termociclador ultrarrápido que utiliza corrientes de aire para permitir así que la velocidad de transición de la temperatura sea muy elevada (20°C/segundo). Para esta PCR utilizamos el kit comercial FastStart LC Master (Roche Diagnostics), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La reacción se realiza en capilares compuestos de una combinación de cristal y plástico, los cuales permiten que se alcance rápidamente el equilibrio entre la temperatura del aire y los componentes de la reacción, ya que aumentan la relación superficie/volumen. El alto valor de la velocidad de transición supone una enorme ventaja puesto que reduce considerablemente el tiempo de duración de la PCR en comparación con un termociclador convencional.

Para que tras la PCR se produzca el fenómeno FRET, es necesario haber añadido a la reacción una pareja de sondas específicas de la secuencia a analizar. Una de las sondas, sonda de detección (sensor), marcada en su extremo 3' con fluoresceína, es complementaria a la región del producto de PCR donde se localiza la variación de secuencia que queremos estudiar. La otra sonda, sonda de anclaje (anchor), marcada en su extremo 5' con el fluorocromo LC Red640 o con LC Red705, es complementaria a una región próxima a la de la sensor, y se encuentra fosforilada en su extremo 3' para impedir su extensión durante la PCR.

La unidad óptica del sistema LightCycler™ contiene tres canales que van registrando la emisión de fluorescencia a diferentes longitudes de onda durante todo el proceso. Además tiene un diodo que emite luz azul (470nm) hacia el capilar, y excita a la fluoresceína. Tras excitarse, la fluoresceína emite luz verde (525nm) que es capaz de excitar a su vez al fluorocromo LC Red640 o LC Red705 de la sonda de anclaje. Cuando el LC Red640 se excita, emite fluorescencia a una longitud de onda de 640nm, que es registrada por el canal F2 del sistema. En caso de que el fluorocromo que porta la sonda de anclaje sea LC Red705, la longitud de onda a la que emite cuando se excita es de 705nm, la cual se registra en el canal F3. Este fenómeno de transferencia sólo tiene lugar si las sondas se encuentran separadas a una distancia inferior a 5 nucleótidos, hecho que únicamente sucede cuando ambas sondas están hibridadas al producto de PCR.

Inmediatamente a continuación de la PCR, el sistema eleva la temperatura hasta 95°C con el fin de que se separe la doble cadena de ADN del producto amplificado. Esta desnaturalización es seguida por una bajada de temperatura hasta los 40°C, transición en la que se favorece que las dos sondas hibriden con sus respectivas regiones complementarias dentro del amplicón, comenzando consiguientemente la transferencia de energía entre ambas. A continuación el sistema comienza a generar una rampa de temperatura desde los 40 hasta los 95°C, en la que en un determinado momento se alcanza un valor conocido como temperatura de fusión o de melting de las sondas (T_m). En ese momento las sondas se separan del producto, haciendo que finalice el fenómeno de transferencia. La sonda de anclaje siempre tiene una T_m más alta que la sonda de detección, por lo que las variaciones en la emisión de fluorescencia dependerán exclusivamente de la sonda de detección. La T_m de la sonda de detección depende de su contenido en GC y su tamaño, así como del grado de homología que presente con la secuencia. De esta manera, cambios en algún nucleótido en la región que cubre esta sonda harán que su temperatura de fusión sea menor, y es precisamente este hecho el que se utiliza como criterio para realizar la genotipación.

Posteriormente, utilizando el software del LightCyclerTM se analiza el registro fluorimétrico del proceso tomando como parámetro la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura. De esta manera se obtienen picos que corresponden con las temperaturas de fusión de las sondas empleadas. En función del genotipo que presente un individuo particular para una determinada variante (homocigoto para el alelo silvestre, heterocigoto, u homocigoto para el alelo mutante), el patrón de los picos será diferente.

Hemos utilizado la técnica de PCR-FRET para la genotipación de diversos polimorfismos en los genes *RET*, *GFRA1*, *GFRA2* y *GFRA3*. Las condiciones de genotipación para cada variante vendrán especificadas más adelante.

C.2.1.10 Caracterización de rearrreglos génicos mediante Southern blot

La técnica de hibridación o Southern blot se emplea para identificar fragmentos específicos de ADN en una mezcla compleja. Inicialmente se digiere el ADN que queremos estudiar con una o más enzimas de restricción, las cuales cortan en puntos

específicos de la secuencia, generando fragmentos de varios tamaños. Seguidamente, estos fragmentos se separan por su tamaño en un gel de agarosa a través de electroforesis y luego se transfieren a una membrana de nylon. Para la detección del fragmento de interés en la membrana, utilizamos otro fragmento de ADN que se llama sonda y que contiene la secuencia complementaria al fragmento que queremos identificar. La sonda, se marca con un isótopo radiactivo, se agrega a una solución y se incuba con la membrana durante varias horas. Esta hibridación, hace que la sonda se adhiera al fragmento de ADN en la membrana que contiene las bases complementarias. A continuación se realiza el lavado de la membrana para eliminar la sonda que se ha unido de manera inespecífica. Finalmente, al exponer la membrana a una película de fotografía ésta queda impresionada permitiéndonos identificar la localización del fragmento al que se ha unido la sonda. Este hecho permite discriminar la existencia de rearrreglos génicos tales como expansiones o deleciones, en función de la posición en la que aparezca impresionada la película fotográfica.

En la realización de esta tesis hemos empleado la técnica de Southern blot para la caracterización de una deleción en el gen *GFRA1* en una familia HSCR.

Soluciones empleadas para el tratamiento del gel tras la electroforesis y para la transferencia del ADN a la membrana

Solución HCl 0,25M (solución extemporánea)

HCl fumante	10.5mL
H ₂ O csp	500mL

Solución Denature

NaCl	87.60g
NaOH	20g
H ₂ O csp	1000mL

Solución Renature

Tris	60.55g
NaCl	87.66g

H ₂ O csp	1000mL
----------------------	--------

Ajustar el pH a 7.4 con mediante la adición de HCl

SSC 20X

NaCl	175.32g
------	---------

Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	88.236g
--	---------

H ₂ O csp	1000mL
----------------------	--------

Soluciones y tampones empleados para la prehibridación e hibridación de la membrana

Solución Denhardt's 50X (Conservar a -20°C)

Ficoll	10g
--------	-----

Polivinilpirrolidona	10g
----------------------	-----

BSA	10g
-----	-----

H ₂ O csp	1000mL
----------------------	--------

Tampón fosfato 0.2 M (pH 6,8)

Na ₂ HPO ₄ 1M	11.575mL
-------------------------------------	----------

NaH ₂ PO ₄ 1M	13.425mL
-------------------------------------	----------

H ₂ O csp	125mL
----------------------	-------

SDS 10% (Conservar a temperatura ambiente durante 3-4 meses)

SDS	100g
-----	------

H ₂ O	900mL
------------------	-------

Calentar a 68°C para facilitar la disolución, y finalmente ajustar el volumen a 1000mL

Solución de Prehibridación (Conservar a temperatura ambiente)

Solución Denhardt's 50X	50 mL
-------------------------	-------

Esperma de salmón 10 mg/mL	5mL
----------------------------	-----

Tampón fosfato 0.2 M (pH 6,8)	125 mL
-------------------------------	--------

Ppi 5%	10 mL
--------	-------

SSC 20x	100mL
SDS 10%	5mL
Heparina	1mL
H ₂ O csp	500mL

Hervir esperma de salmón 5 minutos al baño María y dejarlo en hielo otros 5 minutos antes de añadirlo al tampón.

Solución de Hibridación (Conservar a -20°C en alícuotas de 50mL)

Solución de prehibridación	300mL
Dextran sulfato 25%	200mL

Soluciones de lavado de la membrana tras la hibridación

Solución de lavado I

SSC 20X	50mL
SDS 10%	5mL
H ₂ O csp	500mL

Solución de lavado II

SSC 20X	25mL
SDS 10%	5mL
H ₂ O csp	500mL

Solución de lavado III

SSC 20X	12.5mL
SDS 10%	5mL
H ₂ O csp	500mL

Solución de lavado IV

SSC 20X	2.5mL
SDS 10%	5mL
H ₂ O csp	500mL

Protocolo general para la realización de Southern blot

1) Digestión del ADN genómico con endonucleasas de restricción

La selección de las endonucleasas más adecuadas para generar fragmentos de ADN de tamaño apropiado, se realiza con las herramientas bioinformáticas MAP y MAPSORT del paquete GCG Wisconsin, que proporcionan mapas de restricción detallados de la región genómica objeto de nuestro estudio.

La digestión del ADN genómico se lleva a cabo a 37°C durante 6 horas bajo las siguientes condiciones generales:

ADN genómico	5µg
Tampón	5µL
BSA (1mg/mL)	5µL
Espermidina (100mM)	2µL
Enzima	40 UI*
H ₂ O csp	50µL

*Para facilitar la digestión del ADN genómico la enzima se añade en tres pasos sucesivos de 20,10 y 10 UI cada 2 horas.

2) Electroforesis de la digestión

La electroforesis del ADN digerido se realiza en gel de agarosa al 0.8%, usando TBE 1X como tampón, y el marcador de peso molecular de 1Kb (GIBCO BRL). Se fija el voltaje a 55V durante 16-20 horas.

Finalmente se visualiza el gel en el transiluminador, comprobando que la digestión se ha efectuado correctamente. Con bisturí se corta la parte del gel que no interesa, y se hace una pequeña muesca en el extremo inferior izquierdo para poder controlar el orden de las digestiones cargadas.

3) Tratamiento del gel después de la electroforesis

- Colocar el gel en una bandeja en agitación y lavar con agua destilada.

- Tratar el gel con HCl 0.25M durante 15' o 20' en suave agitación.
- Enjuagar con agua destilada
- Añadir solución Denature durante 30' en la bandeja de agitación.
- Lavar de nuevo con agua destilada.
- Añadir solución Renature durante al menos 30' y enjuagar con agua destilada.

4) Transferencia del ADN al filtro de nylon

Para el presente trabajo se ha utilizado el sistema de transferencia por capilaridad de Life Technologies y las membranas N-plus de Amersham Biosciences. El tampón empleado para la transferencia es SSC 10X. Tras 16 horas de transferencia el filtro se impregna en solución SSC 2X y se deja durante 1 hora bajo un foco de luz.

5) Obtención de la sonda de ADN marcada con ^{32}P

Cada una de las sondas utilizadas en el presente trabajo se ha obtenido por PCR y posterior purificación con el kit Agarose gel DNA extraction KitTM (Roche Diagnostics). Una vez purificada, la sonda siempre se ha de conservar a -80°C .

El marcaje radioactivo de la sonda se efectúa con $^{32}\text{dCTP}$ (Redivue, Amersham Biosciences), utilizando el kit de marcaje RediprimeTM II" Random Prime Labelling System (Amersham Biosciences) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este sistema se basa en el empleo de cebadores hexanucleótidos elegidos al azar (Feinberg y Vogelstein, 1983 y 1984) y el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I.

Una vez marcada la sonda se purifica utilizando columnas microcospinTM S-300 HR (Amersham Biosciences). Finalmente, para comprobar la efectividad del marcaje y conocer el volumen de sonda que hará falta en la hibridación, se realiza el conteo de Kcpm en el Beckman 170M Radioisotope Detector.

Toda manipulación de estos productos se realiza en una instalación radioactiva de tercer nivel, asegurando el cumplimiento de las medidas de seguridad exigidas por el Consejo de Seguridad Nuclear.

6) Prehibridación e hibridación de la membrana

Estos procesos se efectúan en un horno Hybridizer 600 (Cultek, Stratagene) utilizando botellas de hibridación. Para la prehibridación del filtro se añaden 10 mL de la solución de prehibridación, y se mantiene a 65°C durante 2 horas.

Transcurrido ese tiempo se sustituye la solución de prehibridación por 10 mL de solución de hibridación, y se añade el volumen de sonda que equivale a 7500 Kcpm. Como paso previo a la adición de la sonda, ésta ha de desnaturalizarse durante 3' a 95°C. La hibridación del filtro se realiza a 65°C durante 12-16 horas.

7) Lavado de la membrana hibridada

Las condiciones de lavado varían en función de la sonda utilizada. Como norma general el filtro se lava durante un tiempo que varía entre los 10 y 30 minutos con cada una de las soluciones de lavado previamente descritas, comenzando por la solución de mayor astringencia (solución I, II, III y IV). En general la temperatura de lavado oscila entre los 65 y 72°C, dependiendo de cuál sea la temperatura de hibridación de la sonda. Después de los lavados con cada una de las soluciones se ha de chequear el filtro para controlar las cpm. Al final de los lavados la membrana debe quedar con un máximo de 1000 cpm.

Finalmente el filtro se introduce en una envoltura de plástico asegurando que quedará permanentemente humedecido, y se expone a varias películas de fotografía conservándose a -80°C.

El tiempo de exposición depende de cada experimento, aunque el primer revelado se suele hacer a las 24 horas de exposición. En función de los resultados observados se determina el tiempo para realizar los siguientes revelados.

C.2.1.11 Tratamiento estadístico de los datos. Estudios de casos y controles.

1) Aplicación de la ley de Hardy-Weinberg

Para cada una de las variantes analizadas se ha calculado 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

$$\left. \begin{array}{l} 0 \leq p \leq 1 \\ 0 \leq q \leq 1 \\ p + q = 1 \end{array} \right\} \text{donde } p \text{ es la frecuencia del alelo } A_1 \text{ y } q \text{ la frecuencia del alelo } A_2$$

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

p^2 = frecuencia del genotipo $A_1 A_1$

$2pq$ = frecuencia del genotipo $A_1 A_2$

q^2 = frecuencia del genotipo $A_2 A_2$

El equilibrio de Hardy-Weinberg es un modelo teórico para genética de poblaciones. El concepto de equilibrio en el modelo de Hardy-Weinberg 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, (panmixia).
2. La población es suficientemente grande (para minimizar las diferencias existentes entre los individuos).
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 con la corrección de Yates 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, o evento mutacional.

2) 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 han utilizado estudios de casos y controles. En este tipo de estudios, las asociaciones entre enfermedades y marcadores se encuentran comparando las frecuencias de un alelo particular de un marcador en una serie de pacientes con las de una serie de controles sanos. Hemos utilizado el método de χ^2 con la corrección de Yates o el test de Fisher con dos colas, para detectar diferencias en las distribuciones polimórficas o haplotípicas entre dos grupos de estudio. Para la aplicación de estos tests estadísticos hemos utilizado el paquete informático SPSS versión 9.0.

El test de χ^2 es una prueba estadística diseñada por Carl Pearson y que asume la hipótesis nula de no relación entre 2 variables dicotómicas. 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 hemos considerado límite para afirmar que dos variables están asociadas es de $p < 0.05$. Además, para conseguir una estimación mejor del nivel de significación estadística hemos aplicado la corrección de Yates al test de χ^2 .

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 de χ^2 cuando la frecuencia de las variantes estudiadas es muy baja (<5%). Al igual que en el caso anterior, se considera que existe significación estadística cuando $p < 0.05$.

3) Test de desequilibrio de transmisión (TDT "*Transmisión disequilibrium test*")

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 M1 con la enfermedad en estudio, se compara la frecuencia de dicho M1 entre los alelos transmitidos y los no transmitidos. La significación estadística de la asociación se calcula mediante el test de χ^2 .

C.2.2 Análisis molecular de la variante S836S de *RET*

El primer factor de susceptibilidad genético identificado para el cáncer medular de tiroides esporádico es la variante de secuencia S836S de *RET* (c.2439C>T), localizada en el exón 14 de dicho gen. Gimm et al., encontraron una sobre-representación estadísticamente significativa de este polimorfismo en una cohorte de pacientes MTC de origen alemán al comparar con la población control. Con el objeto de evaluar S836S como factor de susceptibilidad para MTC esporádico en la población española, se realizó su genotipación en la cohorte MTC disponible (32 pacientes) y en un grupo control constituido por 250 individuos sanos. La técnica elegida fue la PCR-RFLP utilizando la enzima de restricción *AluI* (Roche Diagnostics), puesto que en presencia del polimorfismo esta restrictasa pierde un punto de corte. Así, los pacientes homocigotos para el cambio presentan una banda de 284 pb y otra de 10pb, mientras que los homocigotos para el alelo normal muestran dos bandas de 157 y 127 pb además de la banda de 10pb.

La PCR se realiza a volumen final 10 μ L, con 200 μ M de cada dNTP, 1 μ M de cada oligonucleótido (cebador 5':AAGACCCAAGCTGCCTGAC; cebador 3':GCTGGGTGCAGAGCCATAT), 100ng de ADN molde y 1UI de Taq ADN polimerasa (Roche Diagnostics). Las condiciones de amplificación son: (94°-5')->[(94°-30''->(65°-1')] \times 35->(72°-7').

La digestión se realiza a volumen final 20 μ L, utilizando todo el producto de PCR, 2.5 μ L de tampón, 2.5 μ L de BSA (1mg/mL), 1 μ L de espermidina 100mM y 20UI de enzima *AluI*. El producto así digerido durante 3 horas a 37°C, se somete a electroforesis fijando el voltaje a 100v en gel de agarosa al 2% durante 45 minutos. Como marcador de peso molecular se utiliza el Marker V (Roche Diagnostics).

Transcurrida la electroforesis, el gel se visualiza en el transiluminador UV para poder analizar el patrón de bandas para cada individuo.

Una vez completado el proceso de genotipación, se calculó la frecuencia alélica para cada uno de los grupos en estudio, y se aplicó el test exacto de Fisher con dos colas para comparar la distribución polimórfica en ambos grupos.

C.2.3 Rastreo mutacional de los exones 10, 11, 13, 14, 15 y 16 del proto-oncogén *RET* en los pacientes MTC

Siguiendo las normas estándar de actuación establecidas por todo el mundo, nuestro grupo realiza como práctica de rutina el análisis molecular de los exones 10, 11, 13, 14, 15 y 16 del proto-oncogén *RET*, en todos aquellos pacientes que presentan cáncer medular de tiroides. El propósito de esta práctica es la identificación de casos ocultos de formas familiares del síndrome MEN 2. El método de rastreo seleccionado es la secuenciación directa bidireccional. En principio, la secuenciación se realizaba en el secuenciador semiautomático Alf Express™ (Amersham Biosciences) según pautas descritas en el apartado C.2.1.4. Posteriormente se pasó a realizar en el secuenciador automático MegaBACE (Amersham Biosciences), siguiendo los pasos descritos en el apartado C.2.1.5.

Tabla C.1. Cebadores y condiciones de amplificación de los exones del proto-oncogén *RET*

Exón	Cebador 5'	Cebador 3'	TaH	TiD	TiH	TiE	pb
Exón 10	GCGCCCCAGGAGGCTGAGTG	GGTGGTGGTCCCGGCCGCC	68	30	60	-	186
Exón 11	TGCCAAGCCTCACACCAC	TCCCTCCCTGGAAGGCAG	67	30	120	-	349
Exón 13	GCAGGCCTCTGTCTGAACTT	GGAGAACAGGGCTGTATGGA	65	30	60	-	296
Exón 14	M13F-AAGACCCAAGCTGCCTGAC	M13R-GCTGGGTGCAGAGCCATAT	65	30	60	-	343
Exón 15	GTCTACCAGGCCGCTAC	ATGGTGCACCTGGGATCCCT	60	30	30	30	292
Exón 16	AGGGATAGGGCCTGGCCTTC	TAACCTCCACCCAAGAGAG	66	30	30	30	192

Los cebadores empleados para la amplificación de cada uno de estos exones de *RET* habían sido previamente descritos (Mulligan et al., 1993, 1994, 1994b; Eng et al., 1994; Ceccherini et al., 1994; Hofstra et al., 1994; Myers et al., 1995; Borrego et al., 1998). La PCR se realiza a volumen final 10 μ L, con 200 μ M de cada dNTP, 1 μ M de cada oligonucleótido, 25ng de ADN molde y 1UI de Taq ADN polimerasa (Roche Diagnostics). El programa general de PCR para todos los exones es el siguiente: (94°-5')->[(94°-TiD)->(TaH°-TiH)->(72°-TiE)]x 35->(72°-7'). En la tabla C.1 se muestran las secuencias de los cebadores utilizados, la temperatura de hibridación específica para cada fragmento (TaH), los tiempos de desnaturalización (TiD), hibridación (TiH) y extensión (TiE) de cada ciclo, y el tamaño de los fragmentos amplificados (pb).

C.2.4 Rastreo mutacional del gen *GFRA4* en la cohorte HSCR. Análisis molecular de los polimorfismos identificados

El gen *GFRA4* (Genbank AL356755) se localiza en 20p13 y codifica para uno de los 4 co-receptores del receptor RET, cuyo ligando es la persefina. Es por tanto uno de los genes implicados en la cascada metabólica de RET, y por consiguiente un gen candidato para HSCR. A diferencia de lo que ocurría con los genes *GFRA1*, *GFRA2* y *GFRA3*, que habían sido previamente rastreados por otros autores en busca de mutaciones asociadas a la enfermedad de Hirschsprung (Myers et al., 1999; Onochie et al., 2000; Vanhorne et al., 2002), el gen *GFRA4* no había sido evaluado aún como gen de susceptibilidad para esta patología. Por este motivo nuestro grupo se planteó el rastreo sistemático de la secuencia codificante de *GFRA4* en los pacientes HSCR esporádicos disponibles. Mediante la técnica de secuenciación en ambas direcciones se analizaron los 6 exones del gen, las uniones intrón-exón y las regiones intrónicas flanqueantes en los pacientes HSCR disponibles.

Todas las reacciones de PCR se realizaron de forma individual utilizando oligonucleótidos previamente diseñados por el programa Prime del paquete GCG Wisconsin. El programa de amplificación es idéntico para todos los fragmentos: (94°-5')->[(94°-30'')->(TaH°-30'')->(72°-30'')]x35->(72°-7'), exceptuando la temperatura de hibridación (TaH) de cada pareja de oligonucleótidos. La tabla C.2 muestra los

cebadores utilizados, el tamaño de los fragmentos amplificados y la temperatura de hibridación específica para cada fragmento.

Tabla C.2. Cebadores y condiciones de amplificación de los exones del gen *GFRA4*

Fragmento	Cebador 5'	Cebador 3'	TaH	pb
Exón 1	AGCTGGGTTTTCACGTGCT	ACTGAGGAGCAGGGACAGAG	60	206
Exón 2a	GATGGGCTGGGTGAAGTGT	ACGGGCAGAAGAGCAGTG	61	282
Exón 2b	GTTTGCGCTCCGAGTATGTG	GCGGTGAGCCGGAGAGAG	62	335
Exón 3	GGCCTCTCTCCGGCTCAC	CGGAGATATCCCCTGGAGAA	62	200
Exón 4	CGATGACTTCGCCCTCAG	CCATTCTCCCCTCTAAAATGG	60	261
Exón 5	AGCAGGGGGTCTCTCACTTT	GACGGAAGGGTGTGAAGGT	60	243
Exón 6	AGAGACAGGCTTTTGCCTCA	GGGTAAGCCAGTCCCTTCTC	60	228

Una vez caracterizados los cambios de secuencia en *GFRA4*, se analizó su presencia en un grupo constituido por 115 controles sanos. Se calcularon las frecuencias de cada una de las variantes en la cohorte HSCR y en el grupo control, y se aplicó el test de χ^2 con la corrección de Yates para comparar las distribuciones alélicas de cada polimorfismo en ambos grupos.

C.2.5 Análisis molecular de las variantes de secuencia de los genes *GFRA1*, *GFRA2* y *GFRA3*

Los genes *GFRA1* (10q.26, OMIM 601496), *GFRA2* (8p.21, OMIM 601956) y *GFRA3* (5q.31, OMIM 605710) codifican para tres co-receptores de RET cuyos ligandos son GDNF, neurturina y artemina respectivamente. Al igual que *GFRA4*, participan en la formación del complejo heterotetramérico del receptor RET, necesario para la activación del mismo, y por ello son excelentes genes candidatos para la enfermedad de Hirschsprung y para el cáncer medular de tiroides. Nuestro grupo genotipó un total de 9 variantes distribuidas por *GFRA1-3* en 72 pacientes HSCR, 51 pacientes MTC y en 115 controles sanos, con el fin de evaluarlas como posibles factores de susceptibilidad para el desarrollo de estas patologías en nuestra población. Además

también incluimos en este estudio a los padres de los pacientes HSCR disponibles, con el objeto de poder realizar el análisis de segregación de las variantes testadas que nos permitiera la generación de haplotipos. Las variantes evaluadas, previamente descritas y analizadas por otros grupos en otras poblaciones (Myers et al. 1999; Onochie et al. 2000; Vanhorne et al. 2001; Gimm et al., 2001) son: -193 C>G, -106 G>A y -78 T>C (situadas en el extremo 5'UTR de *GFRA1*), 537T>C (exón 4 de *GFRA1*), IVS5+21G>A (*GFRA1*), 1081 A>G (exón 7 de *GFRA1*), 78G>T (exón 2 de *GFRA2*), y IVS7+7insGG y IVS7+39G>A (*GFRA3*).

Empleamos la tecnología PCR-FRET tal como se explica en el apartado C.2.1.9. Los cebadores utilizados para la obtención de los amplicones correspondientes ya habían sido previamente publicados (Gimm et al., 1999; Gimm et al., 2001) y sus secuencias se recogen en la tabla C.3.

Tabla C.3 – Cebadores y condiciones de amplificación para las variantes de *GFRA1-3*.

Variante	Cebador 5'	Cebador 3'	TaH	N	pb
-193C>G ¹					
-106G>A ¹	GTCGGACCTGAACCCCTAAAA	CCAAAAAGAACTTCTTCCTTCC	60	35	416
-78T>C ¹					
537T>C ¹	TGTGACCATGCCTGTCTTTC	TCATTAATCACCAGCTGCCA	65	45	402
IVS5+21G>A ¹	CCCCACCCTTTTTCTATTG	CAGGCATGTCCTCAAGGATT	61	40	284
1081A>G ¹	CGTTTGCTGCTTGACTTTGA	GGAATCTGGACGCAGTTCTC	61	40	252
78G>T ²	TTGGGTGGGAGATTGTGG	CTCCCTCCTGAACCCCTG	67	40	457
IVS7+7insGG ³					
IVS7+39G>A ³	ACCCTTCCAATGAGCCTTCT	CGCCTCTATCCCTTTGTCTG	60	35	207

Dada la proximidad de las tres variantes situadas en el extremo 5' UTR de *GFRA1* (-193C>G, -106G>A y -78T>C) se seleccionaron cebadores para la obtención de un amplicón que abarca a todas ellas. Igualmente ocurre con los dos polimorfismos situados en el intrón 7 de *GFRA3* (IVS7+7insGG y IVS7+39G>A). En ambos casos, la PCR se realiza en el termociclador PTC-100TM MJ Research a volumen final 25µL, con 100µM de cada dNTP, 0.6 µM de cada cebador, 25ng de ADN molde y 2UI de Taq

ADN polimerasa (Roche Diagnostics). Posteriormente el producto de PCR se divide en distintas partes a las que se añaden las correspondientes parejas de sondas (0.2µM de sonda de detección y de anclaje) para genotipar cada variante.

Tabla C.4 – Sondas utilizadas para genotipar los polimorfismos de *GFRA1-3*

Variante	Nombre de la sonda	Secuencia
-193C>G ¹	Sensor (Ra-193[C])	Y-CCATCCCGGAGCTGAGTCGC-Ph
	Anchor (Ra-193 Anc)	GGAACCGCCTCCC GCCCTC -X
-106G>A ¹	Sensor (Ra-106 [G])	AGCTGTGCTGCTCTGGCCG -X
	Anchor (Ra-106 Anc)	Y-CCAAAGTTCAGCTCCATCCAGTGAAAGAGG-Ph
-78T>C ¹	Sensor (Ra-78 [C])	GATCGCTGCACTGCTGAGCTCC -X
	Anchor (Ra-78 Anc)	Y-TCGGCAAGACCCAGCGGGCT-Ph
537T>C ¹	Sensor (Ra1-I-4 [C])	Y-TGTCCAACGATGTCTGCAACCGC- Ph
	Anchor (Ra1-I-4 Anc)	ACATCACCCCGTGCACCACCAGC-X
IVS5+21G>A ¹	Sensor (Ra1-I-5 [G])	TTCTCCCATCTGCTTCTCTCGG- X
	Anchor (Ra1-I-5 Anc)	Y-TCTTACCAATAAGCCCCGAGTAGGCGAGG - Ph
1081A>G ¹	Sensor (Ra1-I-7 [A])	Y-CCACTGCCACTACCACCACTGC- Ph
	Anchor (Ra1-I-7 Anc)	GGCAGCCAGCCTTCCCAGTACAGAC- X
78G>T ²	Sensor (Ra2-I-2 Sens)	CCTGCAGGGCCCCGAGCT- X
	Anchor (Ra2-I-2 Anc)	Y-CACGGCTGGCGCCCCCA- Ph
IVS7+7 insGG ³	Sensor (Ra3 [GG])	GTGTAACAGAGGAGGCCCT- X
	Anchor (Ra3 ins Anc)	Y-TGGTGTGCCATCACAGCAAAGGTAGG- Ph
IVS7+39G>A ³	Sensor (Ra3 [G39])	CCCAGCCGGCCAGTAAAG -Ph
	Anchor (Ra3 39 Anc)	Z-CCTCTATCCCTTTGTCTGCCTAGTTTGGGTTT- X

¹: Variantes localizadas en *GFRA1*. ²: Variante localizada en *GFRA2*. ³: Variantes localizadas en *GFRA3*. Los nucleótidos sombreados de las sondas se corresponden a las bases complementarias a la región de la secuencia donde se localizan las variantes. "X" = fluoresceína; "Y" = LC Red640 "Z" = LC Red705. Algunas de las sondas tienen modificaciones en su extremo 3' (Ph), que impiden la extensión de la Taq polimerasa.

Para el resto de los polimorfismos estudiados, el proceso completo de PCR-FRET se lleva a cabo en el LightCycler™ a volumen final 10 µL, con 1µM de cada cebador, 25ng de ADN molde, 0.2µM de cada sonda, 1µL de tampón y 1µL de Fast Start ADN polimerasa (Roche Diagnostics). El programa de amplificación general es el siguiente: (95°-7')->[(95°-0')->(TaH°-15')->(72°-15')]xN. Las condiciones de amplificación para el análisis de cada variante vienen resumidas en la tabla C.3.

Todas las parejas de sondas de detección y anclaje (tabla C.4), fueron diseñadas por TIB-Molbiol, y suministradas por Roche Diagnostics.

Con los resultados de genotipación de los polimorfismos, se hallaron las frecuencias alélicas en cada uno de los tres grupos de estudio. Para comparar las distribuciones polimórficas y haplotípicas en HSCR *versus* controles, y en MTC *versus* controles, aplicamos el método estadístico de la χ^2 con la corrección de Yates, o el test de Fisher con dos colas.

C.2.6 Acotamiento de una delección del gen *GFRA1* en una familia HSCR

C.2.6.1 Análisis de marcadores microsatélites en *GFRA1*

Tal como se expondrá con detalle en la sección de resultados, el análisis de segregación de los polimorfismos de *GFRA1* en una de las familias HSCR, pareció en principio no encajar con el modelo de herencia mendeliana, puesto que el genotipo que presentaba el paciente índice para el polimorfismo -78T>C era incompatible con el presentado por su padre. Tras descartar una discordancia de paternidad, se llegó a la conclusión de la existencia de una delección que abarca el extremo 5' de *GFRA1*, y que presenta tanto el paciente HSCR como su padre y sus hermanos.

Con el fin de acotar la extensión de esa delección, llevamos a cabo el análisis de marcadores microsatélites en busca de pérdida de hemicigosidad. Dado que en la región de interés inicialmente no estaba descrito ningún microsatélite, realizamos la caracterización de 3 nuevos marcadores. Para llevar a cabo este análisis sometimos la secuencia disponible en la base de datos pública <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Genbank AC012470), a una búsqueda de secuencias repetitivas del tipo CG, CA, GT, GA utilizando la herramienta buscar del procesador de texto. Una vez identificadas las

posibles secuencias polimórficas se diseñaron los oligonucleótidos para la amplificación de cada uno de los posibles marcadores, utilizando el programa Prime del paquete informático GCG Wisconsin. Todos los marcadores microsatélites seleccionados en este trabajo han sido genotipados bajo las mismas condiciones de PCR: se amplifican de manera individual de manera que uno de los cebadores empleados va marcado en su extremo 5' con el fluorocromo Cy5-amidita. La PCR se realiza a volumen final 10µL, con 200µM de cada dNTP, 1µM de cada oligonucleótido, 25ng de ADN molde y 1UI de Taq ADN polimerasa (Roche Diagnostic). El programa de amplificación es idéntico para todos los marcadores: (94°-5')->[(94°-1')->(TaH°-1')->(72°-1')]x35->(72°-7'), exceptuando la temperatura de hibridación (TaH) de cada pareja de oligonucleótidos. La secuencia de estos cebadores y las condiciones de amplificación vienen recogidas en la tabla C.5. Los productos de PCR se diluyen con 50µL de agua y posteriormente se mezclan 3-5µL de esta dilución con el mismo volumen de tampón de carga (100% formamida desionizada y azul de dextrano 5mg/mL); se desnaturalizan 3 minutos a 95°C y se dejan en hielo hasta que se efectúa la carga en el gel. Hemos utilizado la matriz desnaturalizante ReproGel™ High Resolution (Amersham Biosciences) descrita en la sección de EMD. La electroforesis se realiza en placas de 15X30 y 5mm de espesor en el secuenciador automático Alf-Express fijando la carrera a 250V y 50°C. Finalmente, el tamaño de los fragmentos obtenidos se calcula utilizando el programa informático AlfWin Fragment Analyser™ 1.00 (Amersham- Biosciences) y un marcador fluorescente de tamaño (Cy5-syzer 50-500, Amersham- Biosciences).

Tabla C.5. Cebadores y condiciones de amplificación de los microsatélites de *GFRA1*

Microsatélite	Cebador 5'	Cebador 3'	TaH	pb
<i>D10S0404</i>	Cy5-ATGCCAAAACAGACTGAC	TGTACATGAAGCTTGAGAAG	51	≈120
<i>D10S0499</i>	Cy5-CTCCCTCCTAAGCTCGCC	CAAGTCTTGAATCACAGCCAC	61	≈318
<i>D10S0108</i>	Cy5-CATACGTACAAACAGGCC	AATTGCCATGGTTGCTAC	55	≈177

Para determinar la frecuencia alélica y la heterozigosidad de los tres marcadores microsatélites identificados, procedimos a la genotipación de 200 cromosomas controles.

A su vez, basándonos en los datos obtenidos de este análisis, calculamos los valores de PIC (contenido en información de un polimorfismo). Una meiosis no es informativa si el sujeto en estudio es homocigoto para el marcador empleado, y tampoco lo es en la mitad de los casos en los que el sujeto es heterocigoto y su pareja tiene el mismo genotipo heterocigoto. Dados los alelos A_1, A_2, A_3, \dots con frecuencias génicas p_1, p_2, p_3, \dots , entonces la proporción de individuos homocigotos es $p_1^2 + p_2^2 + p_3^2 + \dots$. La proporción de heterocigotos A_1A_2 es $2p_1p_2$, por lo que la proporción de parejas con ambos miembros heterocigotos A_1A_2 es $4p_1^2p_2^2$. La mitad de sus hijos serán también A_1A_2 , y por tanto no informativos. Así, el contenido en información de un polimorfismo o PIC viene dado por la fórmula

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n 2 p_i^2 p_j^2$$

Donde p_i es la frecuencia del alelo i . El segundo término de la fórmula sustrae los homocigotos, y el tercero la mitad de los apareamientos de los heterocigotos similares.

C.2.6.2 Análisis por Southern Blot

Una vez acotada la delección mediante los marcadores microsatélites, procedimos al refinamiento de la misma mediante Southern Blot, siguiendo las pautas descritas en el apartado C.2.1.10. Tras la generación del mapa de restricción de la región de interés, se seleccionó la enzima *BamHI* (Roche Diagnostics) para realizar la digestión de ADN genómico, puesto que da lugar a fragmentos de tamaño apropiado para llevar a cabo nuestro objetivo. Posteriormente, para confirmación de los resultados que íbamos obteniendo, se replicaron los experimentos utilizando las enzimas *DraIII* (Roche Diagnostics) y *NheI* (Amersham Biosciences).

A continuación se presenta la tabla C.6 con los cebadores y las condiciones de amplificación para la obtención de cada una de las sondas utilizadas. La PCR se realiza a volumen final $10\mu\text{L}$, con $200\mu\text{M}$ de cada dNTP, $1\mu\text{M}$ de cada oligonucleótido, 25ng de ADN molde y 1UI de Taq ADN polimerasa (Roche Diagnostics). El programa de

amplificación es el mismo para todas las sondas: (94°-5')->[(94°-30'')->(TaH°-30'')->(72°-40'')]x35->(72°-7'), exceptuando la temperatura de hibridación (TaH) de cada pareja de cebadores.

Tabla C.6. Cebadores y condiciones de amplificación de las sondas utilizadas para caracterizar la delección de *GFRA1*

Sonda	Cebador 5'	Cebador 3'	TaH	pb
Sonda 1	TTCAATAAGTTCCAGAGAGG	AATACTTATCCCCATGCC	57	639
Sonda 2	GCTCAGCTACTCAACTGTC	ACACAGCCAAACCATATC	51	652
Sonda 3	ATCTTCAACAAATAGAGGCTGCT	CACTGCATAGGGAGATGGGA	60	656
Sonda 4	CTCACCTGATCCAAGTGGTAGC	GTGCTTTCAATTGCCAACG	57	710
Sonda 5	TGTGCAGATAACGAAACAG	TCCTTAAATGATAGCACTCC	56	654
Sonda 6	AAAACCAGCCTGACCAAC	AGGCATGAGCTATTGCAC	57	657
Sonda 7	AAGCCTTCCATCTCACAC	ACTCTGCCTATCCCAGAAC	58	658
Sonda 8	GTAAGATTCAATATACGGGC	TGTCAACCTCAAGAAGGTC	54	644
Sonda 9	AACCTTGCTGCCAAAGAG	TGGGAACAAGAAGGAGAAC	57	651
Sonda 10	TTCCTCCATCCTTTTCCATC	TCACTGTTGCCCCAAACTC	61	683
Sonda 11	TAGGCGACAGATCAAGAC	TTAAGCAGTGGAGAGGAG	58	679

C.2.7 Rastreo mutacional del intrón 1 y región 5' del proto-oncogén *RET*

Con anterioridad al presente trabajo, la genotipación de 7 cSNPs (“Single Nucleotide Polymorphism”) de *RET*, realizada por nuestro grupo en una cohorte de pacientes HSCR esporádicos y en un grupo de controles sanos, demostró la existencia de dos variantes (A45A y L769L) estrechamente asociadas al fenotipo HSCR ($p < 0.0006$, Borrego et al., 1999). Estos hallazgos se confirmaron de manera independiente en una cohorte de origen alemán (Fitze et al., 1999). Para determinar si esas variantes conferían *per se* la predisposición a HSCR o bien existía un locus en desequilibrio de ligamiento causante de la enfermedad, se trazaron los haplotipos generados por la combinación de esos 7 cSNPs observándose la sobre-representación en HSCR de todos aquellos que incluyen A45A (haplotipos B y C, Borrego et al., 2000). El

análisis de estos datos mediante TDT (test de desequilibrio de transmisión) y LD-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, asociado a los haplotipos que contienen A45A. Por consiguiente nos planteamos como objetivo fundamental la identificación y caracterización molecular de dicho locus, realizando el rastreo del intrón 1.

Con el objetivo de identificar nuevos marcadores polimórficos dentro del intrón 1 del proto-oncogén *RET*, comenzamos el rastreo sistemático de este segmento genómico partiendo del extremo 3', y empleando las técnicas de EMD, SSCP o secuenciación bidireccional. Este rastreo fue realizado por nuestro grupo en colaboración con el grupo dirigido por la Dra Charis Eng de la Universidad de Ohio. Seleccionamos 5 controles sanos y 13 casos HSCR con diferentes haplotipos en *RET* para realizar el rastreo. Los cebadores para cada uno de los amplicones se diseñaron utilizando el comando Prime del paquete informático GCG-Wisconsin. En una primera etapa nuestro grupo analizó las dos primeras kilobases del extremo 3' del intrón por PCR-EMD. Para todos los amplicones de estas dos primeras kilobases, la PCR se realiza a volumen final 10µL, con 200µM de cada dNTP, 1µM de cada oligonucleótido, 25ng de ADN molde y 1UI de Taq ADN polimerasa (Roche Diagnostics). El programa de amplificación es el siguiente: (94°-5')->[(94°-30')->(TaH°-30')->(72°-30')]x35->(72°-7'), a excepción de la temperatura de hibridación (TaH) de cada pareja de oligonucleótidos (tabla C.7).

Tabla C.7. Cebadores y condiciones de amplificación para los fragmentos del extremo 3' del intrón 1 de *RET*

P	Cebador 5'	Cebador 3'	TaH	pb
P1	M13F-TGGAAGTTGTGGTGAGCCAAG	M13R-TGGGAAGTAGGGAAGTGAGTGAG	67	1057
P13	M13F-TGGCACAATCTCGGCTCACTAC	M13R-CTTGGCTCACCACAACCTCCAC	68	1051
P1b	M13F-ATGACTTTCCTGTAAAGTGC	M13R-GGAGTTTTTCATCTCTGTTC	54	338
P1a	M13F-AGATAAGATGCACGGACCTTAG	M13R-GCAACAGTTGCCAAAAAATG	60	596
P13b	M13F-CCAGAAGTGGGATTGGTAG	M13R-TCACCACAACCTCCACCTC	59	597
P13a	M13F-GTGCAATGGCACAATCTC	M13R-GAAAAACAAGAAGGTAGTCCC	58	552

Los fragmentos P1 y P13 se dividieron en dos fragmentos más pequeños cada uno (a y b) con el fin de obtener mejor resolución en la realización de la técnica EMD. Los fragmentos son solapantes con sus inmediatamente consecutivos, excepto en el caso de P1a y P13b, que se encuentran separados por un STR (*Short Tandem Repeat*) (TAAA)_n. Cuando se detectaba algún patrón alterado de EMD se procedía a verificar la presencia de cambio de secuencia por la técnica PCR-SSCP, o por secuenciación bidireccional directa.

El resto del intrón y región 5' de *RET* fue rastreado por el grupo de la Universidad de Ohio mediante SSCP y secuenciación bidireccional.

C.2.8 Análisis molecular de los polimorfismos localizados en el intrón 1 y la región 5' de *RET*

Cada uno de los polimorfismos encontrados en intrón 1 y región 5' de *RET* se evaluó como factor de susceptibilidad para HSCR mediante estudios de casos y controles. Además trazamos haplotipos constituidos por la combinación de las variantes encontradas. La generación de estos haplotipos fue posible gracias a la disponibilidad de la tríada completa para la mayoría de los pacientes HSCR, lo que nos permitió reconstruir y comparar los alelos transmitidos *versus* los alelos no transmitidos. Basándonos en la observación del completo desequilibrio de ligamiento de una parte importante de las variantes estudiadas, y de la existencia de sólo unas pocas combinaciones de las mismas, fue posible inferir los haplotipos para los controles. Procedimos a comparar la distribución haplotípica entre casos y controles. Además, examinamos los haplotipos parentales en el contexto de los haplotipos de los pacientes afectados, de forma que se compararon las frecuencias de los haplotipos transmitidos y no transmitidos.

Igualmente, dado que *RET* es sin lugar a dudas el principal gen de susceptibilidad para MTC, también se analizó la posible implicación de esas variantes en MTC por estudios de casos y controles.

C.2.8.1 Análisis de las variantes localizadas en el extremo 3' del intrón 1

Una de las variantes identificadas en el rastreo del intrón 1 de *RET* es IVS1-126G>T, localizada en el anteriormente mencionado fragmento P1b. Para genotipar esta variante se utilizaron dos técnicas. En principio, el patrón SSCP alterado del fragmento P1b en presencia de la variante era tan evidente, que se utilizó esta técnica como método de genotipación. Dado que P1b tiene 338 pb, tamaño superior al óptimo requerido para un análisis por SSCP, los productos de PCR ya reamplificados se sometieron a una digestión con la endonucleasa *MspI* (Roche Diagnostics), generándose consiguientemente dos fragmentos de 160 y 178 pb. La digestión se efectúa a volumen final 20µL, utilizando el producto total reamplificado, 2µL de tampón, 2µL de BSA (1mg/mL), y 10 UI de enzima *MspI*. Tras la electroforesis en gel al 10% de glicerol siguiendo las pautas descritas en el apartado C.2.1.6, se realiza el análisis de resultados. La presencia de la variante T origina un patrón de migración del fragmento de 178 pb diferente al correspondiente para la variante G, y en virtud de ésto se pudo realizar la genotipación de este polimorfismo.

Posteriormente confirmamos los resultados obtenidos mediante PCR-RFLP empleando la enzima *NlaIII* (New England Biolabs), puesto que esta restrictasa pierde un punto de corte en presencia del polimorfismo. De esta manera, mientras que el patrón en un individuo con genotipo TT es de tres bandas de 27, 55 y 256pb, en un individuo con genotipo GG la banda de 256pb es reemplazada por dos bandas de 205 y 51 pb. En este caso la digestión se realiza a volumen final 20µL, utilizando todo el producto de PCR, 2µL de tampón, 0.2µL de BSA 100X (New England Biolabs) y 3UI de enzima *NlaIII*. El producto así digerido durante 3 horas a 37°C, se somete a electroforesis fijando el voltaje a 90v en gel de agarosa al 2% durante 1 hora. Como marcador de peso molecular se utiliza el Marker V (Roche Diagnostics). Transcurrida la electroforesis el gel se visualiza en el transiluminador UV para poder analizar el patrón de bandas para cada individuo.

Para la genotipación de las variantes IVS1-1370C>T e IVS1-1463T>C empleamos el método de PCR-FRET tal como se explica en el apartado C.2.1.9. Las condiciones de amplificación son las mismas para las dos variantes, puesto que ambas

se encuentran dentro del mismo amplicón, concretamente el fragmento P13b anteriormente mencionado. La reacción se realiza a volumen final 10µL, con 1µM de cada cebador (tabla C.8), 25ng de ADN molde, 0.2µM de cada sonda, 1µL de tampón y 1µL de Fast Start polimerasa (Roche Diagnostics). El programa de amplificación es el siguiente: (95°-7'')->[(95°-0'')->(66°-15'')->(72°-25'')]x50. Las condiciones de FRET para llevar a cabo la genotipación de cada variante una vez finalizada la PCR se especifican a continuación. Las parejas de sondas de detección y anclaje, han sido diseñadas por TIB-Molbiol, y suministradas por Roche Diagnostics. Sus secuencias vienen recogidas en la siguiente tabla.

Tabla C.8 – Sondas utilizadas para genotipar IVS1-1370C>T e IVS1-1463T>C.

Variante	Nombre de la sonda	Secuencia
IVS1-1370C>T	212 C/T anc	LC Red640-GCTCACTCAGCCACAGCCGAGGC -Ph
	212 [C]	TGCACCGT ^T GCCCCTGCTTG -X
IVS1-1463T>C	120 T/C anc	TTTTTGGA ^A ACTACCTTCTTGTTTTTCAT -X
	120 [C] sen	LC Red640-ACTGTATATTATTTTCCA ^C TCACCGA-Ph

Los nucleótidos sombreados de las sondas se corresponden a las bases complementarias a la región de la secuencia donde se localizan las variantes. Algunas de las sondas tienen modificaciones en su extremo 3' (Ph), que impiden la extensión de la Taq polimerasa. "X" = fluoresceína.

C.2.8.2 Análisis del resto de polimorfismos intrónicos y de las dos variantes de la región 5' de RET

La genotipación de las variantes encontradas a lo largo del resto del intrón 1 y la región 5' por el grupo de la Universidad de Ohio, fue realizada en colaboración de los dos grupos. En concreto nuestro grupo genotipó un total de 12 polimorfismos distribuidos entre las posiciones +6136 y +11637 del intrón, y 2 variantes situadas a –196 y –200 pares de bases con respecto al ATG inicial. El método utilizado fue el de PCR realizada en el termociclador PTC-100TM (MJ Research, Inc.), seguida de FRET en el LightCyclerTM (Tablas C.9 y C.10).

Tabla C.9 – Cebadores y condiciones de PCR para la genotipación de polimorfismos del intrón 1 de *RET* y de la región 5'.

Variante	Cebador 5'	Cebador 3'	TaH	pb
-200A>G -196C>A	GGGCTAGCCCCGCACTGAGCT CCTACAC	CCCTCGAGCTGGAGGGACTGCG GCTA	53	
IVS1+6136T>G				
IVS1+6174A>G	CTTGAAAACCTCGTGACCC	CCTAGAGGAACCCTGAAGAC	58	800
IVS1+6383-84CC>GG				
IVS1+6411A>G				
IVS1+7236A>G	CTGTTGTCTGGCTTCACTC	CCCTTCTTATGCACAAGC	61	804
IVS1+7436G>A				
IVS1+9202C>T				
IVS1+9277T>C	TGCTGCCTCATTTCCTCC	TCCTGACACCCCTAAAAGCC	61	841
IVS1+9494A>C				
IVS1+11260A>T				
IVS1+11369C>T	TCATGATGGTGAAGGTGGGG	GGGAAGTCATCACACGCTTCTG	65	893
IVS1+11637C>T				

Los 12 polimorfismos intrónicos se incluyen dentro de 4 amplicones diferentes, que se obtienen por PCR a volumen final 50µL, con 1 µM de cada cebador (tabla C.9), 250 ng de ADN molde, y 2UI de Taq ADN polimerasa (Roche Diagnostics). El programa de amplificación es: (94°-5')->[(94°-30')->(TaH°-45')->(72°-30')]x30->(72°-7'). En cuanto a las variantes -200A>G y -196C>A, ambas se incluyen dentro del mismo amplicón, que se obtiene por PCR a volumen final 20µL, con 1 µM de cada cebador, 25 ng de ADN molde, 10 µL HotStart Taq Master Mix, y 4 µL de solución Q (Qiagen). El programa de amplificación es el siguiente: (94°-15')->[(94°-40')->(53°-45')->(72°-1')]x35->(72°-10'). Las parejas de sondas para la detección de cada polimorfismo fueron diseñadas por TIB MolBiol y suministradas por Roche Diagnostics. Las secuencias de dichas sondas se exponen en la tabla C.10.

Tabla C.10 – Sondas utilizadas para genotipar las variantes del intrón 1 de *RET* y de la región 5'.

Variante	Nombre de la sonda	Secuencia
-200 A>G y -196C>A	Sensor AC	CGCTT A CCT C GCTTCAGTCCC X
	Anchor	LC Red640-CGACCGAAGCAGGGCGCGCAGC Ph
IVS1+6136T>G	Sensor [G]705	LC Red705-CACAC C GGGCTGGGAGG
	FL-Anchor-FI	X-GCCCTCCTGTGCACATAGCCAG X
IVS1+6174A>G	Sensor [G]640	CTCAGGCTTCT C GAAGCTCTG-LC Red640
	FL-Anchor-FI	X-GCCCTCCTGTGCACATAGCCAG X
IVS1+6383-84CC>GG	Sensor[GG]	CCGCCA CC AGCCCCTGCTA X
	Anchor GG	LC Red640-GGACCAGGACAAGGGATGGAGAGCTG
IVS1+6411A>G	Sensor [G]	CTACCCTGTTTCCCCCTC C GTG X
	Anchor 705	LC Red705-CCCTCAGCTGCTGGGCCCCG
IVS1+7236A>G	Anchor	CCCTCTGCCTGTTGTCTAACTAGATGGC X
	Sensor [A]	LC Red640-GTCTTGCC A ATACAGCTGACTTTGC
IVS1+7436G>A	Sensor [A]	TGAGGCCAC A TTGAGCACC X
	Anchor	LC Red640-CATCTGGAAACCATGGTGTCACTGC
IVS1+9202C>T	Sensor[C]	CAGGC C AGGGCCAGTGA X
	Anchor	LC Red640-CAATGTAATCAGCTGGGGCAGACTCT
IVS1+9277T>C	Anchor	CCTGCAGCCAAGGGGGCCAGTG X
	Sensor [C]	LC Red640-CCCTTACA C GGTCATCCACAG
IVS1+9494A>C	Sensor [A]	GCCACCACCCACAC T TCCAT X
	Anchor	LC Red640-CCCAGACCAGCTGCAGCGGCC
IVS1+11260A>T	Sensor [T]	CCAGCCACTG T TTCGTGAAC X
	Anchor	LC Red640-CATGTGCATTAATTCCTTCTAGCTCCCA
IVS1+11369C>T	Sensor [C]	GATACAAATATATGT C CCTTGCTCCA X
	Anchor	LCRed640-CTCATTACCACTGCAACACACACTTTCTC
IVS1+11637C>T	Sensor [C]	CGTCCTG C GGGCACTG X
	Anchor	LC Red640-CTCCTGCTTGTGGCTGCAGCCCAG

Las bases sombreadas son las que hibridan con la región de la secuencia donde se localizan las variantes.

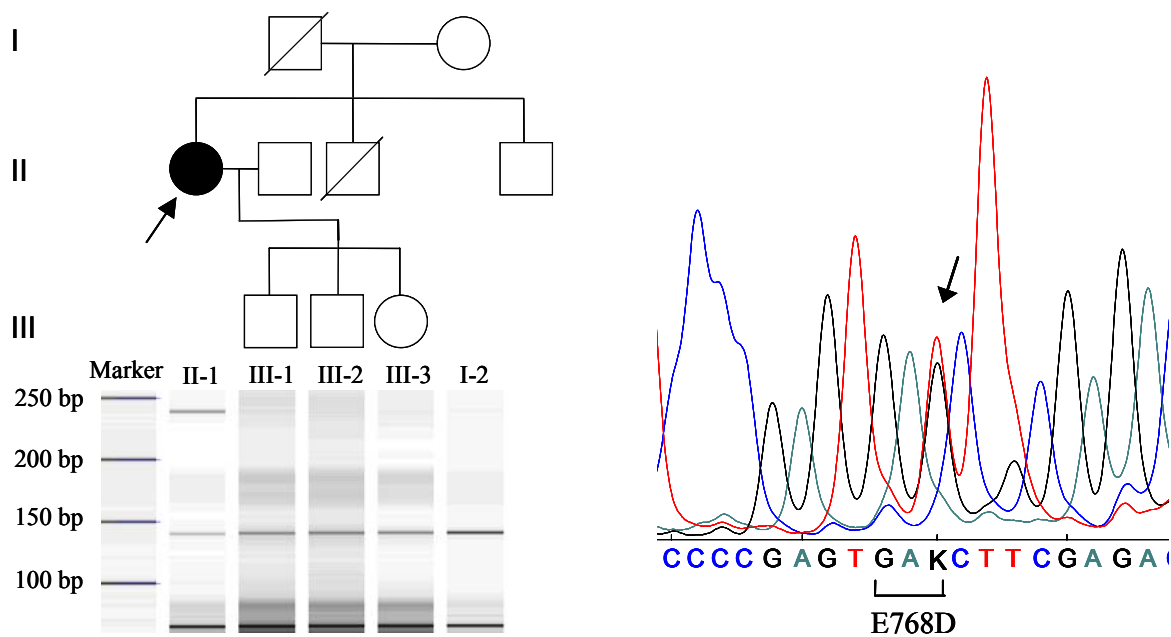
Dada la proximidad entre las variantes $-200 A>G$ y $-196C>A$, ambas se pueden detectar mediante la utilización de una única pareja de sondas. Por otra parte, debido a la cercanía de $IVS1+6136 T>G$ e $IVS1+6174 A>G$, se optó por la utilización de una misma sonda central de anclaje para la genotipación de ambas (sonda FL-Anchor-FI), pero diferentes sondas de detección. La particularidad de esta sonda está en que se encuentra marcada con fluoresceína en sus dos extremos, para permitir que se dé el fenómeno FRET con cada una de las correspondientes sondas de detección.

D. RESULTADOS

D.1. Identificación de una nueva mutación en el proto-oncogén *RET* asociada al cáncer medular de tiroides familiar (FMTC).

Nuestro grupo realiza como práctica de rutina el análisis molecular de los exones 10, 11, 13, 14, 15 y 16 del proto-oncogén *RET* en todos aquellos pacientes que presentan cáncer medular de tiroides con el fin de identificar casos ocultos de formas familiares del síndrome MEN 2. En uno de estos análisis, hemos identificado una nueva mutación germinal localizada en el codón 768 del exón 13. La paciente índice era una mujer de 57 años de edad sin historia familiar previa de MTC así como ningún rasgo clínico relacionado con el síndrome MEN 2.

Figura D.1. Árbol familiar de la paciente que porta la mutación E768D.



A. Análisis de segregación de la variante nt 2304 G->T en los familiares de la paciente índice.

B. Análisis de la secuencia del exón 13 del proto-oncogén *RET* demostrando la presencia de la mutación GAG->GAT en el codón 768 del individuo II-1.

La paciente presentaba un nódulo tiroideo, junto con niveles basales de calcitonina elevados (121 ng/L, siendo los valores normales de 10 ng/mL), así como niveles de calcitonina elevados tras estimulación con pentagastrina (1114 ng/L, 5

minutos después de la administración de la pentagastrina). Fue intervenida quirúrgicamente y tras el examen histológico se confirmó la presencia de MTC bilateral con hiperplasia de células C, sin metástasis a los nódulos linfáticos cervicales. Se descartó hiperparatiroidismo y feocromocitoma.

La nueva mutación germinal (c.2304G>T) es una transversión en la última posición del codón 768, que genera un cambio aminoacídico de glutámico a aspártico. Esta nueva mutación genera el mismo patrón de restricción *AluI* que otra mutación previamente descrita en esta posición, c.2304G>C y conduce a la misma alteración a nivel proteico. Una vez que esta mutación fue caracterizada por secuenciación directa bidireccional, procedimos al análisis de segregación de la variante en los familiares disponibles de la paciente índice (Figura D.1). Como resultado encontramos que ninguno de los otros miembros de la familia portaban el cambio. Este análisis de segregación nos permitió excluir la posibilidad de que la paciente hubiera heredado la mutación por vía materna. Por consiguiente, esta mutación podría haber sido heredada por la rama paterna, o bien ser una mutación de novo. Dado que no disponíamos del ADN germinal del padre de la paciente, no nos ha sido posible distinguir entre ambos mecanismos mutacionales. Con el fin de descartar que c.2304G>T fuera un polimorfismo común en nuestra población, estudiamos la presencia del cambio de secuencia en 75 controles sanos (150 cromosomas). La mutación no se encontró en ninguno de los 150 cromosomas control testados.

D.2. Estudio de asociación de la variante S836S (c.2439C>T) del proto-oncogén *RET* al cáncer medular de tiroides esporádico.

Con el fin de comprobar si la asociación de S836S a MTC esporádico previamente observada en una cohorte de origen alemán, se verificaba también en la población española, nuestro grupo analizó por PCR-RFLP la presencia de dicha variante en un total de 32 pacientes con MTC esporádico y 250 controles sanos. Los datos revelaron que la frecuencia del alelo polimórfico en la población control (18/500 cromosomas, 3.6%) era similar a la de otras poblaciones de diferente origen geográfico (Fitze y cols, 1999; Gimm y cols, 1999). Además, la distribución genotípica observada en la población española no se desviaba significativamente de las frecuencias teóricas

derivadas de la aplicación de la ley de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0.0$, $p=0.94$). En cuanto al grupo de pacientes, se detectó el polimorfismo en 6 de los 64 cromosomas, lo que corresponde a una frecuencia alélica del 9.3%.

Con objeto de realizar un análisis comparativo de la distribución alélica de esta variante entre el grupo de casos y el grupo control, se aplicó el test exacto de Fisher con dos colas, obteniéndose un valor de $p=0.043$. Además se obtuvo un valor de $p=0.04$ cuando se comparó la distribución genotípica entre los dos grupos de estudio.

Observamos por consiguiente una sobre-representación estadísticamente significativa del polimorfismo S836S en el grupo de pacientes con MTC esporádico con respecto al grupo control ($p<0.05$).

D.3. Evaluación de *GFRA4* como gen de susceptibilidad para HSCR.

Dado que el gen *GFRA4* no había sido previamente evaluado como gen de susceptibilidad para HSCR, nuestro grupo en colaboración con el grupo de la Universidad de Ohio dirigido por la Dra Eng, decidió examinar su secuencia codificante así como todas sus uniones intrón-exón. Tras el rastreo sistemático del gen, no se encontró ninguna mutación germinal en *GFRA4* en los 72 casos esporádicos HSCR analizados.

Sin embargo fue posible caracterizar cuatro variantes de secuencia polimórficas en este gen: c.102G>A (T34T, exón 2), c.711G>A (P237P, exón 5), c.847C>T y c.867G>A (3'UTR). Procedimos entonces a realizar un estudio de casos y controles para evaluar esos cambios de secuencia como posibles factores de susceptibilidad para la enfermedad de HSCR. Así pues, genotipamos los 4 polimorfismos en un total de 115 individuos control, y comparamos la distribución alélica y haplotípica entre este grupo y la cohorte HSCR, mediante el test de χ^2 con la corrección de Yates. Las diferencias en la distribución de las variantes entre el grupo de pacientes y el de controles no fueron estadísticamente significativas ($p>0.05$), lo que parece descartar la implicación de estas variantes en la patogénesis de la enfermedad.

D.4. Evaluación de variantes de secuencia de los genes *GFRA1*, *GFRA2* y *GFRA3* como factores de susceptibilidad para HSCR esporádico.

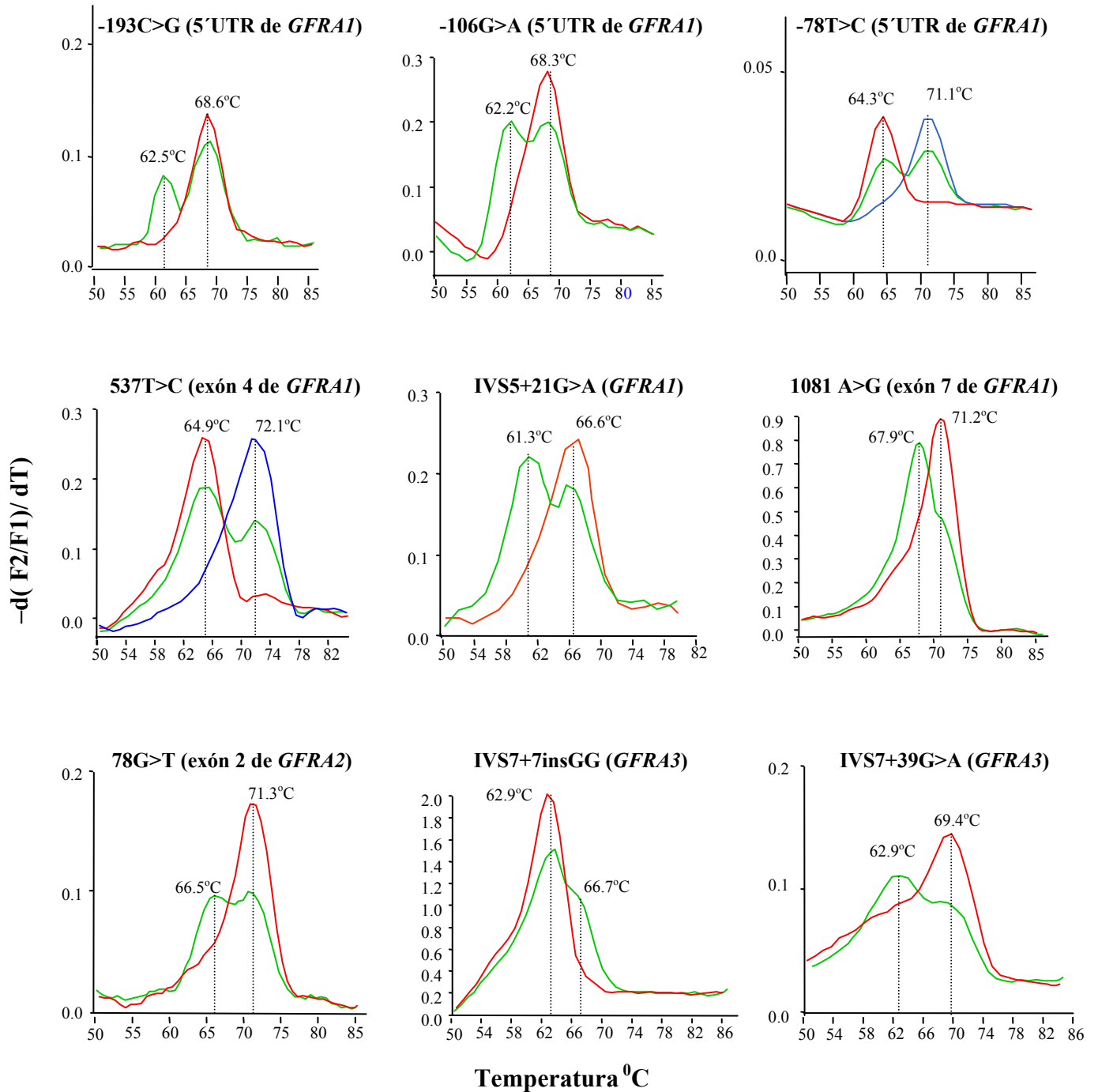
Hemos analizado 9 polimorfismos distribuidos por los genes *GFRA1*, *GFRA2* y *GFRA3* en 72 pacientes HSCR esporádicos y 115 controles (casos:controles=1:2), con el fin de estudiar su posible asociación a la aparición del fenotipo HSCR. Para ello, hemos diseñado un método sencillo y rápido basado en la tecnología FRET y el sistema LightCycler™ (Roche Diagnostics), que permite detectar la presencia de los polimorfismos con alta fiabilidad y reproducibilidad. Para cada variante, el análisis de la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura, muestra diferentes valores de temperatura de fusión (T_m) para los amplicones con la secuencia silvestre, y para los productos con los polimorfismos. Nuestros resultados demuestran que los experimentos diseñados detectan todas las variantes de secuencia en estudio, con una T_m específica para cada variante. En la Figura D.2 se presentan cada uno de los patrones FRET generados en la genotipación de cada polimorfismo. Así, se puede observar que el patrón FRET para los individuos homocigotos muestra un solo pico, mientras que para los individuos heterocigotos se distinguen dos picos correspondientes a cada alelo.

Una vez completado el proceso de genotipación, procedimos a calcular las frecuencias polimórficas en el grupo de pacientes HSCR y en el grupo control, observándose valores muy similares en ambos. En las Tablas D.1 y D.2 se resumen los datos crudos resultantes de la genotipación así como los datos de frecuencia para cada variante.

Tras la aplicación del test de χ^2 con la corrección de Yates o del test de Fisher con dos colas, nuestros resultados muestran que no existen diferencias significativas en la distribución alélica de las variantes estudiadas entre el grupo de pacientes HSCR y el grupo control. Los resultados de dichos tests pueden verse en la Tabla D.3.

Dado que se dispone del ADN de los padres de una parte importante de los pacientes HSCR, se procedió a la genotipación de los 9 polimorfismos en dichos padres con el fin de poder realizar análisis de segregación y construir así haplotipos.

Figura D.2. Patrones FRET generados en presencia de las variantes polimórficas de los genes *GFRA1-3*.



— Individuos homocigotos para el alelo silvestre
— Individuos heterocigotos
— Individuos homocigotos para el alelo polimórfico

Tabla D.1. Distribución genotípica observada para los loci polimórficos de *GFRA1-3* en la cohorte HSCR y en el grupo control.

HSCR	<i>GFRA1</i>						<i>GFRA2</i> 78G>T	<i>GFRA3</i>	
	-193C>G	-106G>A	-78T>C	537T>C	IVS5+21 G>A	1081 A>G		IVS7+7ins GG	IVS7+39 G>A
-/-	69	60	33	18	58	61	71	69	65
+/-	3	12	34	35	14	11	1	3	7
+/+	0	0	5	19	0	0	0	0	0
Total	72	72	72	72	72	72	72	72	72

Control	<i>GFRA1</i>						<i>GFRA2</i> 78G>T	<i>GFRA3</i>	
	-193C>G	-106G>A	-78T>C	537T>C	IVS5+21 G>A	1081 A>G		IVS7+7ins GG	IVS7+39 G>A
-/-	111	95	43	37	93	93	111	115	104
+/-	4	18	55	42	21	22	4	0	11
+/+	0	2	17	36	1	0	0	0	0
Total	115	115	115	115	115	115	115	115	115

-/-: Individuos homocigotos para el alelo silvestre; +/-: Individuos heterocigotos; +/+: Individuos homocigotos para el alelo polimórfico

Tabla D.2. Frecuencia de los polimorfismos de *GFRA1-3* en la cohorte HSCR y en el grupo control

Gen	Polimorfismos	Pacientes HSCR	Controles
<i>GFRA1</i>	-193C>G	0.02	0.02
	-106G>A	0.08	0.09
	-78T>C	0.31	0.39
	537T>C	0.51	0.50
	IVS5+21 G>A	0.10	0.10
	1081 A>G	0.08	0.10
	<i>GFRA2</i>	78G>T	0.01
<i>GFRA3</i>	IVS7+7insGG	0.02	0.00
	IVS7+39G>A	0.05	0.05

Tabla D.3. Análisis estadístico comparativo de la distribución de los polimorfismos de *GFRA1-3* en la cohorte HSCR y en el grupo control.

Variantes	Alelos	HSCR	Controles	p
-193C>G (<i>GFRA1</i>)	G C	3 141	4 226	Test exacto de Fisher con dos colas: p= 1.00
-106G>A (<i>GFRA1</i>)	A G	12 132	22 208	χ^2 con la corrección de Yates = 0.05, p= 0.83
-78T>C (<i>GFRA1</i>)	C T	44 100	89 141	χ^2 con la corrección de Yates =2.22, p= 0.14
537T>C (<i>GFRA1</i>)	C T	73 71	114 116	χ^2 con la corrección de Yates = 0.01, p= 0.92
IVS5+21G>A (<i>GFRA1</i>)	A G	14 130	23 207	χ^2 con la corrección de Yates = 0.01, p= 0.93
1081 A>G (<i>GFRA1</i>)	G A	11 133	22 208	χ^2 con la corrección de Yates = 0.2, p= 0.65
78G>T (<i>GFRA2</i>)	T G	1 143	4 226	Test exacto de Fisher con dos colas: p= 0.65
IVS7+7insGG (<i>GFRA3</i>)	insGG -	3 141	0 230	Test exacto de Fisher con dos colas: p= 0.06
IVS7+39G>A (<i>GFRA3</i>)	A G	7 137	11 219	χ^2 con la corrección de Yates = 0.05, p= 0.83

Se observaron 21 haplotipos distintos presentes en las triadas HSCR en estudio, resultantes de la combinación de los 6 polimorfismos analizados en *GFRA1* (Tabla D.4). Dicho análisis también permitió observar que -106G>A se encuentra en desequilibrio de ligamiento con -78T>C, puesto que siempre que aparece la primera variante, la segunda también está presente en el mismo alelo. Con respecto a *GFRA3* se pudieron observar tres haplotipos generados por combinación de las dos variantes analizadas (Tabla D.5).

Gracias al análisis de segregación fue posible realizar el trazado de haplotipos de *GFRA1* en 63 de los 72 casos HSCR. Con respecto a los 115 controles, basándonos en las combinaciones de polimorfismos observadas en la cohorte HSCR, se pudieron inferir los haplotipos en 77 de ellos.

Tabla D.4. Haplotipos de *GFRA1* constituidos por combinación de las 6 variantes analizadas.

Haplotipo	-193 C>G	-106 G>A	-78 T>C	537 T>C	IVS5+21G>A	1081 A>G
Ø						
A	+					
B		+	+			
C			+			
D				+		
E					+	
F						+
G	+			+		
H		+	+	+		
I		+	+		+	
J		+	+			+
K			+	+		
L			+			+
M				+	+	
N				+		+
O					+	+
P			+	+	+	
Q				+	+	+
R			+	+	+	+
S		+	+	+	+	+
T			+		+	

Tabla D.5. Haplotipos de *GFRA3* constituidos por combinación de las 2 variantes analizadas.

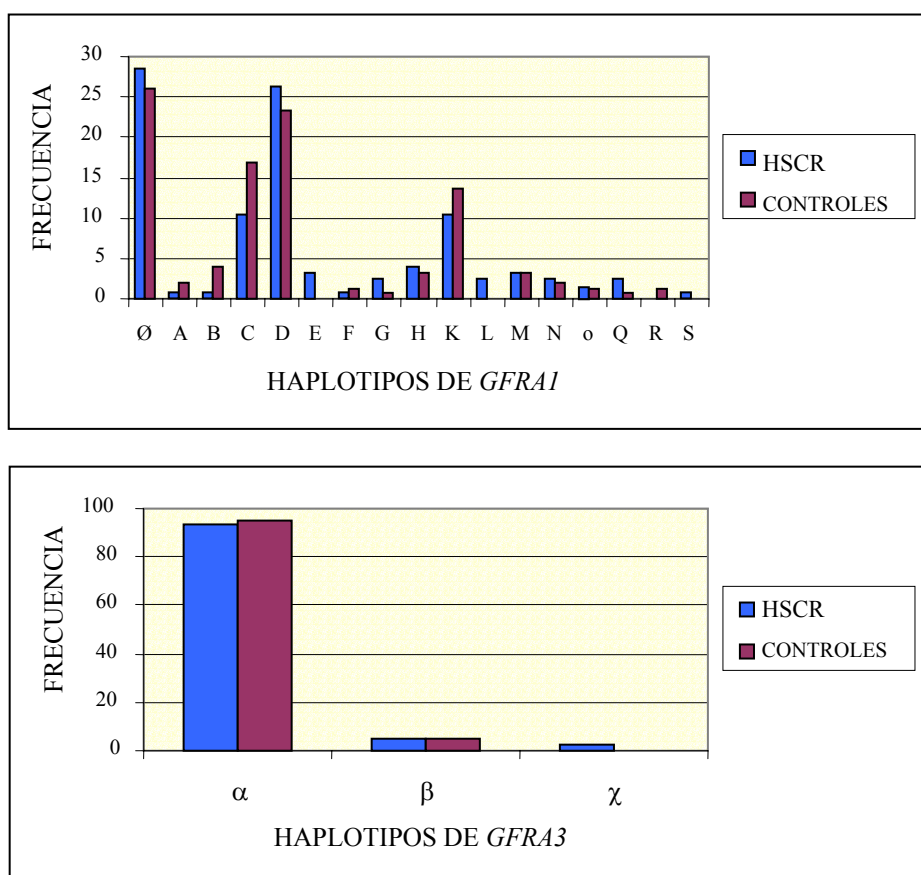
Haplotipo	IVS7+7insGG	IVS7+39G>A
α		
β		+
χ	+	

El signo + indica presencia de la variante en el locus.

Con el fin de analizar si existían diferencias en la distribución haplotípica entre la serie HSCR y el grupo control aplicamos el test χ^2 con la corrección de Yates, pero no se encontró significación estadística ($\chi^2 = 4.2$, $p=0.7$).

De forma análoga se procedió con los haplotipos de *GFRA3*, lográndose trazar éstos en la totalidad de la cohorte estudiada, e inferir en todos los controles incluidos. Al igual que en el caso anterior no se encontraron diferencias significativas en la distribución haplotípica en casos y controles ($\chi^2 = 4.8$, $p=0.1$).

Figura D.3. Distribución de los haplotipos de *GFRA1* y *GFRA3* en la cohorte HSCR y en el grupo control.



D.5. Identificación de una deleción dentro del gen *GFRA1* en una familia HSCR.

Durante el proceso de genotipación encontramos que para una familia HSCR, los haplotipos de *GFRA1* de los padres y del probando no eran compatibles con un patrón de herencia mendeliana. Más concretamente, la genotipación de la variante $-78T>C$, localizada en el extremo 5'UTR de *GFRA1*, mostraba resultados discordantes en el

paciente y su padre (Figura D.4). Excluimos la posibilidad de discordancia de paternidad gracias a la genotipación de 10 marcadores microsatélites distribuidos por todo el genoma. Por consiguiente procedimos a realizar un análisis más profundo de esta familia, y los resultados revelaron la presencia de una gran deleción que se extendía desde el intrón 3 hasta el extremo 5'UTR de *GFRA1* (Figura D.5).

Figura D.4. Análisis por FRET de la variante $-78T>C$ de *GFRA1* en los miembros de la familia HSCR 5.

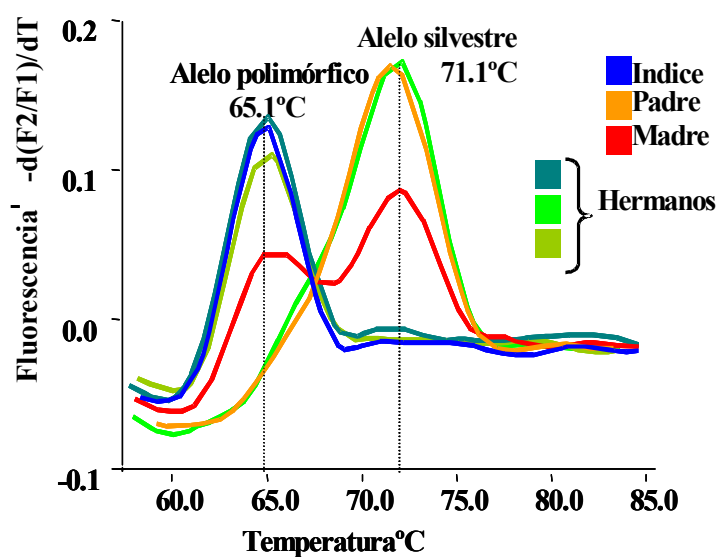
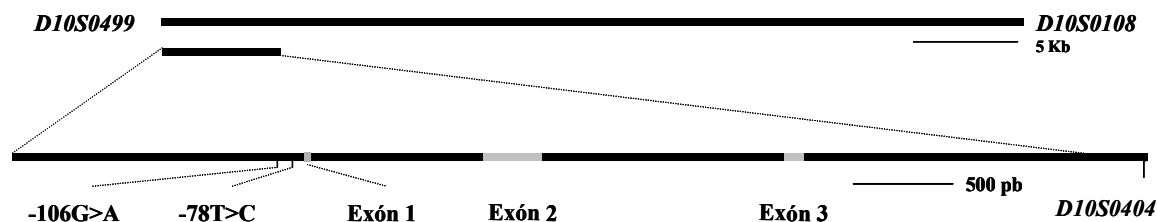


Figura D.5. Representación esquemática del extremo 5' del gen *GFRA1*.



El refinamiento de la región delecionada en *GFRA1* en esta familia, se llevó a cabo mediante la genotipación de tres nuevos STRs informativos (*D10S0499*, *D10S0404* y *D10S0108*) así como por Southern blot (Figuras D.6 y D.7). De manera

sorprendente, el análisis del padre así como de sus tres hermanos sanos, indicó la presencia de esta delección (Figura D.8). La delección se encuentra acotada en su extremo 3' por el microsatélite *D10S0108*, que se localiza a una distancia alrededor de 39 Kb de la unión exón 3-intrón 3 (Figura D.5).

Además, se llevó a cabo un rastreo de mutaciones en los genes *RET*, *GDNF*, *NTN*, *GFRA2*, *GFRA3*, *GFRA4*, y *EDNRB* en el paciente índice, con el fin de encontrar alguna mutación que justificase por qué el resto de los familiares portadores del mismo rearreglo, eran individuos sanos. Sin embargo no se encontraron cambios de secuencia significativos en ninguno de estos genes.

Figura D.6. Análisis de los marcadores microsatélites *D10S0499*, *D10S0404* y *D10S0108* en la familia HSCR 5.

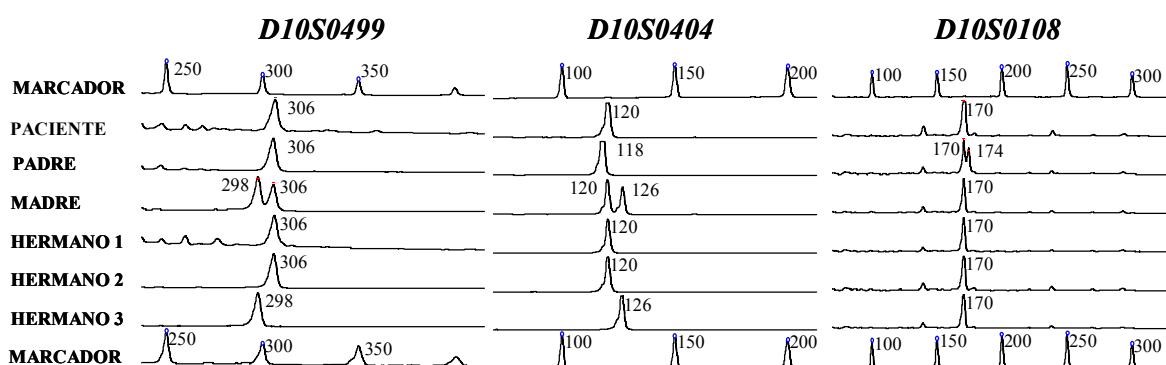
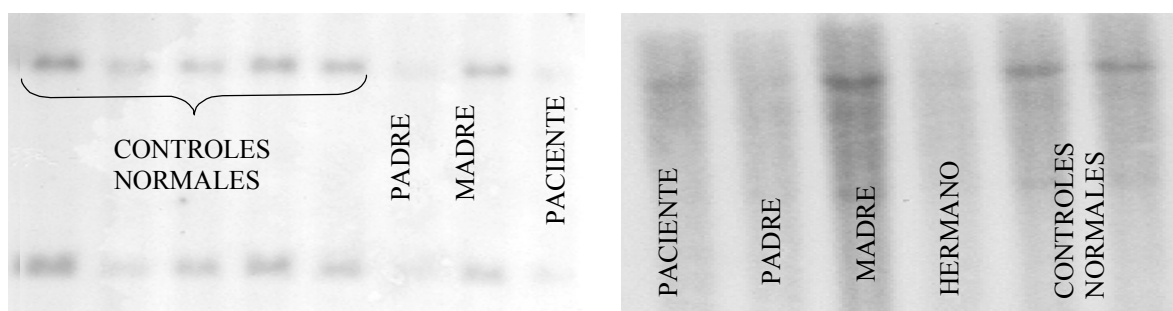
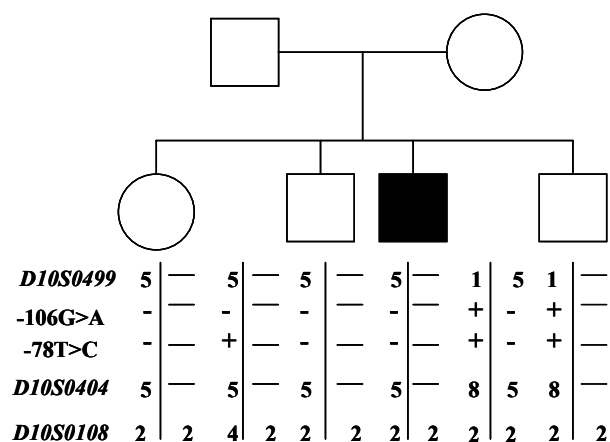


Figura D.7. Acotamiento de la delección de *GFRA1* por Southern Blot.



Southern Blot tras digestión del ADN genómico con la enzima *BamHI* (izquierda). Se observa un patrón diferencial entre los individuos portadores del rearreglo (paciente y su padre), y los individuos normales, ya que en los primeros hay una menor en la intensidad de las bandas, que es indicativa de hemigocidad. Dicha hemidosis vuelve a comprobarse al utilizar la enzima *DraIII* para la digestión del ADN (derecha).

Figura D.8. Análisis de segregación de los marcadores de *GFRA1* en la familia HSCR.

D.6. Evaluación de variantes de secuencia de los genes *GFRA1*, *GFRA2* y *GFRA3* como factores de susceptibilidad para MTC esporádico.

Utilizando la misma tecnología descrita en el apartado D.5, hemos analizado los polimorfismos de *GFRA1*, *GFRA2* y *GFRA3* en 51 pacientes MTC esporádicos y hemos comparado su frecuencia y distribución con las del grupo de controles. En las siguientes tablas se resumen los datos crudos resultantes de la genotipación así como los datos de frecuencia para cada variante en la serie de casos.

Tabla D.6. Distribución genotípica observada para los loci polimórficos de *GFRA1-3* en la cohorte de pacientes MTC esporádicos.

Pacientes	<i>GFRA1</i>						<i>GFRA2</i>	<i>GFRA3</i>	
	-193C>G	-106G>A	-78T>C	537T>C	IVS5+21 G>A	1081 A>G	78G>T	IVS7+7ins GG	IVS7+39 G>A
-/-	46	42	19	15	41	39	51	50	40
+/-	5	9	20	25	9	11	0	0	11
+/+	0	0	12	11	1	1	0	1	0
Total	51	51	51	51	51	51	51	51	51

-/-: Individuos homocigotos para el alelo silvestre; +/-: Individuos heterocigotos; +/+ : Individuos homocigotos para el alelo polimórfico

Tabla D.7. Frecuencia (%) de los polimorfismos de *GFRA1-3* en MTC esporádicos y en controles.

Gen	Polimorfismo	MTC esporádicos	Controles
<i>GFRA1</i>	-193C>G	5	2
	-106G>A	9	9
	-78T>C	43	38
	537T>C	46	47
	IVS5+21 G>A	11	14
	1081 A>G	13	11
<i>GFRA2</i>	78G>T	2	3
<i>GFRA3</i>	IVS7+7insGG	0	0
	IVS7+39G>A	11	6

Tabla D.8. Análisis estadístico comparativo de la distribución de los polimorfismos de *GFRA1-3* en la serie de casos MTC esporádicos y en el grupo control.

Variantes	Alelos	MTC	Controles	p
- 193C>G (<i>GFRA1</i>)	G	5	3	Test exacto de Fisher con dos colas: p= 0.12
	C	97	197	
-106G>A (<i>GFRA1</i>)	A	9	17	χ^2 con la corrección de Yates = 0.01, p= 0.90
	G	93	183	
-78T>C (<i>GFRA1</i>)	C	44	76	χ^2 con la corrección de Yates =0.55, p= 0.46
	T	58	124	
537T>C (<i>GFRA1</i>)	C	47	93	χ^2 con la corrección de Yates = 0.00, p= 0.96
	T	55	107	
IVS5+21G>A (<i>GFRA1</i>)	A	11	28	χ^2 con la corrección de Yates = 0.37, p= 0.54
	G	91	172	
1081 A>G (<i>GFRA1</i>)	G	13	23	χ^2 con la corrección de Yates = 0.02, p= 0.88
	A	99	177	
78G>T (<i>GFRA2</i>)	T	2	7	Test exacto de Fisher con dos colas: p= 0.72
	G	100	193	
IVS7+39G>A (<i>GFRA3</i>)	A	11	11	χ^2 con la corrección de Yates = 2.07, p= 0.15
	G	91	189	

Es interesante mencionar que observamos una mayor frecuencia de las variantes $-193C>G$ de *GFRA1* y $IVS7+39G>A$ de *GFRA3* en los pacientes que en los controles (5% vs. 2% y 11% vs. 6% respectivamente). También observamos que la variante $IVS7+7insGG$ de *GFRA3* no se detectó en ningún paciente MTC esporádico ni en ningún control. En cualquier caso, las diferencias en la distribución alélica en estos loci entre pacientes y controles no fueron estadísticamente significativas, al igual que para el resto de los loci estudiados (Tabla D.8).

Basándonos en las combinaciones de polimorfismos observadas en la cohorte HSCR, se pudieron inferir los haplotipos de *GFRA1* en 30 de los pacientes. De nuevo, para analizar si existían diferencias en la distribución haplotípica entre la serie MTC esporádica y el grupo control aplicamos el test χ^2 con la corrección de Yates, pero no se encontró significación estadística ($\chi^2 = 4.52$, $p = 0.6$).

Con respecto a los haplotipos de *GFRA3*, se pudieron inferir para todos los pacientes y controles incluidos. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución haplotípica de ambos grupos ($\chi^2 = 3.39$, $p = 0.1$).

Figura D.9A. Distribución de los haplotipos de *GFRA1* en la cohorte de pacientes MTC esporádicos y en el grupo control.

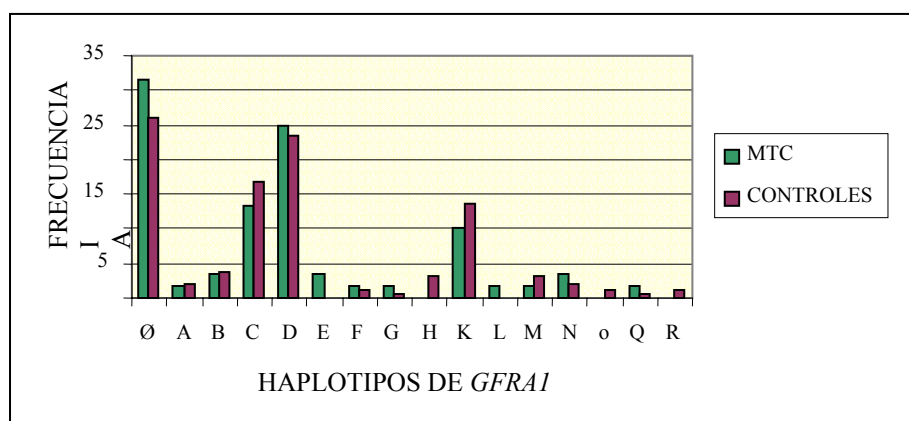
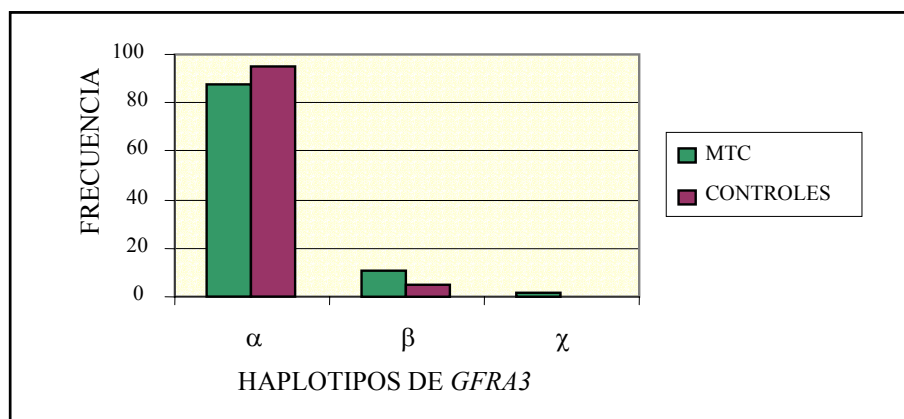


Figura D.9B. Distribución de los haplotipos de *GFRA3* en la cohorte de pacientes MTC esporádicos y en el grupo control.



D.7. Identificación de loci de susceptibilidad en el intrón 1 de *RET* para HSCR y para MTC.

D.7.1. Caracterización molecular del intrón 1 de *RET* mediante herramientas bioinformáticas.

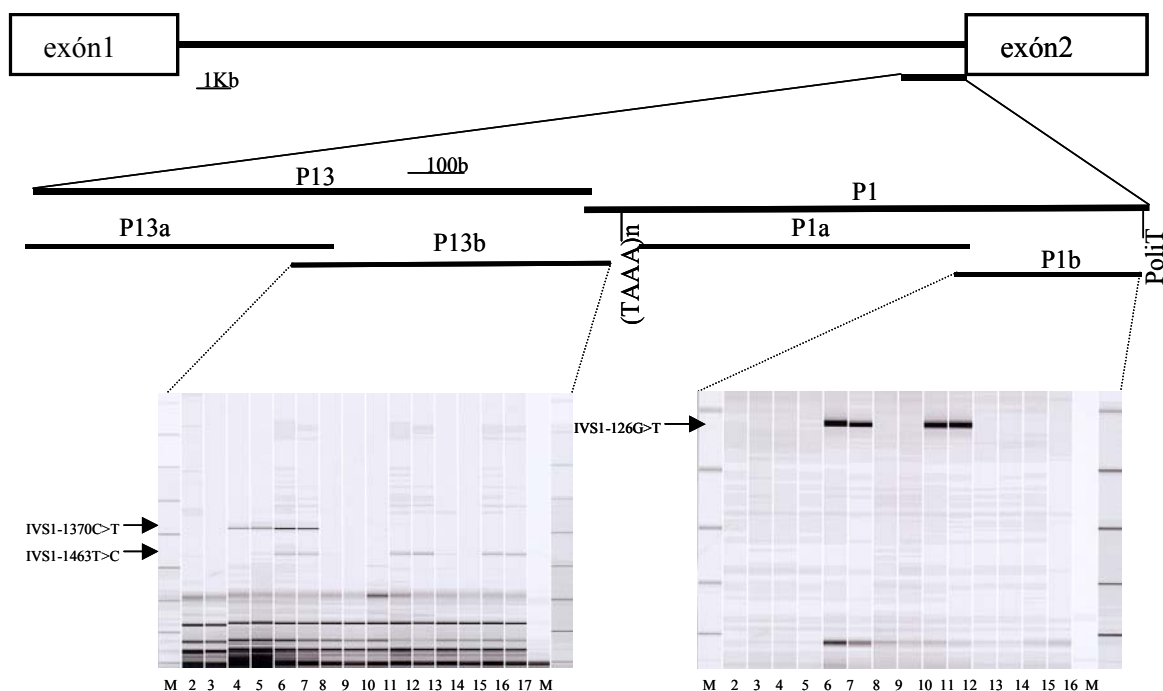
Para identificar la secuencia completa del intrón 1 del proto-oncogén *RET*, utilizamos las secuencias genómicas pertenecientes al segmento 3' del gen publicadas con anterioridad en Genbank (número de acceso AJ243297). Este fragmento, contiene la secuencia parcial de *RET* incluyendo 20 de los 21 exones, comenzando por el exón 2. Además, AJ243297 contiene la secuencia parcial del intrón 1 en su porción 3' (nt 1-964). Empleando esta secuencia parcial del intrón, ejecutamos el comando Blastn en la base de datos HTGS (high throughput genome sequence) de Genbank. Como resultado identificamos un contig genómico de 505kb del brazo largo del cromosoma 10, que contenía la secuencia completa de *RET* (Genbank AL022344). Utilizando la herramienta Blast 2-sequences de NCBI, enfrentamos la secuencia AL022344 con la de los exones 1 y 2 de *RET* descritas con anterioridad. Hemos obtenido un segmento del contig AL022344 que contiene la secuencia completa del intrón 1 de *RET* (23.127 pb). Esta identificación la recomprobamos efectuando Blast 2-sequences del segmento aislado con las 964pb disponibles del intrón 1 en Genbank y contenidas en AJ243297.

D.7.2. Análisis del extremo 3' del intrón 1 de *RET*.

D.7.2.1. Identificación de 3 nuevos SNPs en el extremo 3' del intrón.

Con el objetivo de identificar nuevos marcadores polimórficos dentro del intrón 1 de *RET*, comenzamos el rastreo sistemático de este segmento genómico partiendo del extremo 3', y empleando la técnica EMD fluorescente. Utilizando esta estrategia, identificamos diversos patrones de EMD en el intrón 1, en diferentes pacientes y controles analizados (Figura D.10).

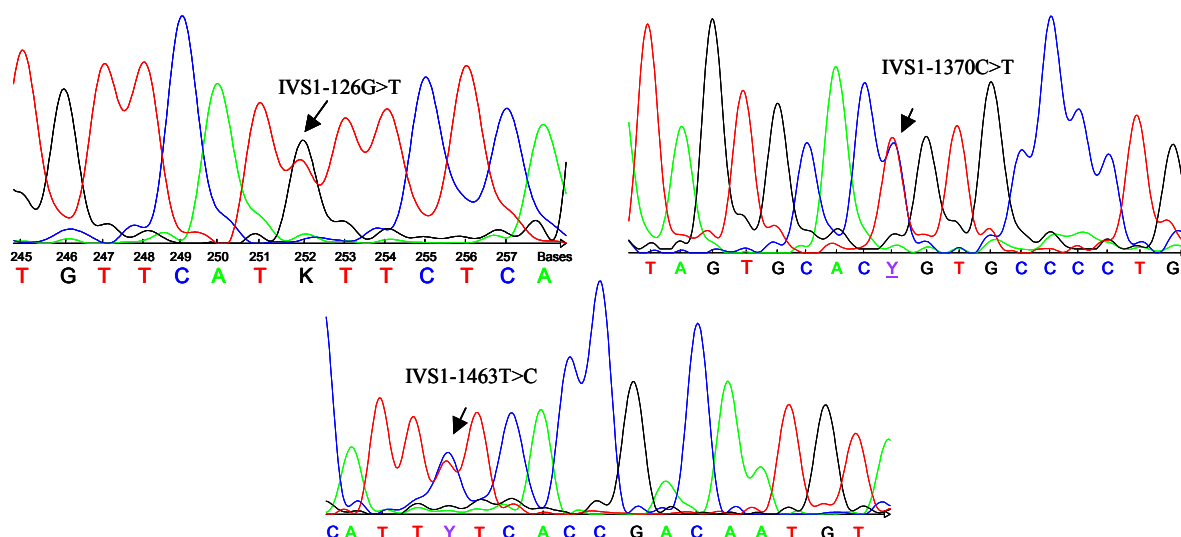
Figura D.10. Representación esquemática del extremo 3' del intrón1 de *RET*. Patrones EMD de los fragmentos P1b y P13 b.



El análisis, mediante secuenciación directa, de los fragmentos P1 y P13 permitió identificar dos STRs (*short tandem repeats*) flanqueando el fragmento P1. Específicamente, en las posiciones -71 a -57 identificamos un tracto poliT polimórfico. Además, entre las posiciones -942 y -898 encontramos una secuencia repetitiva de

cuatro nucleótidos (TAAA)_n también polimórfica. Ya que nuestro objetivo era la caracterización de SNPs, decidimos rediseñar los primers de EMD excluyendo estos segmentos repetitivos que entorpecían la secuenciación de productos de PCR e interferían en la identificación de posibles SNPs (Figura D.10, amplicones P1a, P1b, P13a y P13b). Como resultado obtuvimos 3 patrones de EMD en estos subsegmentos compatibles con la existencia de variaciones genéticas en los segmentos P1b y P13b (Figura D.10). Específicamente, en el segmento P1b el patrón de EMD observado se correspondió, a nivel de secuencia, con una transversión G>T en la posición -126 del intrón (Figura D.11). En el caso de los patrones identificados en el segmento P13b, el análisis de secuencia nos permitió identificar dos nuevos SNPs ubicados en las posiciones -1370 y -1463 del intrón 1. En concreto en la posición -1370 identificamos una transición C>T en varios pacientes HSCR analizados (IVS1 -1370C>T), y en la posición -1463 identificamos una nueva transición T>C (IVS1 -1463 T>C) (Figura D.11).

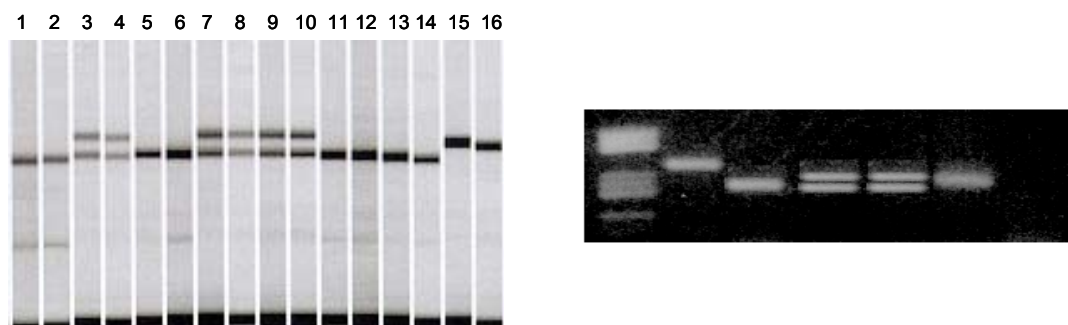
Figura D.11. Caracterización de las variantes intrónicas IVS1-126G>T, IVS1-1370C>T e IVS1-1463T>C de *RET* por secuenciación.



Para genotipar la variante IVS1-126G>T utilizamos la técnica SSCP fluorescente tras digestión del producto de PCR con la endonucleasa *MspI*. La presencia de la variante T origina un patrón de migración de los fragmentos diferente al

correspondiente para la variante G, y en virtud de esto se pudo realizar la genotipación de este polimorfismo (Figura D.12). Posteriormente confirmamos los resultados obtenidos mediante PCR-RFLP, empleando para ello la enzima *NlaIII*, puesto que esta restrictasa pierde un punto de corte en presencia del polimorfismo (Figura D.12).

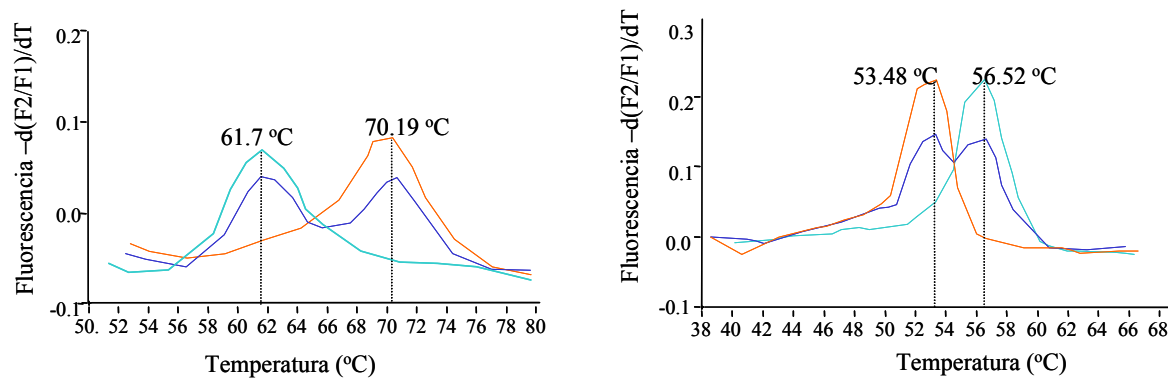
Figura D.12. Análisis de la variante IVS1-126G>T del proto-oncogén *RET*.



En el análisis por SSCP fluorescente (izquierda) se pueden observar tres patrones diferentes de migración, correspondientes a: Individuos homocigotos para el alelo silvestre, G/G (carriles 1, 2, 5, 6, 11-14), individuos heterocigotos, G/T (carriles 3,4,7-10) e individuos homocigotos para el alelo polimórfico, T/T (carriles 15 y 16).

En presencia de IVS1-126G>T, *NlaIII* pierde un punto de restricción, generándose una banda de 256 pb en lugar de las bandas de 205 y 51pb (derecha). Carril 1: Marcador de peso molecular (Marker V, Roche). Carril 2: Control sin digerir. Carril 3: individuo -/-. Carriles 4 y 5: individuos +/- . Carril 6: individuo +/+. Carril 7: agua.

Figura D.13. Análisis de las variantes IVS1-1370C>T e IVS1-1463T>C de *RET*.



Para detectar los SNPs IVS1-1370C>T e IVS1-1463T>C se desarrolló un método automatizado más simple y rápido que otras técnicas tradicionales, basado en el proceso FRET. De esta manera, se comprobó que para los amplicones que contienen la variante IVS1-1370T, la T_m es alrededor de unos 9°C inferior que para los amplicones conteniendo la variante IVS1-1370C. Por su parte, para los productos que llevan la variante IVS1-1463C la T_m es 3°C superior que para los productos con la variante IVS1-1463T (Figura D.13).

D.7.2.2. Estudios de asociación entre los 3 SNPs intrónicos y HSCR o MTC esporádico.

Los tres nuevos polimorfismos identificados en el extremo 3' del proto-oncogén *RET* fueron genotipados en una cohorte constituida por 103 casos esporádicos de HSCR, sus correspondientes padres, 51 casos de MTC esporádico y un grupo de 100 controles sanos. Una vez completado el proceso de genotipación de las variantes, se verificó que se cumplía el equilibrio de Hardy-Weinberg tanto en los grupos de casos como en el de controles. A continuación se procedió a calcular las frecuencias alélicas para cada uno de los tres nuevos loci polimórficos, en las cohortes de pacientes y en el grupo control (Tabla D.9).

Tabla D.9. Frecuencias alélicas de IVS1-126G>T, IVS1-1370C>T e IVS1-1463T>C de *RET* en pacientes HSCR, controles y pacientes MTC esporádicos.

		MTC esporádicos	Controles	HSCR
IVS1-126G>T	Alelo polimórfico (T)	0.48	0.35	0.21
	Alelo silvestre (G)	0.52	0.65	0.79
IVS1-1370C>T	Alelo polimórfico (T)	0.39	0.47	0.21
	Alelo silvestre (C)	0.61	0.53	0.79
IVS1-1463T>C	Alelo polimórfico (C)	0.90	0.82	0.41
	Alelo silvestre (T)	0.10	0.18	0.59

Observamos que los tres SNPs están sub-representados en el grupo de HSCR analizados, en comparación con la población control. En concreto, de un total de 206 cromosomas HSCR, hay 44 (21%) con la variante T en el locus IVS1-126G>T, y 162 (79%) con la variante silvestre G. La variante T estaba sub-representada de manera significativa al comparar con el grupo control (χ^2 con la corrección de Yates=8.69, $p=0.0032$). De forma análoga, los alelos polimórficos para IVS1-1370C>T e IVS1-1463T>C (T y C respectivamente), se encontraban también sub-representados en la cohorte HSCR al comparar con el grupo control (Tabla D.10; $p \ll 0.000001$).

Tabla D.10. Estudios comparativos entre los grupos usando el test de χ^2 con la corrección de Yates.

Variantes	Alelos	HSCR vs Controles		MTC vs Controles		MTC vs HSCR	
		HSCR	Controles	MTC	Controles	MTC	HSCR
IVS1-126G>T	T	44	70	49	70	49	44
	G	162	130	53	130	53	162
		$\chi^2 = 8.69, p = 0.0032053$		$\chi^2 = 4.28, p = 0.0385776$		$\chi^2 = 21.79, p = 0.0000030$	
IVS1-1370C>T	T	39	94	40	94	40	39
	C	167	106	62	106	62	167
		$\chi^2 = 35.03, p = 0.000000$		$\chi^2 = 1.36, p = 0.2438972$		$\chi^2 = 13.67, p = 0.0002175$	
IVS1-1463T>C	C	84	163	89	163	89	84
	T	122	37	13	37	13	122
		$\chi^2 = 68.94, p = 0.000000$		$\chi^2 = 1.23, p = 0.2674883$		$\chi^2 = 57.99, p = 0.000000$	

En contraste a lo observado en la cohorte HSCR, en los pacientes MTC esporádicos, IVS1-126G>T aparece sobre-representado al hacer la comparación con el grupo control. De un total de 102 cromosomas MTC estudiados, 49 (48%) portaban el alelo polimórfico T y 53 (52%) el silvestre G ($\chi^2=4.25, p=0.038$, Tabla D.10). Por el contrario no encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar las

frecuencias alélicas de los loci IVS1-1370C>T e IVS1-1463T>C entre los pacientes MTC esporádicos y los controles.

De los resultados obtenidos en el análisis de frecuencias alélicas de los nuevos loci identificados, conviene destacar la clara inversión en la frecuencia de IVS1-126G>T al comparar la cohorte MTC con la cohorte HSCR. Curiosamente, la frecuencia observada para este marcador en la población control aparece en un rango intermedio a lo observado en los pacientes de ambas patologías (T:70, 35%, G:130, 65%). Comparando la distribución alélica de los SNPs entre ambas cohortes (HSCR vs MTC), prácticamente se observa, en cada marcador genotipado, una inversión de frecuencias alélicas (Tablas D.9, D.10).

D.7.2.3. Análisis de haplotipos constituidos por la combinación de los 3 SNPs intrónicos.

Mediante el análisis de segregación de los SNPs identificados en los pacientes HSCR y en sus padres, realizamos el trazado de haplotipos constituidos por la combinación de las tres variantes intrónicas. Encontramos un total de 5 haplotipos posibles (haplotipos 0-4, Tabla D.11).

Tabla D.11. Haplotipos basados en la combinación de los tres SNPs localizados en el extremo 3' del intrón 1 de *RET*.

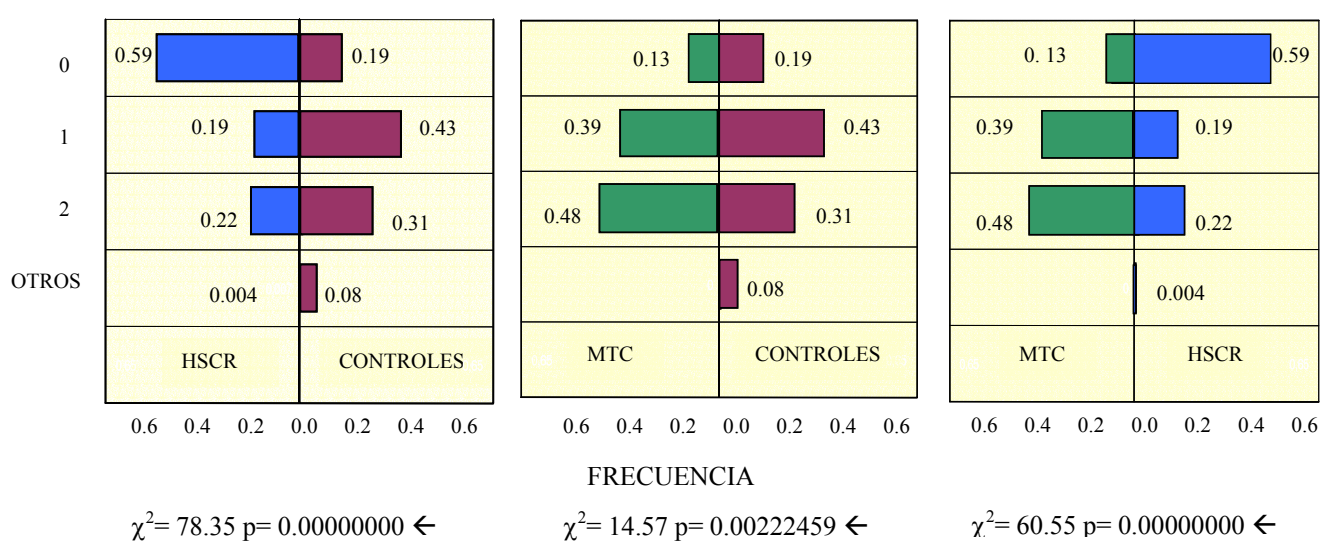
	IVS1-126G>T	IVS1-1370C>T	IVS1-1463T>C
Haplotipo 0	-	-	-
Haplotipo 1	-	+	+
Haplotipo 2	+	-	+
Haplotipo 3	-	-	+
Haplotipo 4	+	+	+

El signo + indica presencia de la variante en el locus.

Debido a que los eventos de recombinación entre los marcadores en estudio serían extremadamente raros (distancia entre SNPs<1200 pb), consideramos cada haplotipo como un alelo individual dentro del mismo locus (3' del intrón 1 de *RET*).

Dado que no disponemos del ADN de los padres de los pacientes MTC ni de los de los controles, el trazado de haplotipos en estos grupos se infirió a partir de los haplotipos observados en los pacientes HSCR. La distribución de haplotipos observada en los grupos de pacientes y controles resultó diferente de manera estadísticamente significativa (Figura D.14).

Figura D.14. Comparación de las frecuencias y de la distribución de los haplotipos del intrón 1 de *RET* entre los grupos de estudio. Análisis de χ^2 con la corrección de Yates.



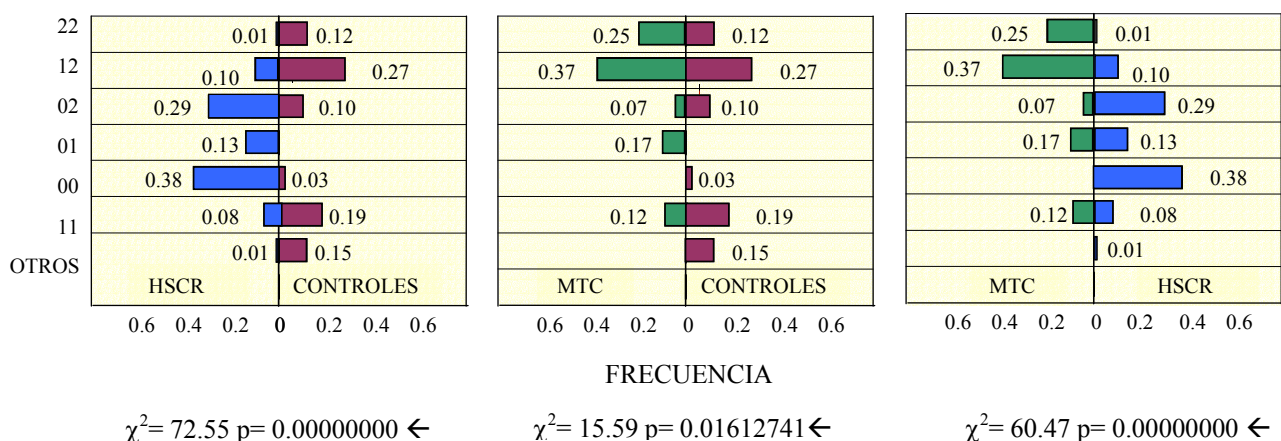
Comprobamos que el haplotipo más común en el grupo HSCR es el 0 (59%). Es importante destacar que el haplotipo 0 está en desequilibrio de ligamiento completo con todos los haplotipos de riesgo descritos por nuestro grupo con anterioridad (haplotipos B, C y F; Borrego y cols, 2000). Es decir, todos los haplotipos de riesgo comparten en este segmento genómico del intrón 1 la misma combinación de SNPs (haplotipo 0). Este dato es concordante con nuestros estudios de mapeo de desequilibrio de ligamiento, y situarían el locus de susceptibilidad para HSCR a unas 20 kb del marcador A45A. El haplotipo más frecuente de los pacientes MTC esporádicos es el 2 (48%) (haplotipo que contiene en desequilibrio los SNPs IVS1-126G>T e IVS1-1463T>C), mientras que la frecuencia del haplotipo 0 es notablemente baja (12.7%). Es interesante destacar que los pacientes que portan el SNP S836S también portan el haplotipo 2 de esta región intrónica, lo cual sugiere que S836S y el haplotipo 2 están en desequilibrio de

ligamiento. Este dato ha sido confirmado en 3 pacientes MTC que son homocigotos para el haplotipo 2 del intrón 1 y heterocigotos para S836S.

Los haplotipos observados en el grupo control muestran una distribución intermedia a la observada en las cohortes MTC y HSCR. El haplotipo 1 es el más común en el grupo de controles (43%). Además, el haplotipo 4 que no aparece en ninguno de los grupos de pacientes estudiados, está presente con cierta frecuencia en el grupo control (4%). El haplotipo 0 tiene una frecuencia del 18.5% en controles en comparación con el 59% del grupo HSCR y el 12.7% del grupo MTC. En cuanto al haplotipo 2, su frecuencia en los controles es del 31% frente al 21.3% de los pacientes HSCR y el 48% de los pacientes MTC. Estas observaciones sugieren que el haplotipo 0 podría estar ligado a HSCR, mientras que el haplotipo 2 lo estaría a MTC.

También hemos estudiado la composición genotípica (parejas de haplotipos) en los grupos de estudio. En HSCR predominan los genotipos 00 y 02 (70%), mientras que en MTC los genotipos más frecuentes son el 12 y 22 (67%). En el grupo control el genotipo más común es el 12, seguido del 11 y del 22. El análisis de los genotipos observados/esperados en los grupos de estudio demuestra que los resultados están de acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg. Al comparar la distribución de genotipos entre los dos grupos de pacientes se pueden observar diferencias muy notorias (Figura D.15). En conjunto todos estos hallazgos corroboran las observaciones efectuadas en los estudios de frecuencias alélicas individuales para cada marcador, así como el estudio de haplotipos.

Figura D.15. Comparación de las frecuencias y de la distribución de los genotipos del intrón 1 de *RET* entre los grupos de estudio. Análisis de χ^2 con la corrección de Yates.



D.7.2.4. Análisis de haplotipos formados por la combinación de los 3 SNPs intrónicos y los 7 cSNPs de RET. Evidencia de la existencia de un nuevo locus fundador para HSCR.

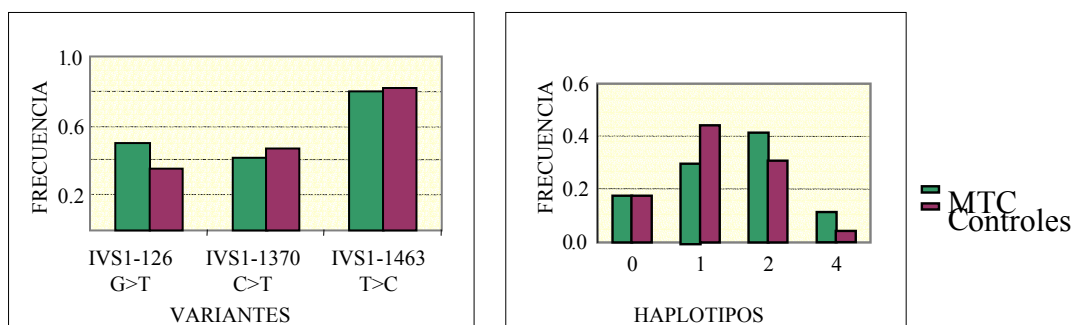
Hemos seleccionado los 64 casos esporádicos HSCR que tenían genotipados los 7 cSNPs de *RET* (Borrego y cols, 1999; Borrego y cols, 2000) y hemos analizado los haplotipos completos constituidos por la combinación de las 10 variantes (7 cSNPs más 3 variantes intrónicas). El fin de este análisis es la búsqueda de posibles asociaciones de haplotipos concretos de *RET* con el fenotipo HSCR, lo que justificaría la posible existencia de un evento mutacional en desequilibrio de ligamiento con dichos haplotipos. Para realizar un estudio de mapeo de desequilibrio de ligamiento, el grupo de la Universidad de Ohio con el que colaboramos desarrolló el análisis de los haplotipos transmitidos *versus* los haplotipos no transmitidos de los padres a los pacientes HSCR, utilizando el modelo DMLE + (Reeve y cols, 2002). Los resultados de este estudio apoyan la existencia de una mutación causante de una gran proporción de los casos esporádicos de HSCR, probablemente localizada en el intrón 1 o en el extremo 5' de *RET*. Por consiguiente, decidimos que la mejor estrategia a seguir era el rastreo sistemático del resto del intrón en dirección 5' en busca de dicha mutación.

D.7.2.5. Asociación de IVS1-126G>T y el haplotipo 2 de RET a MTC esporádico en otra serie diferente de pacientes.

El principal inconveniente del análisis molecular de las variantes de *RET* en nuestra serie de pacientes MTC esporádicos era el relativamente pequeño tamaño muestral, por lo que nos planteamos determinar si los resultados obtenidos podían confirmarse en una cohorte de pacientes mayor. Hemos analizado la frecuencia de las 3 variantes polimórficas del extremo 3' del intrón 1 de *RET* en 104 casos esporádicos de MTC procedentes del Grupo de Neoplasias Endocrinas Familiares del C.N.I.O., y la hemos comparado con la de 100 controles normales. Como se muestra en la Figura D.16, los datos de frecuencia de los polimorfismos estudiados en esta cohorte de

pacientes, son similares a los obtenidos anteriormente. Las diferencias en las frecuencias de IVS1-1370C>T e IVS1-1463T>C no son estadísticamente significativas al comparar casos *versus* controles. Sin embargo, se encontró una importante sobre-representación de la variante IVS1-126G>T en los pacientes. El alelo IVS1-126T estaba presente en 104 de los 208 cromosomas MTC (50%) y en 70 de los 200 cromosomas control (35%) ($\chi^2=8.78$, $p=0.003$). Además, se observó que la distribución haplotípica entre casos y controles era diferente de manera significativa ($\chi^2=21.45$, $p=0.0003$). Mientras que el haplotipo 1 (IVS1-1463C, IVS1-1370T, IVS1-126G) era el más común en el grupo control (43%), el haplotipo 2 presentaba una alta frecuencia entre los pacientes MTC (42%) (Figura D.16). Por tanto todos estos datos confirman los resultados obtenidos en nuestra serie, y vuelven a sugerir la existencia de un locus de susceptibilidad para MTC de baja penetrancia, dentro del intrón 1 de *RET*.

Figura D.16. Representación de los polimorfismos del extremo 3' del intrón 1 de *RET* y de los haplotipos formados por su combinación, en la nueva serie de pacientes MTC esporádicos.



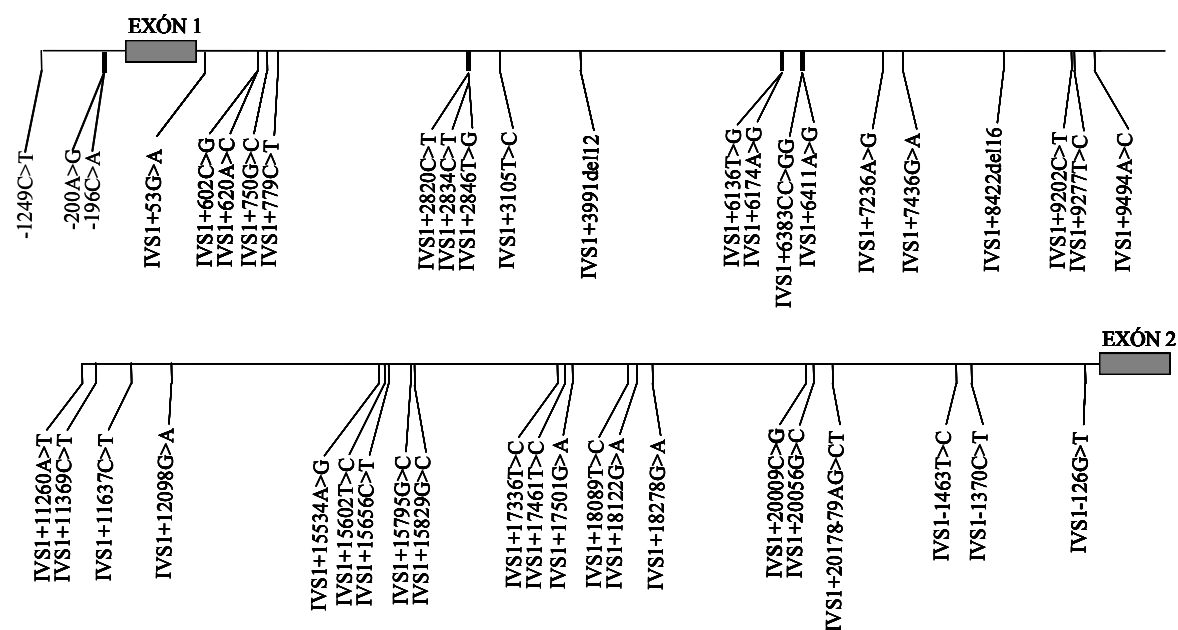
D.7.3. Análisis de la secuencia completa del intrón 1 de *RET*.

D.7.3.1. Identificación de nuevos polimorfismos a lo largo del intrón 1.

En virtud de los resultados anteriormente obtenidos se optó por continuar con la búsqueda sistemática de cambios de secuencia en el intrón 1 en dirección 5' con el objetivo de encontrar la hipotética mutación causante de HSCR, o bien localizar una

región donde se rompiera el desequilibrio de ligamiento (LD). Este rastreo fue llevado a cabo por nuestros colaboradores de Ohio mediante secuenciación directa y se encontraron un total de 38 polimorfismos distribuidos por el intrón 1 (36 SNPs y 2 pequeñas deleciones), y 3 variantes en la región situada en 5' con respecto al gen *RET*. En la Figura D.17 se muestran las nuevas variantes identificadas.

Figura D.17. Variantes caracterizadas a lo largo de la secuencia del intrón 1 de *RET*.



Seleccionamos 24 variantes localizadas entre la posición -1249 con respecto al ATG inicial de *RET*, y la posición $+11637$ del intrón 1. Todas ellas fueron genotipadas en la serie de pacientes HSCR y en sus padres, así como en el grupo de controles. La genotipación de 12 de los SNPs intrónicos (IVS1+6136T>G, IVS1+6174A>G, IVS1+6383-84CC>GG, IVS1+6411A>G, IVS1+7236A>G, IVS1+7436G>A, IVS1+9202C>T, IVS1+9277T>C, IVS1+9494A>C, IVS1+11260A>T, IVS1+11369C>T e IVS1+11637C>T) se realizó en nuestra Unidad por FRET. Nuestros resultados muestran que los experimentos diseñados detectan todas las variantes de secuencia, con un valor específico de T_m para cada una de ellas (Figura D.18). Además, hemos sido capaces de optimizar un procedimiento FRET para la detección simultánea de los dos polimorfismos localizados a -5 y -1 pares de bases con respecto al inicio de transcripción de *RET* ($-200A>G$ y $-196C>A$). El análisis de los

resultados nos permitió identificar 3 picos FRET correspondientes a los tres alelos existentes -200A -196C, -200G -196C, y -200G -196A. La combinación -200A -196A no se encontró en ninguno de los individuos estudiados (Figura D.19). Este método ha sido validado mediante la secuenciación en paralelo del 25% de los individuos testados.

Figura D.18. Patrones FRET para la detección de las variantes intrónicas de *RET*.

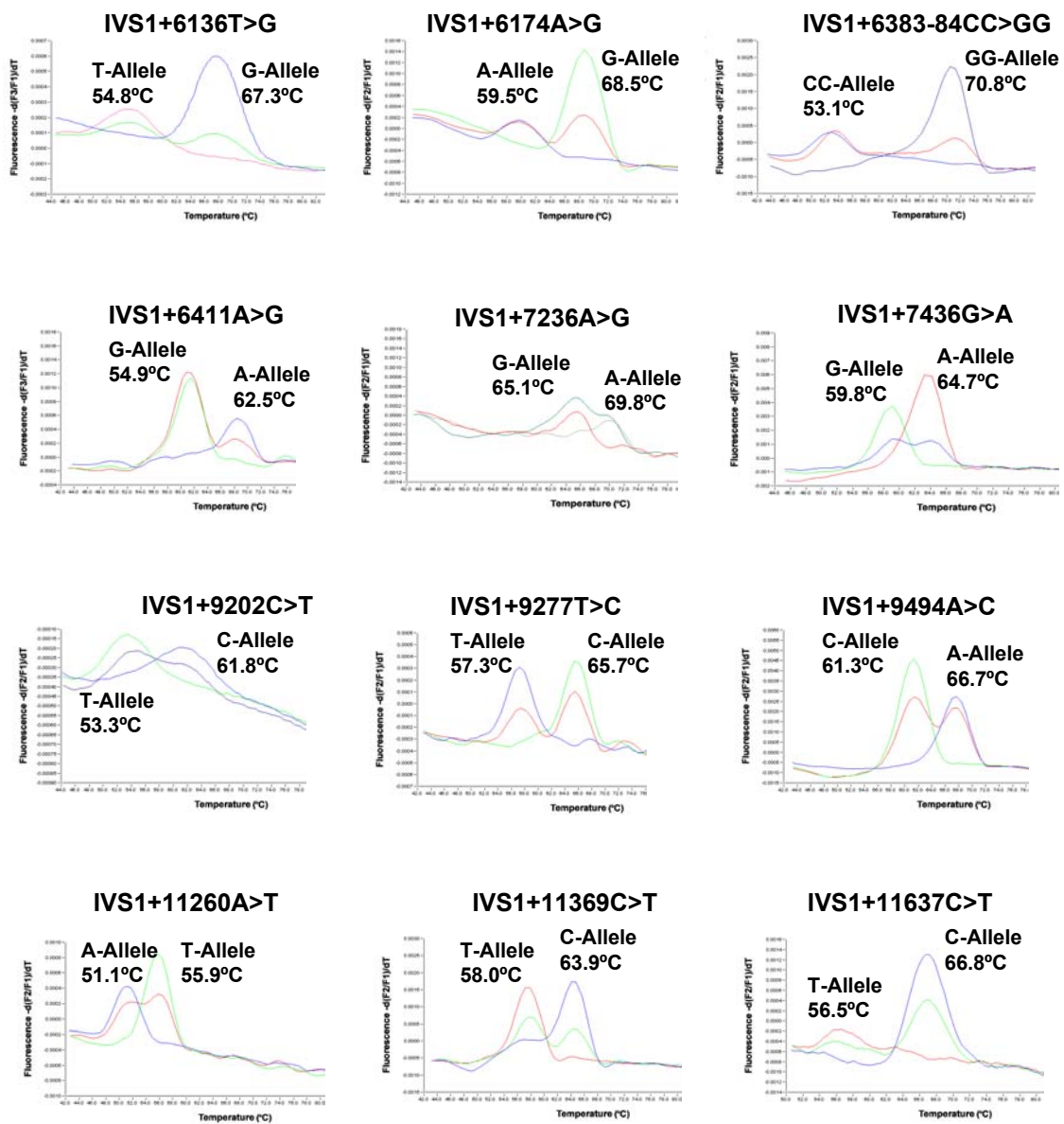
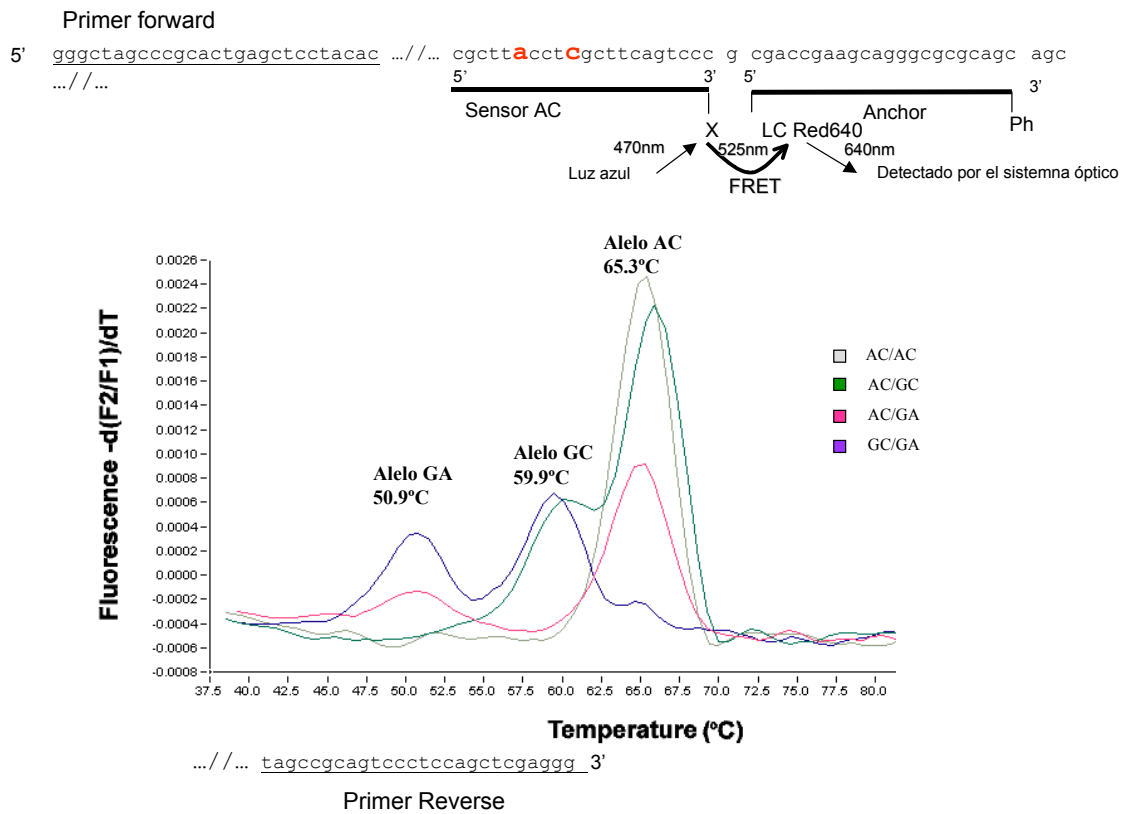


Figura D.19. Patrón FRET para la detección simultánea de las variantes -200 A>G y -196C>A de la región 5' de *RET*.



*D.7.3.2. Estudios de asociación entre las variantes encontradas y los haplotipos constituidos por su combinación, y HSCR: Evidencia de ruptura del desequilibrio de ligamiento en la región 5' que limita con *RET*.*

Una vez obtenidos los datos crudos de genotipación en todos los pacientes HSCR y en los controles, calculamos las frecuencias alélicas para cada una de las variantes en los dos grupos. El análisis de segregación en las familias HSCR mostró que algunas de las variantes intrónicas están completamente ligadas, presentando consiguientemente una frecuencia idéntica (Tabla D.12). Por ejemplo, los SNPs IVS1+2846T>G, IVS1+3105T>C, IVS1+7236A>G, IVS1+7436G>A, IVS1+9202C>T, IVS1+9277T>C, IVS1+9494A>C y IVS1+11260A>T aparecían siempre en *cis*. El mismo fenómeno se observó con las variantes IVS1+620A>G, IVS1+779C>T, IVS1+2820C>T, IVS1+6136T>G, IVS1+6174A>G, IVS1+6383-84CC>GG y

IVS1+6411A>G, o con las dos pequeñas deleciones (IVS1+3991del12 y IVS1+8406del16).

Tabla D.12. Distribución de los nuevos polimorfismos en HSCR y controles.

Polimorfismo	Frecuencia alélica		Test χ^2 con la corrección de Yate	
	HSCR	Controles		
-200A>G	Alelo polimórfico G	0.39	0.83	$\chi^2 = 86.32, p < 0.00000001$
	Alelo silvestre A	0.61	0.17	
-196C>A	Alelo polimórfico A	0.15	0.44	$\chi^2 = 43.7, p < 0.00000001$
	Alelo silvestre C	0.85	0.66	
IVS1+53G>A	Alelo polimórfico A	0.15	0.44	$\chi^2 = 43.7, p < 0.00000001$
	Alelo silvestre G	0.85	0.66	
IVS1+620A>G	Alelo polimórfico G	0.15	0.44	$\chi^2 = 43.7, p < 0.00000001$
	Alelo silvestre A	0.85	0.66	
IVS1+779C>T	Alelo polimórfico T	0.15	0.44	$\chi^2 = 43.7, p < 0.00000001$
	Alelo silvestre C	0.85	0.66	
IVS1+2820C>T	Alelo polimórfico T	0.15	0.44	$\chi^2 = 43.7, p < 0.00000001$
	Alelo silvestre C	0.85	0.66	
IVS1+2834C>T	Alelo polimórfico T	0.12	0.31	$\chi^2 = 18.2, p = 0.0000194$
	Alelo silvestre C	0.88	0.69	
IVS1+2846T>G	Alelo polimórfico G	0.39	0.83	$\chi^2 = 75.2, p < 0.00000001$
	Alelo silvestre T	0.61	0.17	
IVS1+3105T>C	Alelo polimórfico C	0.39	0.83	$\chi^2 = 75.2, p < 0.00000001$
	Alelo silvestre T	0.61	0.17	
IVS1+3991del12	Alelo con deleción	0.86	0.59	$\chi^2 = 35.8, p < 0.00000001$
	Alelo silvestre	0.14	0.41	
IVS1+6136T>G	Alelo polimórfico G	0.15	0.44	$\chi^2 = 43.7, p < 0.00000001$
	Alelo silvestre T	0.85	0.66	
IVS1+6174A>G	Alelo polimórfico G	0.15	0.44	$\chi^2 = 43.7, p < 0.00000001$
	Alelo silvestre A	0.85	0.66	
IVS1+6383-84CC>GG	Alelo polimórfico GG	0.15	0.44	$\chi^2 = 43.7, p < 0.00000001$
	Alelo silvestre CC	0.85	0.66	
IVS1+6411A>G	Alelo polimórfico G	0.15	0.44	$\chi^2 = 43.7, p < 0.00000001$
	Alelo silvestre A	0.85	0.66	
IVS1+7236A>G	Alelo polimórfico G	0.39	0.83	$\chi^2 = 75.2, p < 0.00000001$
	Alelo silvestre A	0.61	0.17	
IVS1+7436G>A	Alelo polimórfico A	0.39	0.83	$\chi^2 = 75.2, p < 0.00000001$
	Alelo silvestre G	0.61	0.17	
IVS1+8406del16	Alelo con deleción	0.86	0.59	$\chi^2 = 35.8, p < 0.00000001$
	Alelo silvestre	0.14	0.41	
IVS1+9202C>T	Alelo polimórfico T	0.39	0.83	$\chi^2 = 75.2, p < 0.00000001$
	Alelo silvestre C	0.61	0.17	
IVS1+9277T>C	Alelo polimórfico C	0.39	0.83	$\chi^2 = 75.2, p < 0.00000001$
	Alelo silvestre T	0.61	0.17	
IVS1+9494A>C	Alelo polimórfico C	0.39	0.83	$\chi^2 = 75.2, p < 0.00000001$
	Alelo silvestre A	0.61	0.17	
IVS1+11260A>T	Alelo polimórfico T	0.39	0.83	$\chi^2 = 75.2, p < 0.00000001$
	Alelo silvestre A	0.61	0.17	
IVS1+11369C>T	Alelo polimórfico T	0.17	0.44	$\chi^2 = 35.8, p < 0.00000001$
	Alelo silvestre C	0.83	0.66	
IVS1+11637C>T	Alelo polimórfico T	0.17	0.44	$\chi^2 = 35.8, p < 0.00000001$
	Alelo silvestre C	0.83	0.66	

Las frecuencias polimórficas mostraron tener valores muy distintos en pacientes HSCR y controles. Asimismo, al aplicar el test comparativo de χ^2 para cada locus polimórfico entre el grupo de pacientes y el de controles, observamos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$, Tabla D.12). Más concretamente encontramos una importante sub-representación de todos los SNPs en la serie de pacientes, y una sobre-representación de las deleciones (IVS1+3991del12 y IVS1+8406del16). Es decir, se mantenía el LD a lo largo de toda la región analizada hasta llegar a la posición -1249, donde observamos una ruptura del mismo ($p > 0.05$).

Gracias al análisis de segregación en los pacientes HSCR y sus respectivos padres, realizamos el trazado de haplotipos constituidos por diferentes combinaciones de las 23 nuevas variantes con las que se seguía observando LD (desde IVS1+11637C>T hasta -200A>G) más los 3 SNPs del extremo 3' del intrón, previamente analizados por nuestro grupo (IVS1-1463T>C, IVS1-1370C>T y IVS1-126G>T, Borrego y cols, 2003b). Estos haplotipos pudieron trazarse para 92 de las tríadas HSCR. Aunque encontramos 13 combinaciones diferentes entre los casos HSCR y sus padres, algunos de estos haplotipos eran muy raros (Tabla D.13). Por ejemplo, los haplotipos 1b, 1d, 1e, 2d, 2e y 3 sólo se encontraron 1 o 2 veces entre los alelos no transmitidos de las tríadas HSCR, y el haplotipo 2b sólo aparecía en seis familias (transmitido al paciente HSCR sólo en una de ellas). En realidad esos 13 haplotipos extendidos podrían definirse como diferentes subtipos dentro de los 5 haplotipos fundamentales previamente publicados (0-4, Tabla D.11, Borrego y cols, 2003b). Cabe destacar que el haplotipo 0 (previamente definido como "haplotipo-HSCR") está siempre ligado a una única combinación de polimorfismos (Tabla D.13), y representa el haplotipo más común entre nuestros casos (62%).

Dado que no disponíamos de los padres de los individuos control, la construcción de haplotipos para este grupo fue inferida a partir de los haplotipos de los casos HSCR. Por este procedimiento se pudieron inferir los haplotipos para 82 de los 100 controles analizados. Los haplotipos más frecuentes en este grupo eran el haplotipo 1a (39%) seguido del haplotipo 2 a (28%), mientras que el haplotipo "ligado a HSCR" 0 presentaba una frecuencia del 17%. Como se muestra en la Figura D.21 la distribución haplotípica observada en la cohorte de pacientes y en controles era significativamente diferente ($\chi^2 = 76.96$, $p < 0.00000001$). Además también calculamos las frecuencias

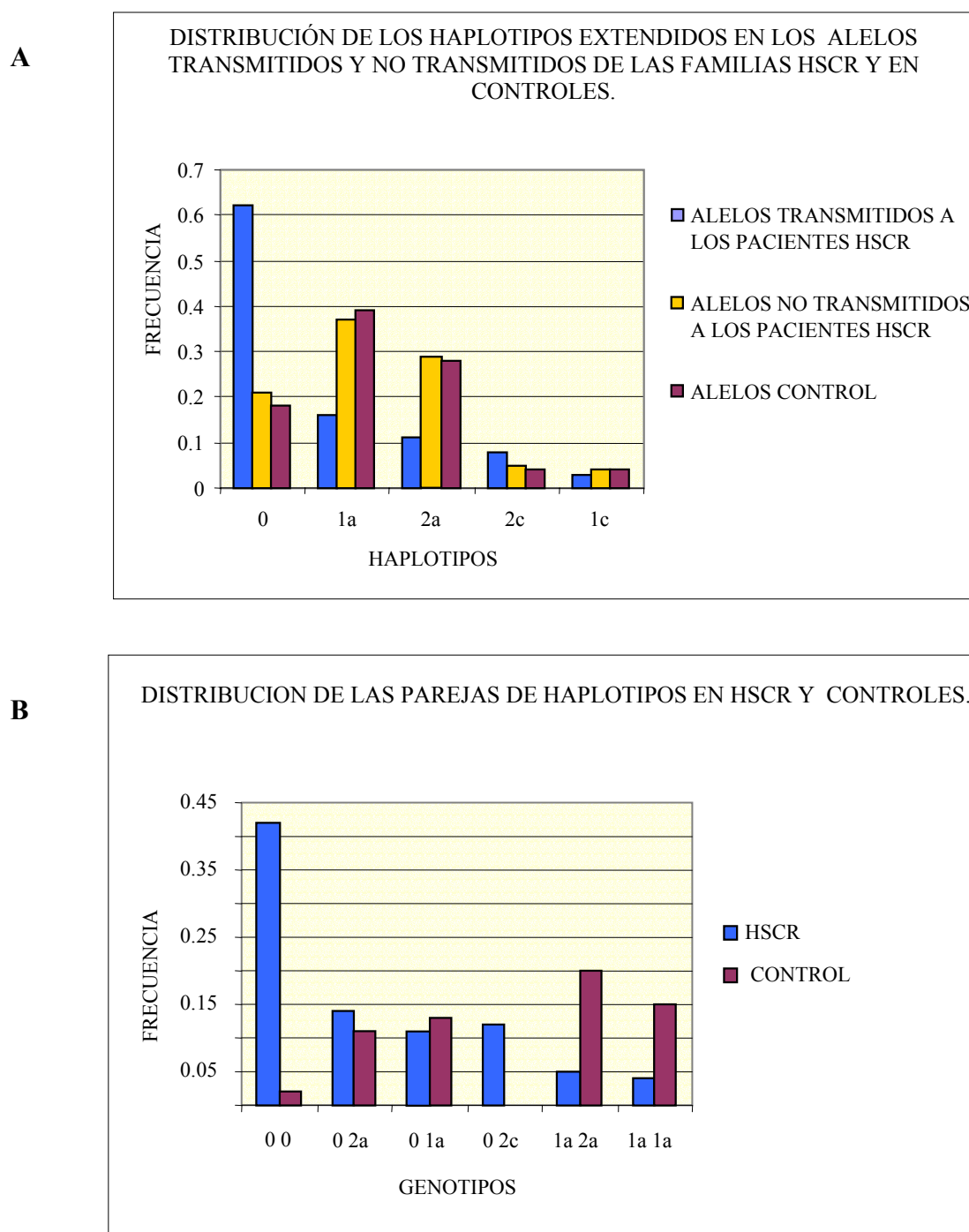
haplotípicas entre los alelos no transmitidos de las triadas HSCR, y observamos de nuevo diferencias significativas al comparar con los alelos transmitidos ($\chi^2=66.47$, $p<0.00000001$). Por el contrario, las frecuencias de cada haplotipo y su distribución son similares en los alelos no transmitidos y en los alelos control ($\chi^2=0.88$, $p=0.93$).

Tabla D.13. Definición de los haplotipos constituidos por la combinación de las variantes del intrón 1 y de la región 5' de *RET*.

VARIANTES	0	1a	1b*	1c	1d*	1e*	2a	2b*	2c	2d*	2e*	3*	4*
-200A>G	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-196C>A	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
IVS1+53G>A													
IVS1+620A>C													
IVS1+779C>T	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
IVS1+2820C>T													
IVS1+2834C>T	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
IVS1+2846T>G	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IVS1+3105T>C													
IVS1+3991del12	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-
IVS1+6136T>G													
IVS1+6174A>G													
IVS1+6383-84CC>GG	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
IVS1+6411A>G													
IVS1+7236A>G	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IVS1+7436G>A													
IVS1+8406del16	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-
IVS1+9202C>T													
IVS1+9277T>C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IVS1+9494A>C													
IVS1+11260A>T													
IVS1+11369C>T	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+
IVS1+11637C>T													
IVS1-1463T>C	-				+					+		+	+
IVS1-1370C>T	-				+					-		-	+
IVS1-126G>T	-				-					+		-	+

Los haplotipos marcados con el signo * tienen una frecuencia muy baja tanto en pacientes como en controles. El signo + indica la presencia de la variante polimórfica.

Figura D.21

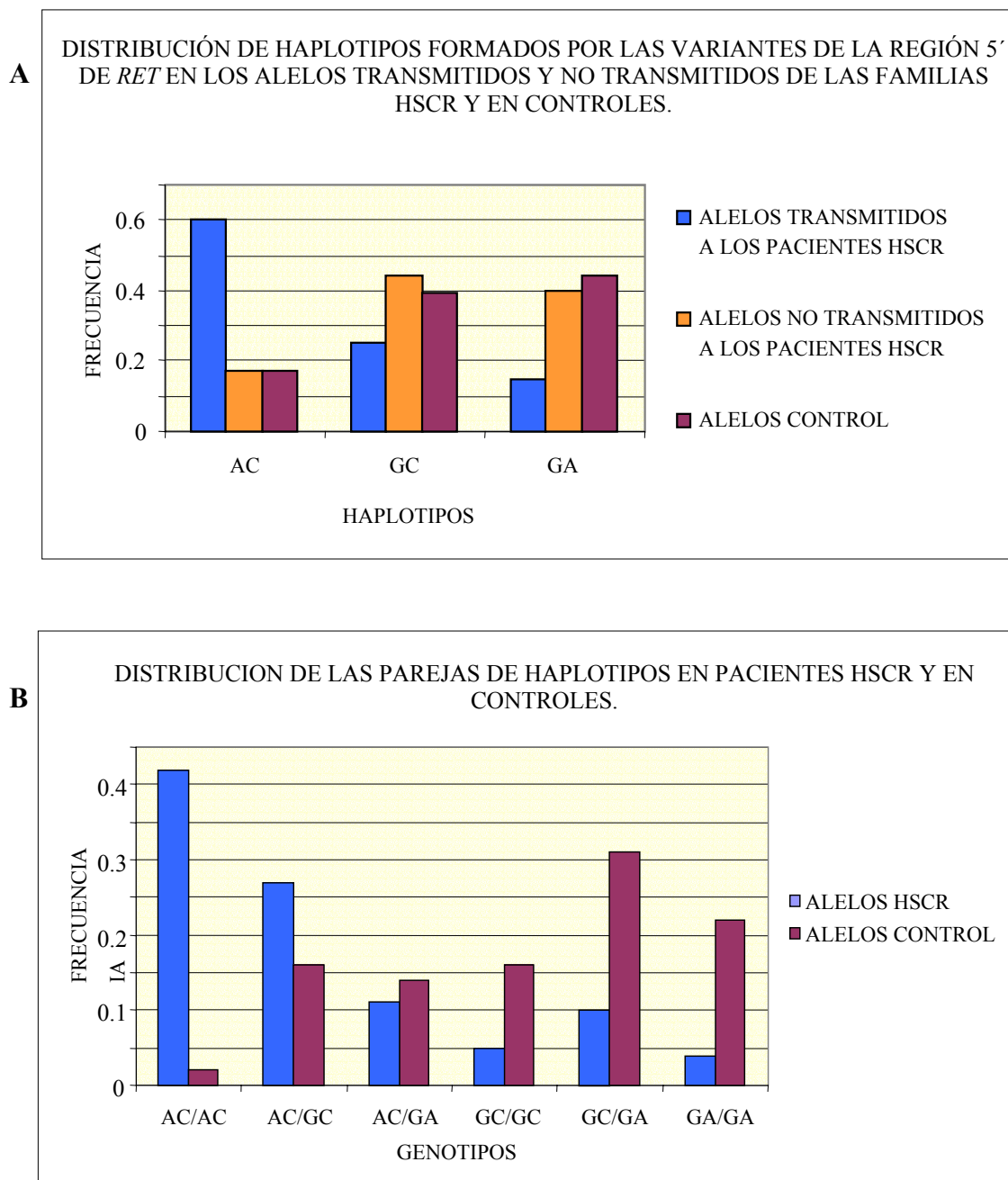


También hemos comparado la distribución de las parejas de haplotipos (genotipos) entre pacientes y controles. El genotipo 00 (42%) predomina en HSCR, mientras que en el grupo control el genotipo más común es 1a2a (21%) seguido de 1a1a

(15%). Quizás el hallazgo más interesante es que el genotipo "asociado a HSCR" 00 sólo se presenta en el 2% de controles.

Por otra parte procedimos a calcular las frecuencias de los haplotipos constituidos únicamente por la combinación de las dos variantes situadas a -5 y -1 del inicio de transcripción de *RET*, (-200A>C, -196C>A, Figura D.22).

Figura D.22



Decidimos analizar estas variantes por separado por constituir el punto de corte del LD en la región 5', así como porque debido a su posición podrían tener algún efecto funcional en la transcripción de *RET*. Tales haplotipos de la región 5' de *RET* se pudieron deducir fácilmente para todos los individuos, gracias al método de genotipación (Figura D.19). Como se muestra en la Figura D.22A, la distribución haplotípica es significativamente diferente al comparar los alelos transmitidos a los pacientes HSCR versus los alelos no transmitidos ($\chi^2=83.64$, $p<0.00000001$), o *versus* los alelos control ($\chi^2=84.02$, $p<0.00000001$). Nuestros resultados muestran que la combinación más común entre los pacientes HSCR es el haplotipo AC (-200A -196C), que está presente en el 60% de los alelos HSCR mientras que sólo aparece en el 16% de los alelos no transmitidos y en el 17% de los alelos control. Es importante destacar que el haplotipo AC está en desequilibrio de ligamiento completo con todos los haplotipos de riesgo para HSCR descritos hasta el momento (Borrego y cols, 2003b). En contraste, las frecuencias de los haplotipos GC (-200G -196C) y GA (-200G -196A) son considerablemente más bajas en los alelos HSCR (25% y 15%) que en los alelos no transmitidos (44% y 40%) o en los alelos control (39% y 44%). Conclusiones similares se pueden extraer de la comparación de la distribución de las parejas de haplotipos, donde las diferencias observadas son incluso mayores (Figura D.22B).

D.7.3.3. Estudios de asociación entre las variantes encontradas y MTC esporádico.

Puesto que el análisis del segmento 3' del intrón 1 en pacientes MTC esporádicos mostraba la presencia de un haplotipo de riesgo para esta enfermedad (haplotipo 2), sugiriendo la existencia de un locus para MTC en dirección 5', nos planteamos investigar la distribución de las nuevas variantes encontradas (Sección D.8.3.1) en estos pacientes. Observamos que las frecuencias alélicas de cada una de las variantes testadas eran muy similares a las del grupo control. Asimismo los resultados del test de Fisher comparando la distribución polimórfica en ambos grupos no mostraron diferencias significativas (Tabla D.14).

Tabla D.14. Frecuencias alélicas de los polimorfismos del intrón 1 de *RET* y la región 5' en pacientes MTC esporádicos y controles. Análisis estadístico de la distribución alélica en ambos grupos.

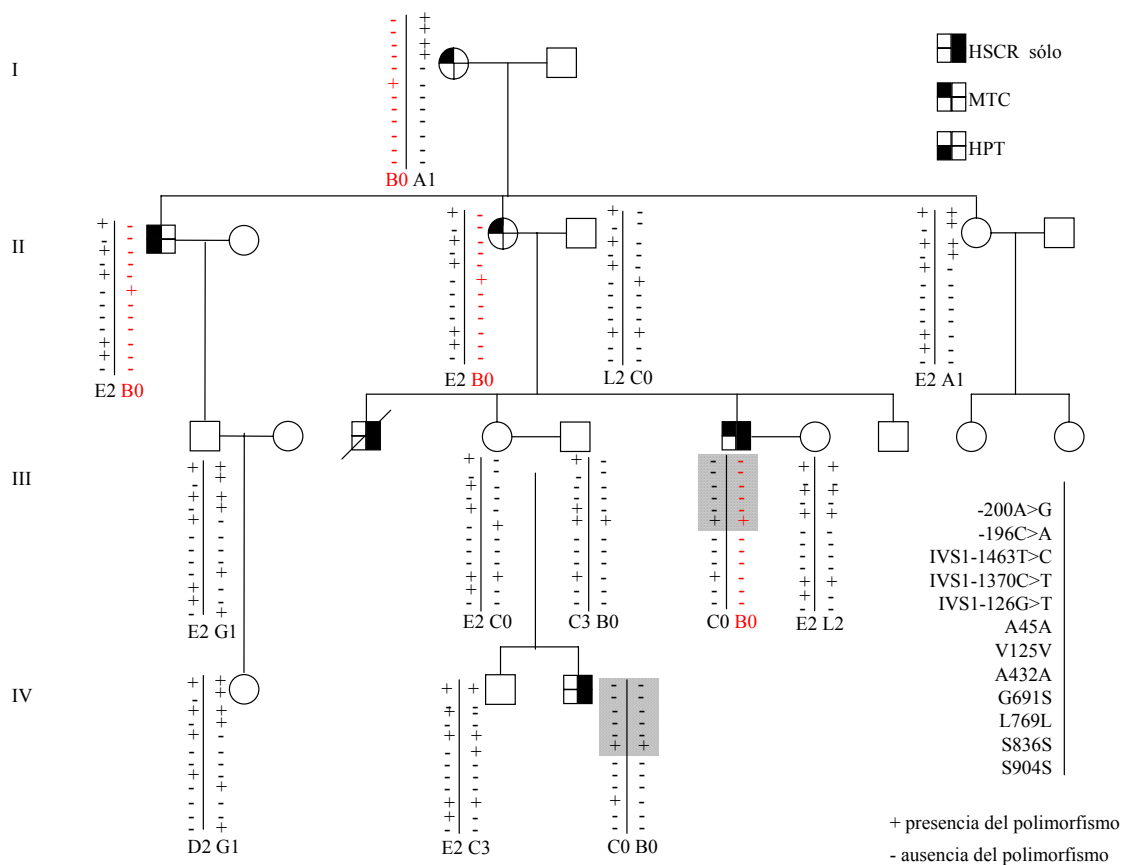
Polimorfismo	Frecuencia alélica		Test χ^2 con la corrección de Yate	
	MTC	Controles		
-200A>G	Alelo polimórfico G	0.84	0.83	$\chi^2=0.01$, p= 0.94
	Alelo silvestre A	0.16		
-196C>A	Alelo polimórfico A	0.44	0.44	$\chi^2=0.01$, p= 0.92
	Alelo silvestre C	0.66		
IVS1+6136T>G	Alelo polimórfico G	0.37	0.44	$\chi^2=0.34$, p= 0.56
	Alelo silvestre T	0.63		
IVS1+6174A>G	Alelo polimórfico G	0.37	0.44	$\chi^2=0.34$, p= 0.56
	Alelo silvestre A	0.63		
IVS1+6383-84CC>GG	Alelo polimórfico GG	0.37	0.44	$\chi^2=0.34$, p= 0.56
	Alelo silvestre CC	0.63		
IVS1+6411A>G	Alelo polimórfico G	0.37	0.44	$\chi^2=0.34$, p= 0.56
	Alelo silvestre A	0.63		
IVS1+7236A>G	Alelo polimórfico G	0.87	0.83	$\chi^2=0.38$, p= 0.54
	Alelo silvestre A	0.13		
IVS1+7436G>A	Alelo polimórfico A	0.87	0.83	$\chi^2=0.38$, p= 0.54
	Alelo silvestre G	0.13		
IVS1+9202C>T	Alelo polimórfico T	0.87	0.83	$\chi^2=0.38$, p= 0.54
	Alelo silvestre C	0.13		
IVS1+9277T>C	Alelo polimórfico C	0.87	0.83	$\chi^2=0.38$, p= 0.54
	Alelo silvestre T	0.13		
IVS1+9494A>C	Alelo polimórfico C	0.87	0.83	$\chi^2=0.38$, p= 0.54
	Alelo silvestre A	0.13		
IVS1+11260A>T	Alelo polimórfico T	0.87	0.83	$\chi^2=0.38$, p= 0.54
	Alelo silvestre A	0.13		
IVS1+11369C>T	Alelo polimórfico T	0.37	0.44	$\chi^2=0.46$, p= 0.50
	Alelo silvestre C	0.63		
IVS1+11637C>T	Alelo polimórfico T	0.37	0.44	$\chi^2=0.46$, p= 0.50
	Alelo silvestre C	0.63		

D.8. Análisis molecular de *RET* en la familia MEN 2A/HSCR: Exclusión de la mutación C620S como causa del fenotipo HSCR.

Una de las 20 familias MEN2/HSCR conocidas hasta la fecha fue publicada por nuestro grupo en 1998 (Figura C.1, Borrego y cols, 1998). En ese trabajo describíamos un pedigrí en el que postulábamos que los fenotipos MEN2A y HSCR estaban asociados a la mutación puntual C620S de *RET*. También se especulaba sobre el papel del polimorfismo A45A, presente en homocigosis en el único componente de la familia con MEN 2A y HSCR. Recientemente ha aparecido un nuevo miembro en la familia que ha desarrollado el fenotipo HSCR, pero que no porta la mutación C620S, si bien es homocigoto para la variante A45A. Este hallazgo tiene importantes repercusiones dado

que parece indicarnos que la mutación C620S no es la causante de HSCR en esta familia. El análisis de la región codificante de los genes *RET*, *EDN3*, *EDNRB*, *GDNF* y *GFRA1* mediante secuenciación directa en el nuevo paciente HSCR (Figura C.1, paciente IV-3) no reveló la presencia de ninguna mutación. Cabe destacar que tras la genotipación de las 7 cSNPs distribuidas por la región codificante de *RET*, encontramos que los dos miembros de la familia con fenotipo HSCR (III-6 y IV-3) eran los únicos homocigotos para la variante A45A. Y lo que es aún más interesante, estos dos casos eran los únicos miembros portadores de la combinación de haplotipos B y C, que se ha demostrado previamente que está fuertemente asociada al fenotipo HSCR (Figura D.23, Borrego y cols, 1999, 2000).

Figura D.23



Además, tras la genotipación de las variantes en el extremo 3' del intrón 1 (IVS1-126G>T, IVS1-1370C>T y IVS1-1463T>C), y de los polimorfismos que acotan la región "ligada a HSCR" en 5' con respecto a *RET* (-200A>G y -196C>A), el análisis reveló que ambos miembros HSCR también portaban la misma combinación de haplotipos (Figura D.23). Más concretamente, observamos que los dos pacientes HSCR llevaban el haplotipo 0 en homocigosis, cuya asociación a HSCR ha sido demostrada previamente (Sección D.8).

E. DISCUSIÓN

E.1. Identificación de una nueva mutación germinal, c.2304G>T, en el exón 13 del proto-oncogén *RET*. Implicación de este cambio en la patogénesis del cáncer medular de tiroides familiar.

Hemos identificado un nuevo cambio de secuencia en el exón 13 de *RET*, nunca antes descrito, en una paciente que presentaba cáncer medular de tiroides como único cuadro clínico (Figura D.1, Antiñolo y cols, 2002). Se trata de una transversión en la última posición del codón 768, que genera un cambio aminoacídico de glutámico a aspártico (E768D). Diferentes argumentos sostienen que esta mutación, c.2304G>T, es la causa del fenotipo observado en la paciente índice. (1) Esta mutación aparece sólo en la paciente con MTC donde fue identificada, y en ninguno de los 75 individuos control sanos, lo que sugiere que no se trata de un polimorfismo común en nuestra población. (2) Por otra parte, la mutación c.2304G>C, que da lugar al mismo cambio aminoacídico (E768D), ha sido identificada previamente por otros grupos en varias familias multigeneracionales con FMTC (Bolino y cols, 1995; Eng y cols, 1995a; Boccia y cols, 1997; Miyauchi y cols, 1997), apoyando la asociación de este cambio de aminoácido con FMTC. Ese cambio también se ha encontrado a nivel somático en los tumores de algunos pacientes MTC esporádicos (Eng y cols, 1994), lo que corrobora el papel patogénico de la mutación en MTC. (3) Además los estudios funcionales han demostrado la capacidad transformadora de E768D-RET en células NIH 3T3 (Pasini y cols, 1997; Iwashita y cols, 1999). (4) Finalmente, la ausencia de otros rasgos clínicos o historia familiar de MEN 2A parece indicar que esta mutación se asocia con el fenotipo FMTC, como se ha descrito previamente en los otros pacientes portadores de E768D hasta hoy día.

Nuestros hallazgos resaltan la importancia de usar un método de diagnóstico molecular adecuado en el análisis de enfermedades genéticas. Antiguamente la detección de la mutación E768D (c.2304G>C) se realizaba mediante restricción con *Alu I*, dado que en presencia de la variante C la enzima pierde un punto de corte. Sin embargo mediante esta técnica jamás hubiéramos llegado a sospechar que el patrón alterado RFLP pudiera deberse a otra mutación diferente que la ya descrita (c.2304G>T y no c.2304G>C). En efecto, cualquier cambio que afecte al segundo o tercer nucleótido del codón 768, origina la pérdida de una diana de restricción *Alu I*. Así por ejemplo, un

cambio GAG por GAA generaría el mismo patrón de restricción que el de las mutaciones E768D, pero a diferencia de ellas, GAA no produciría cambio aminoacídico. Dado que en caso de detección de mutaciones asociadas a los cuadros MEN 2 es aconsejable la práctica de tiroidectomía profiláctica en el individuo, queda patente la necesidad de emplear un método de diagnóstico molecular totalmente fiable. En conjunto nuestras observaciones sitúan a la secuenciación directa bidireccional como la técnica de elección para el diagnóstico molecular de síndromes MEN 2.

E.2. Análisis de polimorfismos genéticos como factores de susceptibilidad para el desarrollo de cáncer medular de tiroides esporádico.

E.2.1. Asociación de la variante S836S del proto-oncogén RET a MTC esporádico.

Hoy por hoy aún se conoce muy poco sobre la etiología del cáncer medular de tiroides esporádico. Aunque se ha encontrado pérdida de heterocigosidad (“*Loss of heterozygosity*”, *LOH*) asociada a MTC esporádico en varios loci (Mulligan y cols, 1993), así como mutaciones somáticas en algunos casos, fundamentalmente afectando al codón 918 de *RET* (Eng y cols, 1994, 1995c, 1996b; Hofstra y cols, 1994), la patogénesis de estos tumores esporádicos sigue sin conocerse en profundidad.

Durante los últimos años, uno de los objetivos fundamentales en la investigación en este campo ha sido la identificación de factores de susceptibilidad para MTC esporádico, así como el esclarecimiento de sus mecanismos moleculares. En este sentido, el primer factor de susceptibilidad genético identificado, fue el cambio c.2439C>T (S836S), localizado en el exón 14 de *RET* (Borrego y cols, 1998), cuya sobre-representación a nivel germinal se detectó en una cohorte de pacientes alemana al comparar con la población general (Gimm y cols, 1999). En este estudio original llevado a cabo por Gimm y cols, se observó que la presencia de la variante S836S se encontraba fuertemente asociada a la aparición a nivel somático de la mutación M918T. De este modo, los autores postulaban que el mecanismo de acción del polimorfismo podría ser la activación de sitios críticos de maduración o la creación de trectos hipermutables en dirección 3', generando consiguientemente la aparición de la mutación

M918T responsable del proceso tumorigénico. Dado que era posible que el fenómeno de asociación de la variante S836S a MTC esporádico pudiera estar restringido a la población alemana, nos dispusimos a determinar si esta asociación también estaba presente en nuestra población mediante un estudio de casos y controles. Por ello analizamos y comparamos la distribución de este polimorfismo, obteniendo una sobre-representación estadísticamente significativa del polimorfismo en el grupo de pacientes al comparar con un grupo de controles ($p= 0.04$). Desafortunadamente no disponíamos de ADN tumoral de los pacientes incluidos en el estudio, por lo que no pudimos evaluar la relación existente entre la presencia de S836S a nivel germinal y la mutación M918T a nivel somático. En cualquier caso nuestros resultados concuerdan con los previamente publicados, apoyando no sólo el hecho de que la variante germinal S836S podría predisponer a MTC esporádico, sino también que esta asociación no está limitada a una única población. Alternativamente esa asociación podría deberse a la existencia de un locus en desequilibrio de ligamiento con S836S, que actuaría como marcador de susceptibilidad a MTC de baja penetrancia. Como se expone más adelante, esta hipótesis ha cobrado más fuerza tras estudios que nuestro grupo ha realizado con posterioridad (Borrego y cols, 2003b).

Por otra parte, otro hecho interesante es la sub-representación de S836S observada en individuos con enfermedad de Hirschsprung. Esta enfermedad, para la que se han descrito mutaciones en *RET* que generan pérdida de función, se puede considerar en cierto modo opuesta a la neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (en la que las mutaciones en *RET* confieren ganancia de función a la proteína resultante). Se han descrito otras variantes polimórficas en *RET*, especialmente A45A localizada en el exón 2, que están fuertemente asociadas a HSCR (Borrego y cols, 1999, 2000; Fitze y cols, 1999), pero la variante S836S está sub-representada en los casos HSCR en comparación con controles sanos (Griseri y cols, 2000, 2002). Por ello, nuestro grupo añadió una nueva posible hipótesis a las formuladas por Gimm y cols.: podría ocurrir que lo que predispone a MTC esporádico no sea la variante S836S *per se*, sino la ausencia de los polimorfismos de *RET* asociados a HSCR, (ausencia que parece estar relacionada con la presencia de la variante en el codón 836; Borrego y cols, 2000, Figura A.9). En cualquier caso, se necesitan estudios funcionales para poder llegar a determinar con

exactitud la base molecular de la asociación de S836S a MTC esporádico (Ruiz y cols, 2001).

E.2.2 Evaluación de variantes de secuencia de los genes *GFRA1*, *GFRA2* y *GFRA3* como factores de susceptibilidad para MTC esporádico

Dado que las mutaciones en *RET* que generan una ganancia de función están asociadas a MTC, sería igualmente factible que mutaciones en genes que codifican para los co-receptores de RET (*GFRA1-4*), o bien para los ligandos de dichos co-receptores (*GDNF*, *NTN*, *ART*, *PSP*) pudieran afectar a la cascada metabólica del receptor y jugar así un papel en la patogénesis de MTC. En este sentido, los genes implicados en la formación del complejo de activación de RET, constituyen por su función un grupo de genes candidatos como genes de susceptibilidad a MTC. De hecho, los resultados de un estudio comparativo entre MTC esporádicos y controles sanos en la población alemana demostraron la sobre-representación del polimorfismo $-193C>G$, situado en el extremo 5'UTR de *GFRA1*, y la sub-representación de $537 T>C$ en el exón 4 del mismo gen (Gimm y cols, 2001). Además, tras analizar la expresión diferencial de *GFRA1* a nivel de ARN mensajero y de proteína se encontró una sobre-expresión en los tumores que portan el polimorfismo $-193C>G$. Estos datos podrían sugerir que $-193C>G$ actúa como un alelo de susceptibilidad de baja penetrancia para el desarrollo de MTC esporádico, mientras que $537 T>C$ podría tener un efecto protector contra el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, los mecanismos precisos de actuación de ambas variantes de secuencia aún no se conocen.

Con el fin de comprobar si este fenómeno de asociación es universal, realizamos un estudio de casos y controles para evaluar el papel de $-193C>G$ y $537T>C$ en la aparición de MTC esporádico en la población española. Tal como se expone detalladamente en la sección de Resultados, también hemos evaluado otra serie de variantes localizadas en los genes *GFRA1-3* como factores de susceptibilidad para este fenotipo. Nuestros resultados muestran que las diferencias en las frecuencias de todas las variantes polimórficas estudiadas no son estadísticamente significativas al comparar los pacientes con MTC esporádico con los controles. Así, la sobre-representación estadísticamente significativa de la variante $-193C>G$ en los casos MTC esporádicos

alemanes en comparación con los controles parece traducirse en una tendencia similar en la serie española. Sin embargo, dado que en la serie española no hay significación estadística, se puede postular que los alelos -193G y 537T podrían estar en desequilibrio de ligamiento con otros loci que confieren predisposición a MTC esporádico en la población alemana, pero no en la española. Esto sugeriría que el fenómeno de asociación en la serie alemana podría ser un evento relativamente reciente, y llegaría a explicar la sobre-representación de -193C>G en los pacientes MTC esporádicos alemanes en comparación con los españoles (15% vs 5%) así como la sub-representación de 537T>C (35% vs 46%) (Tabla D.7). Estos resultados contrastan con la sobre-representación de la variante S836S de *RET*, observada en varias cohortes europeas de MTC esporádicos en comparación con los controles, que sugiere que el fenómeno de asociación de este polimorfismo a la enfermedad podría ser universal y estaría trazando la existencia de un locus ancestral. Se necesitarán estudios futuros en otras poblaciones con diferente *background* y origen geográfico, para poder evaluar y esclarecer el papel de las variantes -193C>G y 537T>C de *GFRA1* en la patogénesis de MTC esporádico (Borrego y cols, 2002).

E.3. Búsqueda de mutaciones germinales en *GFRA4* asociadas al fenotipo HSCR y evaluación del papel de polimorfismos de *GFRA1*, *GFRA2*, *GFRA3* y *GFRA4* en la aparición de la enfermedad.

El papel crucial de *RET* en la etiología de HSCR, convirtió a todos los genes que codifican para proteínas del complejo heteromultimérico que interacciona con RET en genes candidatos para la enfermedad (*GDNF*, *NTN*, *ART*, *PSP*, *GFRA1-4*...). Esta hipótesis resultó particularmente atractiva al comprobarse en el modelo murino *knockout* de *GDNF* la existencia de megacolon agangliónico y agenesia renal (un fenotipo equivalente al observado previamente en el ratón *knockout* de *RET*, Sánchez y cols, 1996). Sin embargo, el análisis molecular directo del gen *GDNF* en las cohortes HSCR disponibles parece indicar que las mutaciones en este gen son raras (no más del 2% de los pacientes HSCR tienen una mutación en *GDNF* en línea germinal). Además, en 4 de los 5 pacientes con mutaciones en *GDNF* había otras alteraciones relacionadas con el fenotipo HSCR, como trisomía 21 o mutaciones germinales en *RET* (Angrist y

cols, 1996; Salomon y cols, 1996). Una situación equivalente se observó con el análisis molecular de *NTN* dado que sólo ha aparecido una familia HSCR con una mutación en este gen y no está aclarada su patogenicidad (Doray y cols, 1998). Por otra parte, el análisis molecular de los genes que codifican para 3 de los co-receptores de RET (*GFRA1*, *GFRA2* y *GFRA3*) no reveló ninguna mutación asociada a HSCR (Angrist y cols, 1998; Myers y cols, 1999; Onochie y cols, 2000; Vanhorne y cols, 2001). Esto parecía indicar que estos 3 genes no son responsables de la aparición de HSCR aunque no permitía descartar que pudieran actuar como genes modificadores del cuadro.

A diferencia de *GFRA1*, *GFRA2* y *GFRA3*, el gen *GFRA4* no había sido evaluado aún como gen de susceptibilidad para la enfermedad de Hirschsprung. Por este motivo nos planteamos realizar un rastreo de este gen en búsqueda de mutaciones asociadas HSCR. Además, los genes *GFRA1-4* son excelentes candidatos para actuar como alelos de baja penetrancia que confieran predisposición a HSCR esporádico, y podrían interaccionar con las variantes de secuencia de *RET* u otras variantes en otros genes para modular la enfermedad. Por ello, hemos evaluado un total de 13 polimorfismos de estos genes como factores de susceptibilidad para la enfermedad de HSCR en nuestra cohorte de pacientes.

Al igual que ocurría con los genes que codifican los primeros 3 co-receptores de *RET*, no se encontraron mutaciones germinales asociadas a HSCR en el gen *GFRA4*. Además, el análisis comparativo de la distribución de las variantes de los 4 genes en la serie HSCR frente al grupo control no mostró desviaciones significativas entre ambos grupos.

Por otra parte, tal como se describe en detalle en la sección de Resultados, el desarrollo de este estudio nos permitió identificar una gran deleción en el extremo 5' del gen *GFRA1* en una familia HSCR. Sin embargo no creemos que esta deleción pueda ser una mutación deletérea en el sentido tradicional, dado que tanto el paciente HSCR como los miembros sanos de su familia portan el mismo rearreglo. Por este motivo, la significación funcional de esta deleción en *GFRA1* se desconoce por el momento.

En definitiva, ninguno de los genes *GFRA1-4* parece contribuir de manera significativa a la etiología de HSCR, al menos en las formas esporádicas de la enfermedad. Resulta difícil comprender la falta de mutaciones germinales tradicionales en los genes de los co-receptores dada la gran implicación de *RET* en la patogénesis de

HSCR, tanto esporádico como familiar. Esto se podría explicar en base a las funciones solapantes de los co-receptores y la reactividad cruzada de los ligandos (Borrego y cols, 2003a). No obstante existen muchos otros genes candidatos para HSCR, como todos los que codifican proteínas que participan en la cascada metabólica de RET, cuyo análisis podría quizá ayudar a esclarecer el conocimiento sobre la patogénesis de HSCR.

E.4 Identificación de un nuevo locus de susceptibilidad para HSCR en el proto-oncogén *RET*.

El proto-oncogén *RET* es sin lugar a dudas el principal locus asociado a HSCR. Los resultados de diferentes estudios parecen demostrar que mutaciones que causan HSCR podrían producir haploinsuficiencia estructural y funcional y déficit de la cascada de señalización del receptor RET en los tejidos diana (Pasini y cols, 1995b; Pelet y cols, 1998). También se ha propuesto que el mecanismo de algunas mutaciones asociadas a la enfermedad podría consistir en la activación de motivos funcionales críticos proapoptóticos en la proteína RET mutante, que conducirían a una apoptosis prematura (Bordeaux y cols, 2000). Por otra parte, 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. Estos alelos se han identificado empleando polimorfismos comunes a lo largo de la secuencia del proto-oncogén *RET*, sobre los que se han efectuado estudios de asociación genética o de desequilibrio de transmisión en familias HSCR con penetrancia incompleta (Borrego y cols, 1998, 1999, 2000; Fitze y cols, 1999; Bolk y cols, 2000; Griseri y cols, 2000). La primera variante que se describió asociada a HSCR fue A45A, cuya sobre-representación se ha demostrado en varias series de pacientes con diferente background genético, tales como la española, alemana, italiana o china (Borrego y cols, 1999, 2000; Fitze y cols, 1999; García-Barceló y cols, 2003b; Sancandi y cols, 2003). Inicialmente se propusieron mecanismos directos de actuación de este polimorfismo, tales 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 ARNt específicos que disminuiría la eficiencia de la traducción del alelo que porta el polimorfismo (Borrego y cols, 1999, 2000). Sin

embargo aún no se han reportado resultados de estudios funcionales que verifiquen estas hipótesis. Por otra parte, se propuso la existencia de desequilibrio de ligamiento de la variante A45A con algún locus funcional desconocido por aquel momento (Borrego y cols, 1999, 2000; Fitze y cols, 1999). Más concretamente, nuestro grupo había obtenido una serie de resultados por *TDT* y *LD mapping*, que sugerían la existencia de un locus ancestral asociado a los haplotipos que contienen A45A, ubicado en 5' respecto a esta variante, en un intervalo de 0-20Kb. Por ello nos planteamos el rastreo del intrón 1 de *RET*, con el fin de identificar dicho locus. Con los datos extraídos del análisis del extremo 3' del intrón, presentados en la sección de Resultados D.7.2, parecía claro que el polimorfismo A45A, independientemente del haplotipo hacia 3', está en desequilibrio de ligamiento con un grupo de marcadores del intrón 1 de *RET* (haplotipo 0-A45A, Tabla D.11). Es decir, la sub-representación de los nuevos loci del extremo 3' intrónico descritos en la cohorte HSCR, podría explicarse en base a que la variante polimórfica en el codón 45 (c.135A), está en desequilibrio de ligamiento completo con las variantes silvestres en los loci IVS1-126, IVS1-1370 e IVS1-1463. Usando el programa MatInspector, el análisis bioinformático de la región en la que se encuentran los tres polimorfismos intrónicos predice cuatro motivos que podrían ser sitios de unión de factores de transcripción BRN2, NFAT, IRF1 e IRF2 en presencia de IVS1-1463T (alelo silvestre, asociado a HSCR). Cuando está presente la variante IVS1-1463C, se destruye el sitio de unión a BRN2, y aparece un nuevo sitio de unión al factor de transcripción OCT1. Más aún, en presencia de esta variante los dos sitios IRF se refuerzan mientras que se debilita el sitio NFAT. De manera similar, este programa también predice que en presencia de IVS1-126G (asociada a HSCR) hay un sitio de unión a TCF1. En cambio, en presencia de la variante T en esta posición, se crea un motivo NFAT. Desafortunadamente, aún no se han realizado estudios *in vivo* o *in vitro* para confirmar estas predicciones bioinformáticas, por lo que es necesario continuar con el trabajo experimental para probar la significación funcional de estos sitios de unión a factores de transcripción.

Con el análisis de todos estos nuevos resultados se pudieron hacer nuevos cálculos de *LD-mapping*, que 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 continuamos 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 (Borrego y cols, 2003b). Aunque no encontramos mutaciones germinales en nuestros pacientes, sí detectamos un total de 25 nuevos polimorfismos que mostraron encontrarse en desequilibrio de ligamiento con el llamado haplotipo 0 (IVS1-1473T, IVS1-1370C, IVS1-126G; Borrego y cols, 2003b) 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 *LD* se mantenía a lo largo de toda la región analizada hasta la posición -1249, dónde la falta de asociación de alelos específicos con la enfermedad sugiere que el *LD* se rompe. La importancia de estos resultados reside en el hallazgo de un punto de ruptura del *LD* ("*LD-breakpoint*") que nos permite acotar en 5' la región de *RET* ligada a HSCR. Nuestros resultados parecen descartar la existencia de una mutación causante de HSCR tal como se concibe en el sentido tradicional, pero refuerzan 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 sería plausible que el alelo *RET* resultante, en conjunto con otros factores de susceptibilidad en otros genes, pudieran dar lugar a la aparición del fenotipo, lo que estaría en consonancia con un modelo de enfermedad poligénica y multifactorial para HSCR. Sin embargo, el mecanismo preciso de actuación de este alelo *RET* no está muy claro. 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 ha realizado estudios funcionales basados en la medida de la actividad luciferasa, demostrando que la combinación -200A,-196C, claramente asociada a HSCR, da lugar a una actividad significativamente menor que la que originan el resto de haplotipos identificados en la mayoría de los controles normales. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros grupos (Fitze y cols, 2003b). La interpretación más factible de esos hallazgos sería que las variantes del promotor de *RET* influyen en su grado de expresión, aunque hasta el momento no se ha podido llegar a comprobar que afecten a la unión de ningún factor

de transcripción (Fitze y cols, 2003b). Descifrar el auténtico mecanismo patogénico del alelo *RET* asociado a HSCR es nuestro objetivo fundamental, puesto que contribuiría al esclarecimiento de la base genética de la enfermedad.

E.5 Identificación de un nuevo locus de susceptibilidad para MTC esporádico en el proto-oncogén *RET*.

En nuestra opinión, uno de los hallazgos más interesantes derivados del análisis del extremo 3' del intrón 1 de *RET* es el descubrimiento de que existe un haplotipo de riesgo para MTC esporádico (haplotipo 2: IVS1-1473C, IVS1-1370C, IVS1-126T; Tabla D.11), en la misma región genómica en la que hay un haplotipo de riesgo para HSCR (haplotipo 0). En realidad, la variante que muestra estar sobre-representada de forma estadísticamente significativa entre los pacientes MTC esporádicos es el cambio IVS1-126G>T. Además esta asociación se ha confirmado en dos series independientes de 51 y 104 pacientes MTC esporádicos respectivamente (Secciones D.7.2.3 y D.7.2.5), lo que ha permitido desechar la idea de que se hubiera obtenido una asociación azarosa debido a un tamaño muestral pequeño (Fernández y cols, 2004). Tal como se expone en la sección E.2.1, nuestro grupo había comprobado con anterioridad la sobre-representación del cSNP S836S en la cohorte MTC esporádica española, corroborando los resultados obtenidos previamente en una cohorte alemana. Además, a este mismo marcador se le ha atribuido un efecto protector contra la aparición del fenotipo HSCR, que es opuesto al fenotipo MTC (Griseri y cols., 2000). Hay dos hechos que apoyan con firmeza el desequilibrio de ligamiento entre S836S y el haplotipo 2 del intrón 1: 1) Hemos observado en nuestra cohorte que todos los pacientes portadores de S836S también portan el haplotipo 2. 2) Los resultados del estudio preliminar en la cohorte de pacientes de origen alemán muestran una alta frecuencia de homocigotos para el haplotipo 2. Estos hallazgos sugerirían la existencia de un locus de susceptibilidad de baja penetrancia para MTC, ligado al haplotipo 2 y S836S, que podría encontrarse también en dirección 5' (Borrego y cols, 2003b). Sin embargo, el análisis del resto de las variantes del intrón 1 y promotor de *RET* posteriormente identificadas, ha demostrado la falta de asociación de las mismas con MTC esporádico. No obstante, hasta el momento sólo se han evaluado los polimorfismos situados en el promotor y en

las primeras 12 kilobases del intrón 1, por lo que ese locus MTC podría situarse en alguna región dentro de la zona intrónica que aún falta por rastrear (entre las posiciones IVS1+11637C>T e IVS1-1473T>C, Figura D.17). Además sería factible que este locus no sólo actúe por sí mismo como locus de susceptibilidad para MTC, sino que también interactúe con otras variantes y con mutaciones tradicionales asociadas a MEN 2, para modular el desarrollo de la clínica, o la edad de aparición de la enfermedad.

También podríamos especular sobre el mecanismo de acción directo de la variante asociada a MTC esporádico, IVS1-126G>T. Sin embargo, como se ha explicado en el apartado E.4, aunque existen datos *in silico* que predicen la modificación de la afinidad de unión a factores de transcripción en presencia del cambio, aún no se disponen de resultados que permitan aclarar la significación funcional de esta variante. Debemos continuar por consiguiente con el análisis minucioso de esta región para poder profundizar en el conocimiento de la base genética del cáncer medular de tiroides esporádico.

E.6. Exclusión de la mutación C620S de *RET* como causante del fenotipo HSCR en una familia MEN 2A /HSCR.

En 1998 nuestro grupo publicó un trabajo en el que se describía una familia donde cosegregaban los cuadros MEN 2A y HSCR, asumiéndose que ambos fenotipos eran causados por la mutación puntual C620S de *RET* (Borrego y cols, 1998, Figura A.1, Figura D.23). En un principio esta mutación, consistente en una transversión de G a C, y que genera una sustitución de cisteína por serina, se había identificado en 4 miembros de la familia, incluyendo al paciente en el que cosegregan los dos cuadros. En virtud de los resultados funcionales llevados a cabo por Ito y cols en 1997, nosotros habíamos explicado la coexistencia de MEN 2A y HSCR atribuyendo un doble efecto a la mutación C620S : por una parte, esta transversión conduciría a una ganancia de función del receptor, originando MEN 2A; por otra parte, la mutación podría afectar al transporte del receptor hacia la membrana causando HSCR. Además, también postulábamos que podría darse un segundo evento genético para facilitar la coexpresión de los fenotipos MEN 2 y HSCR. En este sentido, especulábamos que la presencia del polimorfismo A45A en homocigosis en el paciente MEN 2A/HSCR, o quizás la

presencia de esta variante en *trans* con respecto a C620S, podría de alguna manera favorecer la expresión de los dos cuadros en el mismo individuo.

Nuestro grupo y otros habíamos intentado explicar previamente la co-segregación de MEN 2 y Hirschsprung causados por la misma mutación de *RET*, sugiriendo que esta mutación podría estar dotada de efectos opuestos dependiendo del tejido en el que el receptor se exprese. En base a los datos disponibles, la hipótesis más aceptada es que los bajos niveles de dímeros covalentes de RET producidos por las mutaciones de Cys609, 618 o 620 serían suficientes para desencadenar la proliferación neoplásica de las células C del tiroides, conduciendo a la generación de tumores endocrinos. Por otra parte este hecho no compensaría la total disminución de los receptores RET expresados en la superficie celular, con lo que se transmitiría una señal por debajo del umbral requerido para generar una respuesta trófica en los precursores de las neuronas entéricas, conduciendo con ello a HSCR.

En un principio el fenotipo presente en nuestra familia era concordante con esta hipótesis. Sin embargo, el reciente descubrimiento de un nuevo miembro de la familia con HSCR que no porta C620S (paciente IV.3), nos ha llevado a excluir esta mutación como la causante del fenotipo HSCR. Dada la incidencia de la enfermedad, y la presencia de tres pacientes HSCR en la misma familia (III.3, III.6, y IV.3, Figura D.23), la posibilidad de que el fenotipo haya sido producido por diferentes eventos genéticos en cada uno de estos pacientes es remota. Por consiguiente, nuestros resultados parecen excluir la hipótesis de que la mutación C620S por sí sola sea la causa tanto de HSCR como de MEN 2A en nuestra familia (Fernández y cols, 2003).

Es posible postular que la causa genética de HSCR en esta familia podría encontrarse en otra región de *RET* o en otros genes de susceptibilidad anteriormente descritos. Sin embargo, los resultados negativos en el rastreo mutacional de la región codificante de *RET*, *EDN3*, *EDNRB*, *GDNF*, *NTN*, y *GFRA1* en los dos miembros HSCR vivos de la familia, excluiría a estos genes como la causa del fenotipo en esta familia particular, al menos en el sentido tradicional.

Hoy día se sabe que la enfermedad de Hirschsprung es poligénica, con lo que podría ser necesaria la intervención de varios genes para modular la expresión del fenotipo. De hecho, se han llevado a cabo un buen número de estudios para evaluar el papel de ciertas variantes de secuencia de los genes que codifican para los componentes

del complejo multimérico de *RET*, en el desarrollo de HSCR (Angrist y cols, 1998; Borrego y cols, 1999, 2000, 2003a, 2003b; Fitze y cols, 1999; Griseri y cols, 2000; Sancandi y cols, 2000, Vanhorne y cols, 2001). En efecto, se ha demostrado la asociación con la enfermedad de ciertas variantes de *RET*, tales como A45A, L769L, y un amplio número de variantes del intrón 1 y del promotor, en diferentes cohortes de pacientes HSCR esporádicos (Borrego y cols, 1999, 2003b; Fitze y cols, 1999, 2003b; García-Barceló y cols, 2003b; Sancandi y cols, 2003). Resulta interesante el hecho de que los dos pacientes HSCR de nuestra familia sean los únicos miembros que portan en homocigosis la combinación de marcadores definida como haplotipo de riesgo para HSCR (Borrego y cols, 2003b, Fitze y cols, 2003b; Sancandi y cols, 2003). En este sentido nuestros hallazgos estarían de acuerdo con la presencia de un alelo *RET*, que confiere susceptibilidad a HSCR con baja penetrancia. Como se ha planteado anteriormente, sería plausible que su mecanismo de actuación fuese la reducción de la actividad transcripcional de *RET* aunque se necesitan nuevos ensayos funcionales para poder llegar a determinarlo con exactitud.

F. CONCLUSIONES

F.1. Se ha caracterizado una nueva mutación en el proto-oncogén *RET*, c.2304G>T (E768D), en una paciente con cáncer medular de tiroides. La ausencia de otros rasgos clínicos o historia familiar de MEN 2A parece indicar que esta mutación se asocia con el fenotipo FMTC.

F.2. El fenómeno de asociación de las variantes -193C>G y 537T>C del gen *GFRA1* a las formas esporádicas de MTC en la población alemana no es reproducible en la población española. Ninguna de las variantes de los genes *GFRA1-3* parecen ser factores de susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad en nuestra población.

F.3. Tanto el análisis mutacional como la evaluación de los polimorfismos en los genes *GFRA1*, *GFRA2*, *GFRA3* y *GFRA4* como factores de susceptibilidad para HSCR, descartan estos genes como responsables en la patogénesis de la enfermedad.

F.4. Se han identificado dos variantes de secuencia en el proto-oncogén *RET* sobre-representadas en nuestra serie MTC, S836S e IVS1-126G>T. Estos hallazgos sugieren la existencia de un locus de susceptibilidad de baja penetrancia para MTC, ligado a ambas variantes, que podría localizarse en dirección 5'.

F.5. Hemos identificado un alelo específico del proto-oncogén *RET*, asociado a las formas esporádicas de la enfermedad de Hirschsprung. Los estudios funcionales *in vitro* parecen indicar que dicho alelo provoca una disminución del nivel de expresión del gen *RET*. Estos resultados sostienen que este alelo, probablemente en conjunción con otros factores de susceptibilidad, es causante de la aparición de HSCR esporádico.

F.6. La mutación C620S del proto-oncogén *RET* es la causante del cuadro MEN 2A, pero no de la enfermedad de HSCR en una familia en la que cosegregan ambos fenotipos, descartándose por tanto el efecto dual propuesto por otros autores para dicha mutación.

G. REFERENCIAS

- 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.
- 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.
- Amiel J, Attie T, Jan D, Pelet A, Edery P, Bidaud C, Lacombe D, Tam P, Simeoni J, Flori E, Nihoul-Fekete C, Munnich A, Lyonnet S. Heterozygous endothelin receptor B (*EDNRB*) mutations in isolated Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 5: 355-357, 1996.
- Amiel J, Salomon R, Attie T, Pelet A, Trang H, Mokhtari M, Gaultier C, Munnich A, Lyonnet S. Mutations of the RET-GDNF signaling pathway in Ondine's curse. *Am J Hum Genet* 62: 715-717, 1998.
- 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, Boute O, Choiset A, Lacombe D, Philip N, Le Merrer M, Tanaka H, Till M, Touraine R, Toutain A, Vekemans M, Munnich A, Lyonnet S. Large-scale deletions and *SMAD1P1* 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, Trochet D, Etchevers H, Ray P, Simonneau M, Vekemans M, Munnich A, Gaultier C, Lyonnet S. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene *PHOX2B* in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet* 33: 459-461, 2003.

- Anders J, Kjar S, Ibanez CF. Molecular modeling of the extracellular domain of the RET receptor tyrosine kinase reveals multiple cadherin-like domains and a calcium-binding site. *J Biol Chem* 276:35808-35817, 2001.
- Angrist M, Kauffman E, Slaugenhaupt SA, Matise TC, Puffenberger EG, Washington SS, Lipson A, Cass DT, Reyna T, Weeks DE, Sieber W, Chakravarti A. 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, Cass DT, Chakravarti A. 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, Fox GM, Chakravarti A. Human *GFRAL*: cloning, mapping, genomic structure, and evaluation as a candidate gene for Hirschsprung disease susceptibility. *Genomics* 48: 354-362, 1998.
- Antiñolo G, Marcos I, Fernández RM, Romero M, Borrego S. A novel germline point mutation, c.2304 G-->T, in codon 768 of the *RET* proto-oncogene in a patient with medullary thyroid carcinoma. *Am J Med Genet* 110: 85-87, 2002.
- Arighi E, Alberti L, Torriti F, Ghizzoni S, Rizzetti MG, Pelicci G, Pasini B, Bongarzone I, Piutti C, Pierotti MA, Borrello MG. Identification of Shc docking site on Ret tyrosine kinase. *Oncogene* 14: 773-782, 1997.
- 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, Boutrand L, Beldjord C, Nihoul-Fekete C, Munnich A, Ponder BAJ, Lyonnet S. 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, Munnich A, Lyonnet S. Mutation of the endothelin-receptor B gene in Waardenburg-Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 4: 2407-2409, 1995b.
- 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.
- Avantaggiato V, Dathan NA, Grieco M, Fabien N, Lazzaro D, Fusco A, Simeone A, Santoro M. 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.
- Baloh RH, Tansey MG, Lampe PA, Fahrner TJ, Enomoto H, Simburger KS, Leitner ML, Araki T, Johnson EM Jr, Milbrandt J. 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.
- Benailly HK, Lapierre JM, Laudier B, Amiel J, Attie T, De Blois MC, Vekemans M, Romana SP. *PMX2B*, a new candidate gene for Hirschsprung's disease. *Clin Genet* 64: 204-209, 2003.

- Berndt I, Reuter M, Saller B, Frank-Raue K, Groth P, Grussendorf M, Raue F, Ritter MM, Hoppner W. A new hot spot for mutations in the ret protooncogene causing familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2A. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 770-774, 1998.
- Bidaud C, Salomon R, Van Camp G, Pelet A, Attie T, Eng C, Bonduelle M, Amiel J, Nihoul-Fekete C, Willems PJ, Munnich A, Lyonnet S. Endothelin-3 gene mutations in isolated and syndromic Hirschsprung disease. *Eur J Hum Genet* 5: 247-251, 1997.
- Blank RD, Sklar CA, Dimich AB, Luaglia MP, Brennan MF. Clinical presentation and *RET* protooncogene mutations in seven multiple endocrine neoplasia type 2 kindreds. *Cancer* 78: 1996-2003, 1996.
- Boccia LM, Green JS, Joyce C, Eng C, Taylor SA, Mulligan LM. Mutation of *RET* codon 768 is associated with the FMTC phenotype. *Clin Genet* 51: 81-85, 1997.
- Bocciardi R, Mograbi B, Pasini B, Borrello MG, Pierotti MA, Bourget I, Fischer S, Romeo G, Rossi B. The multiple endocrine neoplasia type 2B point mutation switches the specificity of the Ret tyrosine kinase towards cellular substrates that are susceptible to interact with Crk and Nck. *Oncogene* 15: 2257-2265, 1997.
- Bodian M, Carter C. A family study of Hirschsprung disease. *Ann Hum Genet* 26: 261, 1963.
- Bolino A, Schuffenecker I, Luo Y, Seri M, Silengo M, Tocco T, Chabrier G, Houdent C, Murat A, Schlumberger M, Tourniaire J, Lenoir GM, Romeo G. *RET* mutations in exons 13 and 14 of FMTC patients. *Oncogene* 10: 2415-2419, 1995.

- 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* 13: 395-396, 1996.
- 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 U S A* 97: 268-273, 2000.
- Bordeaux MC, Forcet C, Granger L, Corset V, Bidaud C, Billaud M, Bredesen DE, Edery P, Mehlen P. The *RET* proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. *EMBO J* 19: 4056-4063, 2000.
- 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, Eng C. 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, Hernandez A, Wright FA, Antinolo G, Eng C. *RET* genotypes comprising specific haplotypes of polymorphic variants predispose to isolated Hirschsprung disease. *J Med Genet* 37: 572-578, 2000.
- Borrego S, Fernández RM, Dziema H, Japón MA, Marcos I, Eng C, Antiñolo G. Evaluation of germline sequence variants of *GFRA1*, *GFRA2*, and *GFRA3* genes in a cohort of Spanish patients with sporadic medullary thyroid cancer. *Thyroid* 12: 1017-1022, 2002.

- Borrego S, Fernández RM, Dziema H, Niess A, López-Alonso M, Antiñolo G, Eng C. 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, 2003a.
- Borrego S, Wright FA, Fernández RM, Williams N, López-Alonso M, Davuluri R, Antiñolo G, Eng C. 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, 2003b.
- Borrello MG, Pelicci G, Arighi E, De Filippis L, Greco A, Bongarzone I, Rizzetti M, Pelicci PG, Pierotti MA. 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, Arighi E, Miranda C, Eng C, Alberti L, Bocciardi R, Mondellini P, Scopsi L, Romeo G, Ponder BAJ, Pierotti MA. RET activation by germline MEN2A and MEN2B mutations. *Oncogene* 11: 2419-2427, 1995.
- Borrello MG, Alberti L, Arighi E, Bongarzone I, Battistini C, Bardelli A, Pasini B, Piutti C, Rizzetti MG, Mondellini P, Radice MT, Pierotti MA. The full oncogenic activity of Ret/*ptc2* depends on tyrosine 539, a docking site for phospholipase Cgamma. *Mol Cell Biol* 16: 2151-2163, 1996.
- Borst MJ, VanCamp JM, Peacock ML, Decker RA. Mutational analysis of multiple endocrine neoplasia type 2A associated with Hirschsprung's disease. *Surgery* 117: 386-391, 1995.
- Bottani A, Xie YG, Binkert F, Schinzel A. A case of Hirschsprung disease with a chromosome 13 microdeletion, del(13)(q32.3q33.2): potential mapping of one disease locus. *Hum Genet* 87: 748-750, 1991.

- Bronner-Fraser M. Segregation of cell lineage in the neural crest. *Curr Opin Genet Dev* 3: 641-647, 1993.
- 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*
- Buj-Bello A, Adu J, Pinon LG, Horton A, Thompson J, Rosenthal A, Chinchetru M, Buchman VL, Davies AM. Neurturin responsiveness requires a GPI-linked receptor and the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 387: 721-724, 1997.
- Cacheux V, Dastot-Le Moal F, Kaariainen H, Bondurand N, Rintala R, Boissier B, Wilson M, Mowat D, Goossens M. Loss-of-function mutations in *SIP1* Smad interacting protein 1 result in a syndromic Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 10: 1503-1510, 2001.
- Califano D, Monaco C, de Vita G, D'Alessio A, Dathan NA, Possenti R, Vecchio G, Fusco A, Santoro M, de Franciscis V. Activated RET/PTC oncogene elicits immediate early and delayed response genes in PC12 cells. *Oncogene* 11: 107-112, 1995.
- Califano D, Rizzo C, D'Alessio A, Colucci-D'Amato GL, Cali G, Bartoli PC, Santelli G, Vecchio G, de Franciscis V. Signaling through Ras is essential for ret oncogene-induced cell differentiation in PC12 cells. *J Biol Chem* 275: 19297-19305, 2000.
- Carlomagno F, De Vita G, Berlingieri MT, de Franciscis V, Melillo RM, Colantuoni V, Kraus MH, Di Fiore PP, Fusco A, Santoro M. Molecular heterogeneity of *RET* loss of function in Hirschsprung's disease. *EMBO J* 15: 2717-2725, 1996.
- Carlson KM, Dou S, Chi D, Scavarda N, Toshima K, Jackson CE, Wells SA Jr, Goodfellow PJ, Donis-Keller H. Single missense mutation in the tyrosine kinase

- catalytic domain of the RET protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. Proc Natl Acad Sci U S A. 91: 1579-1583, 1994.
- Caron P, Attie T, David D, Amiel J, Brousset F, Roger P, Munnich A, Lyonnet S. C618R mutation in exon 10 of the *RET* proto-oncogene in a kindred with multiple endocrine neoplasia type 2A and Hirschsprung's disease. J Clin Endocrinol Metab 81: 2731-2733, 1996.
- 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, Romeo G. Exon structure and flanking intronic sequences of the human *RET* proto-oncogene. Biochem Biophys Res Commun 196: 1288-1295, 1993.
- 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.
- Chappuis-Flament S, Pasini A, De Vita G, Segouffin-Cariou C, Fusco A, Attie T, Lenoir GM, Santoro M, Billaud M. Dual effect on the RET receptor of MEN 2 mutations affecting specific extracytoplasmic cysteines. Oncogene 17: 2851-2861, 1998.
- Chretien P, Blanchard L, Gaboury L, Lacroix A, Verdy M, Villeneuve L. Cosegregation of Hirschsprung's disease (HSCR) and a RET mutation in a French Canadian family with MEN 2A. Am J Hum Genet 55:A357, 2002, 1994.

- Cohen IT, Gadd MA. Hirschsprung's disease in a kindred: a possible clue to the genetics of the disease. *J Pediatr Surg* 17: 632-634, 1982.
- Colucci-D'Amato GL, D'Alessio A, Califano D, Cali G, Rizzo C, Nitsch L, Santelli G, de Franciscis V. Abrogation of nerve growth factor-induced terminal differentiation by ret oncogene involves perturbation of nuclear translocation of ERK. *J Biol Chem* 275: 19306-19314, 2000.
- Couplier 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.
- Dang GT, Cote GJ, Schultz PN, Khorana S, Decker RA, Gagel RF. A codon 891 exon 15 *RET* proto-oncogene mutation in familial medullary thyroid carcinoma: a detection strategy. *Mol Cell Probes* 13: 77-79, 1999.
- Decker RA, Peacock ML, Watson P. Hirschsprung disease in MEN 2A: increased spectrum of *RET* exon 10 genotypes and strong genotype-phenotype correlation. *Hum Mol Genet* 7: 129-134, 1998.
- del Tito BJ, Poff HE, Novotny MA, Cartledge DM, Walker RI, Earl CD, Bailey AL. Automated fluorescent analysis procedure for enzymatic mutation detection. *Clin Chem* 44: 731-9, 1998.
- Doray B, Salomon R, Amiel J, Pelet A, Touraine R, Billaud M, Attie T, Bachy B, Munnich A, Lyonnet S. Mutation of the RET ligand, neurturin, supports multigenic inheritance in Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 7: 1449-1452, 1998.
- 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.
- Edery P, Lyonnet S, Mulligan LM, Pelet A, Dow E, Abel L, Holder S, Nihoul-Fekete C, Ponder BA, Munnich A. 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, Martelli H, Bidaud C, Munnich A, Lyonnet S. Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat Genet* 12: 442-444, 1996.
- Emir H, Akman M, Sarimurat N, Kilic N, Erdogan E, Soylet Y. Anorectal manometry during the neonatal period: its specificity in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *Eur J Pediatr Surg* 9: 101-103, 1999.
- Eng C, Smith DP, Mulligan LM, Nagai MA, Healey CS, Ponder MA, Gardner E, Scheumann GF, Jackson CE, Tunnacliffe A, Ponder BAJ. 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, Smith DP, Mulligan LM, Healey CS, Zvelebil MJ, Stonehouse TJ, Ponder MA, Jackson CE, Waterfield MD, Ponder BA. A novel point mutation in the tyrosine kinase domain of the *RET* proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma and in a family with FMTC. *Oncogene* 10: 509-513, 1995a.
- Eng C, Mulligan LM, Smith DP, Healey CS, Frilling A, Raue F, Neumann HP, Ponder MA, Ponder BA. Low frequency of germline mutations in the *RET* proto-oncogene in patients with apparently sporadic medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol* 43: 123-127, 1995b.

- Eng C, Mulligan LM, Smith DP, Healey CS, Frilling A, Raue F, Neumann HP, Pfragner R, Behmel A, Lorenzo MJ, Stonehouse TJ, Ponder MA, Ponder BAJ. Mutation of the *RET* protooncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 12: 209-212, 1995c.
- Eng C. The *RET* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 and Hirschsprung's disease. *N Engl J Med* 335: 943-951, 1996.
- Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, Ploos van Amstel H K, 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. 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, 1996a.
- Eng C, Mulligan LM, Healey CS, Houghton C, Frilling A, Raue F, Thomas GA, Ponder BA. Heterogeneous mutation of the *RET* proto-oncogene in subpopulations of medullary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 56: 2167-2170, 1996b.
- Eng C, Thomas GA, Neuberg DS, Mulligan LM, Healey CS, Houghton C, Frilling A, Raue F, Williams ED, Ponder BA. Mutation of the *RET* proto-oncogene is correlated with RET immunostaining in subpopulations of cells in sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 4310-4313, 1998.
- 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, Davies AM. 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, Milbrandt J. GFR alpha1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. *Neuron* 21: 317-324, 1998.
- 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: 412-415, 2003.
- Fernández RM, Robledo M, Antiñolo G, Peciña A, Ruiz-Llorente S, Eng C, Borrego S. The *RET* IVS1-126G>T variant is strongly associated with the development of sporadic medullary thyroid cancer. *Thyroid*, en prensa.
- Fink M, Weinhusel A, Niederle B, Haas OA. Distinction between sporadic and hereditary medullary thyroid carcinoma (MTC) by mutation analysis of the *RET* proto-oncogene. "Study Group Multiple Endocrine Neoplasia Austria (SMENA)". *Int J Cancer* 69: 312-316, 1996.
- 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, Roesner D, Schackert HK. Association between c135G/A genotype and *RET* protooncogene germline mutations and phenotype of Hirschsprung's disease. *Lancet* 359: 1200-1205, 2002.

- Fitze G, Cramer J, Serra A, Schreiber M, Roesner D, Schackert HK. Within-gene interaction between c.135 G/A genotypes and *RET* proto-oncogene germline mutations in HSCR families. *Eur J Pediatr Surg* 13: 152-157, 2003a.
- Fitze G, Appelt H, König IR, Gorgens H, Stein U, Walther W, Gossen M, Schreiber M, Ziegler A, Roesner D, Schackert HK. Functional haplotypes of the *RET* proto-oncogene promoter are associated with Hirschsprung disease (HSCR). *Hum Mol Genet* 12: 3207-3214, 2003b.
- Farndon JR, Leight GS, Dilley WG, Baylin SB, Smallridge RC, Harrison TS, Wells SA Jr. Familial medullary thyroid carcinoma without associated endocrinopathies: a distinct clinical entity. *Br J Surg* 73: 278-281, 1986.
- Gabriel SB, Salomon R, Pelet A, Angrist M, Amiel J, Fornage M, Attie-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* 31: 89-93, 2002.
- 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, Yung SK, Romeo G, Tam PK. Chinese patients with sporadic Hirschsprung's disease are predominantly represented by a single *RET* haplotype. *J Med Genet* 40:e122, 2003b.
- Gimm O, Marsh DJ, Andrew SD, Frilling A, Dahia PL, Mulligan LM, Zajac JD, Robinson BG, Eng C. Germline dinucleotide mutation in codon 883 of the *RET* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B without codon 918 mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3902-3904, 1997.

- Gimm O, Neuberg DS, Marsh DJ, Dahia PL, Hoang-Vu C, Raue F, Hinze R, Dralle H, Eng C. 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, Hoang-Vu C, Hinze R, Dralle H, Mulligan LM, Eng C. Over-representation of a germline variant in the gene encoding RET co-receptor GFRalpha-1 but not GFRalpha-2 or GFRalpha-3 in cases with sporadic medullary thyroid carcinoma. *Oncogene* 20: 2161-2170, 2001.
- 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.
- 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, Devoto M, Romeo G, Ceccherini I. 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, Pesce B, Patrone G, Osinga J, Puppo F, Sancandi M, Hofstra R, Romeo G, Ravazzolo R, Devoto M, Ceccherini I. A rare haplotype of the *RET* proto-oncogene is a risk-modifying allele in Hirschsprung disease. *Am J Hum Genet* 71: 969-974, 2002.
- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241: 42-52, 1988.

- Hansford JR, Mulligan LM. Multiple endocrine neoplasia type 2 and *RET*: from neoplasia to neurogenesis. *J Med Genet* 37: 87-827, 2000.
- Heuckeroth RO, Enomoto H, Grider JR, Golden JP, Hanke JA, Jackman A, Molliver DC, Bardgett ME, Snider WD, Johnson EM Jr, Milbrandt J. Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons. *Neuron* 22: 253-263, 1999.
- Hofstra RM, Landsvater RM, Ceccherini I, Stulp RP, Stelwagen T, Luo Y, Pasini B, Hoppener JW, van Amstel HK, Romeo G, Lips CJM, Buys CHCM. 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, 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* 12: 445-447, 1996.
- Hofstra RM, Fattoruso O, Quadro L, Wu Y, Libroia A, Verga U, Colantuoni V, Buys CH. A novel point mutation in the intracellular domain of the *ret* protooncogene in a family with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 4176-4178, 1997.
- Hofstra RM, Valdenaire O, Arch E, Osinga J, Kroes H, Loffler BM, Hamosh A, Meijers C, Buys CH. 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.
- Höppner W, Ritter MM. A duplication of 12 bp in the critical cysteine rich domain of the *RET* proto-oncogene results in a distinct phenotype of multiple endocrine neoplasia type 2A. *Hum Mol Genet* 6: 587-590, 1997.

- Horstadius S. The neural crest. Its properties and derivatives in the light of experimental methods. Oxford University Press, pp1-12, London, 1950.
- Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A, Yanagisawa M. 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.
- 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 A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. 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, 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 K, Shilo K, Boerkoel CF, Crowe C, Sawady J, Lupski JR, Agamanolis DP. Congenital hypomyelinating neuropathy, central dysmyelination, and Waardenburg-Hirschsprung disease: phenotypes linked by *SOX10* mutation. *Ann Neurol* 52: 836-842, 2002.

- Ishizaka Y, Itoh F, Tahira T, Ikeda I, Sugimura T, Tucker J, Fertitta A, Carrano AV, Nagao M. Human *ret* proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. *Oncogene* 4: 1519-1521, 1989.
- Ito S, Iwashita T, Asai N, Murakami H, Iwata Y, Sobue G, Takahashi M. Biological properties of Ret with cysteine mutations correlate with multiple endocrine neoplasia type 2A, familial medullary thyroid carcinoma, and Hirschsprung's disease phenotype. *Cancer Res* 57:2870-2872, 1997.
- 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, Myers SM, Mulligan LM. Expression of RET 3' splicing variants during human kidney development. *Oncogene* 16: 991-996, 1998.
- Iwahana H, Yoshimoto K, Itakara M. Detection of point mutations by SSCP of PCR-amplified DNA after endonuclease digestion. *Biotechniques* 12: 64-6, 1992.
- 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, Asai N, Murakami H, Matsuyama M, Takahashi M. Identification of tyrosine residues that are essential for transforming activity of the *ret* proto-oncogene with MEN2A or MEN2B mutation. *Oncogene* 12: 481-487, 1996a.
- 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, 1996b.

- Iwashita T, Kato M, Murakami H, Asai N, Ishiguro Y, Ito S, Iwata Y, Kawai K, Asai M, Kurokawa K, Kajita H, Takahashi M. Biological and biochemical properties of Ret with kinase domain mutations identified in multiple endocrine neoplasia type 2B and familial medullary thyroid carcinoma. *Oncogene* 18: 3919-3922, 1999.
- Iwashita T, Murakami H, Kurokawa K, Kawai K, Miyauchi A, Futami H, Qiao S, Ichihara M, Takahashi M. A two-hit model for development of multiple endocrine neoplasia type 2B by *RET* mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 268: 804-808, 2000.
- Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonio L, Hu Z, Cupples R, Louis JC, Hu S, Altrock BW, Fox GM. GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* 85: 1113-1124, 1996.
- Kiss P, Osztovcics M. Association of 13q deletion and Hirschsprung's disease. *J Med Genet* 26: 793-794, 1989.
- Klein RD, Sherman D, Ho WH, Stone D, Bennett GL, Moffat B, Vandlen R, Simmons L, Gu Q, Hongo JA, Devaux B, Poulsen K, Armanini M, Nozaki C, Asai N, Goddard A, Phillips H, Henderson CE, Takahashi M, Rosenthal A. A GPI-linked protein that interacts with Ret to form a candidate neurturin receptor. *Nature* 387: 717-721, 1997.
- Komminoth P, Kunz EK, Matias-Guiu X, Hiort O, Christiansen G, Colomer A, Roth J, Heitz PU. Analysis of *RET* protooncogene point mutations distinguishes heritable from nonheritable medullary thyroid carcinomas. *Cancer* 76: 479-489, 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.
- Lamont MA, Fitchett M, Dennis NR. Interstitial deletion of distal 13q associated with Hirschsprung's disease. *J Med Genet* 26: 100-104, 1989.
- 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.
- 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.
- Lorenzo MJ, Gish GD, Houghton C, Stonehouse TJ, Pawson T, Ponder BA, Smith DP. 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.
- Lyonnet S, Bolino A, Pelet A, Abel L, Nihoul-Fekete C, Briard ML, Mok-Siu V, Kaariainen H, Martucciello G, Lerone M, Puliti A; Luo Y, Weissenbach J; Devoto M, Munnich A, Romeo G. A gene for Hirschsprung disease maps to the proximal long arm of chromosome 10. *Nat Genet* 4: 346-350, 1993.

- Marshall GM, Pearson AE, Hocker JE, Smith SA, Hansford LM, Tobias V, Norris MD, Haber M, Smith DP, Lorenzo MJ, Ponder BAJ, Hancock JF. 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, Biocchini M, Dodero P, Cirillo M, Puliti A, Gimelli G. Total colonic aganglionosis associated with interstitial deletion of the long arm of chromosome 10. *Pediatr Surg Int* 7: 308, 1992.
- Martucciello G, Ceccherini I, Lerone M, Jasonni V. Pathogenesis of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 35: 1017-1025, 2000.
- Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67: 753-791, 1998.
- Meijers JH, van der Sanden MP, Tibboel D, van der Kamp AW, Luijckx TM, Molenaar JC. Colonization characteristics of enteric neural crest cells: embryological aspects of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 27: 811-814, 1992.
- Melillo RM, Carlomagno F, De Vita G, Formisano P, Vecchio G, Fusco A, Billaud M, Santoro M. 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, Schlessinger J, Lax I. 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.

- Miyauchi A, Egawa S, Futami H, Kuma K, Obara T, Yamaguchi K. A novel somatic mutation in the RET proto-oncogene in familial medullary thyroid carcinoma with a germline codon 768 mutation. *Jpn J Cancer Res* 88:527-531, 1997.
- Moore MW, Klein RD, Farinas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, Reichardt LF, Ryan AM, Carver-Moore K, Rosenthal A. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 382: 76-79, 1996.
- 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, Robinson BG, Frilling A, Verellen-Dumoulin C, Safar A, Venter DJ, Munnich A, Ponder BAJ. Diverse phenotypes associated with exon 10 mutations of the *RET* proto-oncogene. *Hum Mol Genet* 3: 2163-2167, 1994.
- Mulligan LM, Marsh DJ, Robinson BG, Schuffenecker I, Zedenius J, Lips CJ, Gagel RF, Takai SI, Noll WW, Fink M, Raue F, Lacroix A, Thibodeau SN, Frilling A, Ponder BAJ, Eng C. Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2: report of the International RET Mutation Consortium. *J Intern Med* 238: 343-346, 1995.
- Murakami H, Iwashita T, Asai N, Shimono Y, Iwata Y, Kawai K, Takahashi M. 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, Iwashita T, Asai N, Shimono Y, Iwata Y, Kawai K, Takahashi M. 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, Iwashita T, Asai N, Iwata Y, Narumiya S, Takahashi M. Rho-dependent and -independent tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin and p130Cas mediated by Ret kinase. *Oncogene* 18: 1975-1982, 1999b.
- 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.
- 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, Lyonnet S, Mulligan LM. 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.
- Newgreen D, Young HM. Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 1. *Pediatr Dev Pathol* 5: 224-247, 2002.
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 17: 2503-16, 1989.
- 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.

- Okayama H, Curiel DT, Brantly ML, Holmes MD, Crystal RG. Rapid, nonradioactive detection of mutations in the human genome by allele-specific amplification. *J Lab Clin Med* 114: 105-113, 1989.
- 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.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766-70, 1989.
- 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.
- Parc R, Berrod JL, Tussiot J, Loygue J. Megacolon in adults. Apropos of 76 cases. *Ann Gastroenterol Hepatol (Paris)* 20: 133-141, 1984.
- Pasini B, Hofstra RM, Yin L, Bocciardi R, Santamaria G, Grootsholten PM, Ceccherini I, Patrone G, Priolo M, Buys CH. 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, Alberti L, Miranda C, Arighi E, Bocciardi R, Seri M; Barone V, Radice MT, Romeo G, Pierotti MA. Loss of function effect of *RET* mutations causing Hirschsprung disease. *Nat Genet* 10: 35-40, 1995b.
- Pasini A, Geneste O, Legrand P, Schlumberger M, Rossel M, Fournier L, Rudkin BB, Schuffenecker I, Lenoir GM, Billaud M. Oncogenic activation of RET by two

- distinct FMTC mutations affecting the tyrosine kinase domain. *Oncogene* 15: 393-402, 1997.
- Pasini B, Rossi R, Ambrosio MR, Zatelli MC, Gullo M, Gobbo M, Collini P, Aiello A, Pansini G, Trasforini G, degli Uberti EC. 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, Goridis C, Brunet JF. The homeobox gene *Phox2b* is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature* 399: 366-370, 1999.
- Pelet A, Geneste O, Edery P, Pasini A, Chappuis S, Atti T, Munnich A, Lenoir G, Lyonnet S, Billaud M. Various mechanisms cause RET-mediated signaling defects in Hirschsprung's disease. *J Clin Invest* 101: 1415-1423, 1998.
- Peretz H, Luboshitsky R, Baron E, Biton A, Gershoni R, Usher S, Grynberg E, Yakobson E, Graff E, Lapidot M. Cys 618 Arg mutation in the *RET* proto-oncogene associated with familial medullary thyroid carcinoma and maternally transmitted Hirschsprung's disease suggesting a role for imprinting. *Hum Mutat* 10: 155-159, 1997.
- Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, Drago J, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Saarma M, Hoffer BJ, Sariola H, Westphal H. Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 382: 73-76, 1996.
- Pigny P, Bauters C, Wemeau JL, Houcke ML, Crepin M, Caron P, Giraud S, Calender A, Buisine MP, Kerckaert JP, Porchet N. A novel 9-base pair duplication in RET

- exon 8 in familial medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1700-1704, 1999.
- Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, Goerich DE, Prehu MO, Puliti A, Herbarth B, Hermans-Borgmeyer I, Legius E, Matthijs G, Amiel J, Lyonnet S, Ceccherini I, Romeo G, Smith JC, Read AP, Wegner M, Goossens M. *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, Jouk PS, Goossens M. 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.
- Puffenberger EG, Kauffman ER, Bolk S, Matisse TC, Washington SS, Angrist M, Weissenbach J, Garver KL, Mascari M, Ladda R, Slaugenhaupt SA, Chakravarti A. Identity-by-descent and association mapping of a recessive gene for Hirschsprung disease on human chromosome 13q22. *Hum Mol Genet* 3: 1217-1225, 1994.
- Romano A, Wong WT, Santoro M, Wirth PJ, Thorgeirsson SS, Di Fiore PP. The high transforming potency of *erbB-2* and *ret* is associated with phosphorylation of paxillin and a 23 kDa protein. *Oncogene* 9: 2923-2933, 1994.
- Romeo G, Ronchetto P, Luo Y, Barone V, Seri M, Ceccherini I, Pasini B, Bocciardi R, Lerone M, Kaariainen H, Martucciello G. Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the *RET* proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 367: 377-378, 1994.
- Romeo G, Ceccherini I, Celli J, Priolo M, Betsos N, Bonardi G, Seri M, Yin L, Lerone M, Jasonni V, Martucciello G. Association of multiple endocrine neoplasia type 2 and Hirschsprung disease. *J Intern Med* 243: 515-520, 1998.

- Rossel M, Pasini A, Chappuis S, Geneste O, Fournier L, Schuffenecker I, Takahashi M, van Grunsven LA, Urdiales JL, Rudkin BB, Lenoir GM, Billaud M. Distinct biological properties of two RET isoforms activated by MEN 2A and MEN 2B mutations. *Oncogene* 14: 265-275, 1997.
- Rossi J, Luukko K, Poteryaev D, Laurikainen A, Sun YF, Laakso T, Eerikainen S, Tuominen R, Lakso M, Rauvala H, Arumae U, Pasternack M, Saarma M, Airaksinen MS. 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.
- Ruiz A, Antiñolo G, Borrego S, Sánchez B, Sánchez J. PCR mutagenesis-based method for generation of positive controls for SSCP analysis. *Biotechniques* 23: 704-8, 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.
- Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 3: 103-108, 1992.
- Salomon R, Attie T, Pelet A, Bidaud C, Eng C, Amiel J, Sarnacki S, Goulet O, Ricour C, Nihoul-Fekete C, Munnich A, Lyonnet S. Germline mutations of the RET ligand GDNF are not sufficient to cause Hirschsprung disease. *Nat Genet* 14: 345-347, 1996.
- Sancandi M, Griseri P, Pesce B, Patrone G, Puppo F, Lerone M, Martucciello G, Romeo G, Ravazzolo R, Devoto M, Ceccherini I. Single nucleotide polymorphic alleles in the 5' region of the *RET* proto-oncogene define a risk haplotype in Hirschsprung's disease. *J Med Genet* 40: 714-718, 2003.

- Sanchez 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 Suppl 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.
- Sanicola M, Hession C, Worley D, Carmillo P, Ehrenfels C, Walus L, Robinson S, Jaworski G, Wei H, Tizard R, Whitty A, Pepinsky RB, Cate RL. Glial cell line-derived neurotrophic factor-dependent RET activation can be mediated by two different cell-surface accessory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6238-6243, 1997.
- Santoro M, Rosati R, Grieco M, Berlingieri MT, D'Amato GL, de Franciscis V, Fusco A. The *ret* proto-oncogene is consistently expressed in human pheochromocytomas and thyroid medullary carcinomas. *Oncogene* 5: 1595-1598, 1990.
- Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro DP, Dathan NA, Grieco M, Fusco A, Vecchio G, Matoskova B, Kraus MH, Di Fiore PP. Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science* 267: 381-383, 1995.
- Sasaki A, Kanai M, Kijima K, Akaba K, Hashimoto M, Hasegawa H, Otaki S, Koizumi T, Kusuda S, Ogawa Y, Tuchiya K, Yamamoto W, Nakamura T, Hayasaka K. Molecular analysis of congenital central hypoventilation syndrome. *Hum Genet* 114: 22-26, 2003.

- Schimke RN. Genetic aspects of multiple endocrine neoplasia. *Annu Rev Med* 35: 25-31, 1984.
- Schneider R. The human protooncogene *ret*: a communicative cadherin? *Trends Biochem Sci* 17: 468-469, 1992.
- 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.
- Seri M, Yin L, Barone V, Bolino A, Celli I, Bocciardi R, Pasini B, Ceccherini I, Lerone M, Kristoffersson U, Larsson LT, Casasa JM, Cass DT, Abramowicz MJ, Vanderwinden JM, Kravcenkiene I, Baric I, Silengo M, Martucciello G, Romeo G. Frequency of *RET* mutations in long- and short-segment Hirschsprung disease. *Hum Mutat* 9: 243-249, 1997.
- Sijmons RH, Hofstra RMW, Wijburg FA, Links TP, Zwierstra RP, Vermeij A, Aronson DC, Tan-Sindhunata G, Brouwers-Smalbraak GJ, Maas SM, Buys CHCM. Oncological implications of *RET* gene mutations in Hirschsprung's disease. *Gut* 43: 542-547, 1998.
- Smith DP, Houghton C, Ponder BA. Germline mutation of *RET* codon 883 in two cases of de novo MEN 2B. *Oncogene* 15: 1213-1217, 1997.
- 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.
- Songyang Z, Carraway KL 3rd, Eck MJ, Harrison SC, Feldman RA, Mohammadi M, Schlessinger J, Hubbard SR, Smith DP, Eng C, Ponder BAJ, Mayer BJ, Cantley LC. Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature* 373: 536-539, 1995.
- Southard-Smith EM, Angrist M, Ellison JS, Agarwala R, Baxevanis AD, Chakravarti A, Pavan WJ. 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.
- Svensson PJ, Molander ML, Eng C, Anvret M, Nordenskjold A. Low frequency of *RET* mutations in Hirschsprung disease in Sweden. *Clin Genet* 54: 39-44, 1998.
- Tahira T, Ishizaka Y, Sugimura T, Nagao M. Expression of proto-ret mRNA in embryonic and adult rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 153: 1290-1295, 1988.
- 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.
- Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, *ret*, by DNA rearrangement. *Cell* 42: 581-588, 1985.
- Takahashi M, Cooper GM. *RET* transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 7: 1378-1385, 1987.

- 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, Iwashita T, Santoro M, Lyonnet S, Lenoir GM, Billaud M. Co-segregation of MEN2 and Hirschsprung's disease: the same mutation of *RET* with both gain and loss-of-function? *Hum Mutat* 13: 331-336, 1999.
- Takahashi M. The GDNF/RET signalling pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 12:361-373, 2001.
- Torfs CP. An epidemiological study of Hirschsprung disease in a multiracial California population. *The Third International Meeting: Hirschsprung disease and related neurocristopathies, Evian, France, 1998*.
- Touraine RL, Attie-Bitach T, Manceau E, Korsch E, Sarda P, Pingault V, Encha-Razavi F, Pelet A, Auge J, Nivelon-Chevallier A, Holschneider AM, Munnes M, Doerfler W, Goossens M, Munnich A, Vekemans M, Lyonnet S. 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, Gray C, Armanini MP, Pollock RA, Hefti F, Phillips HS, Goddard A, Moore MW, Buj-Bello A, Davies AM, Asai N, Takahashi M, Vandlen R, Henderson CE,

- Rosenthal A. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 382: 80-83, 1996.
- 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.
- Van de Putte T, Maruhashi M, Francis A, Nelles L, Kondoh H, Huylebroeck D, Higashi Y. Mice lacking *ZFHX1B*, the gene that codes for Smad-interacting protein-1, reveal a role for multiple neural crest cell defects in the etiology of Hirschsprung disease-mental retardation syndrome. *Am J Hum Genet* 72: 465-470, 2003.
- van Weering DH, Medema JP, van Puijenbroek A, Burgering BM, Baas PD, Bos JL. Ret receptor tyrosine kinase activates extracellular signal-regulated kinase 2 in SK-N-MC cells. *Oncogene* 11: 2207-2214, 1996.
- 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, Mulligan LM. Cloning and characterization of the human *GFRA2* locus and investigation of the gene in Hirschsprung disease. *Hum Genet* 108: 409-415, 2001.
- Verdy M, Weber AM, Roy CC, Morin CL, Cadotte M, Brochu P. Hirschsprung's disease in a family with multiple endocrine neoplasia type 2. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1:603-607, 1982.
- 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.

- Verschuereen K, Remacle JE, Collart C, Kraft H, Baker BS, Tylzanowski P, Nelles L, Wuytens G, Su MT, Bodmer R, Smith JC, Huylebroeck D. SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *J Biol Chem* 274: 20489-20498, 1999.
- Wakamatsu N, Yamada Y, Yamada K, Ono T, Nomura N, Taniguchi H, Kitoh H, Mutoh N, Yamanaka T, Mushiake K, Kato K, Sonta S, Nagaya M. Mutations in *SIP1*, encoding Smad interacting protein-1, cause a form of Hirschsprung disease. *Nat Genet* 27: 369-370, 2001.
- Wohlk N, Cote GJ, Bugalho MM, Ordonez N, Evans DB, Goepfert H, Khorana S, Schultz P, Richards CS, Gagel RF. Relevance of *RET* proto-oncogene mutations in sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3740-3745, 1996.
- Worby CA, Vega QC, Zhao Y, Chao HH, Seasholtz AF, Dixon JE. Glial cell line-derived neurotrophic factor signals through the RET receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271: 23619-23622, 1996.
- Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Wallace RB. Allele-specific enzymatic amplification of beta-globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2757-60, 1989.
- Xing S, Smanik PA, Oglesbee MJ, Trosko JE, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Characterization of ret oncogenic activation in MEN2 inherited cancer syndromes. *Endocrinology* 137: 1512-1519, 1996.
- Yanagisawa H, Yanagisawa M, Kapur RP, Richardson JA, Williams SC, Clouthier DE, de Wit D, Emoto N, Hammer RE. Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development* 125: 825-836, 1998.