



Aspectes moleculars de dues malalties de transport lisosòmic: la cistinosi i la malaltia de Niemann-Pick tipus C

Judit Macias Vidal

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**ASPECTES MOLECULARS DE DUES MALALTIES DE TRANSPORT
LISOSÒMIC:
LA CISTINOSI I LA MALALTIA DE NIEMANN-PICK TIPUS C**

Memòria presentada per

Judit Macías Vidal

Per optar al grau de

Doctora per la Universitat de Barcelona

Programa de Genètica

Bienni 2005-2007

Tesi realitzada sota la direcció de la Dra. Maria Josep Coll i el Dr. Oriol Bachs Valldenu a la
Secció d'Errors Congènits del Metabolisme (IBC) del Servei de Bioquímica i Genètica
Molecular de l'Hospital Clínic de Barcelona

Els directors,

El tutor,

Dra. Maria Josep Coll Rosell

Dr. Oriol Bachs Valldenu

Dr. Daniel Grinberg Vaisman

Judit Macías Vidal

Barcelona, 2012

INTRODUCCIÓ	3
I. EL LISOSOMA	3
1 ESTRUCTURA I FUNCIO	3
2 SÍNTESI I TRANSPORT DE LES MALALTIES LISOSÒMIQUES	3
3 VIES DE DEGRADACIÓ LISOSÒMICA	5
4 MALALTIES LISOSÒMIQUES	6
4.1 CLASSIFICACIÓ	6
4.2 PATOFISIOLOGIA	8
4.3 CLÍNICA	9
II. MALALTIES CAUSADES PER DEFECTES EN PROTEÏNES	
LISOSÒMIQUES DE MEMBRANA	11
1 LA CISTINOSI	11
1.1 ASPECTES HISTÒRICS	11
1.2 METABOLISME DE LA CISTINA I PATOGÈNESI	12
1.3 DESCRIPCIÓ CLÍNICA	13
1.4 DIAGNÒSTIC BIOQUÍMIC	14
1.5 CARACTERÍSTIQUES MOLECULARS	14
1.5.1 El gen <i>CTNS</i>	14
1.5.2 Correlacions genotip-fenotip	16
1.5.3 La proteïna cistinosina	16
1.6 TERÀPIA	17
2 LA MALALTIA DE NIEMANN-PICK TIPUS C	18
2.1 ASPECTES HISTÒRICS	18
2.2 METABOLISME DEL COLESTEROL I PATOGÈNESI	18
2.3 DESCRIPCIÓ CLÍNICA	21
2.4 DIAGNÒSTIC BIOQUÍMIC	24
2.5 CARACTERÍSTIQUES MOLECULARS	27
2.5.1 Els gens <i>NPC1</i> i <i>NPC2</i>	27
2.5.2 Correlacions genotip-fenotip	28
2.5.3 Les proteïnes NPC1 i NPC2	29
2.6 TERÀPIA	31

III. MECANISMES MOLECULARS ANALITZATS EN AQUESTA TESI	33
1 <i>SPLICING</i>	33
1.1 LES SENYALS I LA MAQUINÀRIA DE <i>SPLICING</i>	33
1.2 EL MECANISME DE <i>SPLICING</i> ALS MAMÍFERS	34
1.3 <i>SPLICING</i> ALTERNATIU	35
1.4 <i>SPLICING</i> I MALALTIA	36
2 <i>NONSENSE-MEDIATED mRNA DECAY</i>	38
2.1 CONDICIONS NECESSÀRIES PER A QUÈ ACTUÏ EL NMD	38
2.2 EL MECANISME DE NMD ALS MAMÍFERS	39
3 DEGRADACIÓ PROTEICA PROTEASÒMICA	42
3.1 EL PROTEASOMA	42
3.2 MECANISMES DE CONTROL DE QUALITAT DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC	42
MÈTODES	47
OBJECTIUS	51
RESULTATS	55
INFORME SOBRE LA CONTRIBUCIÓ DE LA DOCTORANDA A LES PUBLICACIONS D'AQUESTA TESI DOCTORAL	55
PRESENTACIÓ DELS RESULTATS	59
CAPÍTOL I. LA CISTINOSI	61
Article 1: <i>Analysis of the CTNS gene in 32 cystinosis patients from Spain</i>	61
Resultats annexos	67
CAPÍTOL II. LA MALALTIA DE NIEMANN-PICK TIPUS C	69
Article 2: <i>Molecular analysis of 30 Niemann-Pick type C patients from Spain</i>	69
Resultats annexos	82
Article 3: <i>Nonsense-mediated mRNA decay process in nine alleles of Niemann-Pick type C patients from Spain</i>	83
Article 4: <i>Proteasomal degradation role in missense mutations causing Niemann-Pick type C disease</i>	91

DISCUSSIÓ	117
1 IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE MUTACIONS	117
1.1 LA CISTINOSI	117
1.2 LA MALALTIA DE NIEMANN-PICK TIPUS C	120
2 MECANISMES MOLECULARS IMPLICATS EN LA PATOLOGIA DE NIEMANN-PICK TIPUS C	124
2.1 <i>SPLICING</i> – MUTACIONS DE <i>SPLICING</i>	125
2.2 NMD – MUTACIONS SENSE SENTIT I MUTACIONS QUE ALTEREN LA PAUTA DE LECTURA	126
2.3 DEGRADACIÓ PROTEICA PROTEASÒMICA – MUTACIONS DE CANVI DE SENTIT	127
3 VALORACIÓ DE L'ÚS D'INHIBIDORS DEL PROTEASOMA COM A APROXIMACIÓ TERAPÈUTICA PER A LA MALALTIA DE NIEMANN-PICK TIPUS C	131
CONCLUSIONS	135
BIBLIOGRAFIA	139
ANNEX	159
Article 5. <i>Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: genotype-phenotype correlations</i>	159
Article 6. <i>Clinical experience with miglustat therapy in pediatric patients with Niemann-Pick disease type C: a case series</i>	171
Article 7. <i>Niemann-Pick type C disease: From neonatal cholestasis to neurological degeneration. Different phenotypes</i>	183
Article 8. <i>Characterisation of two deletions involving NPC1 and flanking genes in Niemann-Pick type C disease patients</i>	193

FIGURES

Figura 1. Síntesi i transport dels enzims lisosòmics	4
Figura 2. Vies de degradació lisosòmica	5
Figura 3. Mecanismes implicats en la neurodegeneració a les LSDs	8
Figura 4. La cistinosi: un defecte de transport de la cistina a nivell lisosòmic	11
Figura 5. Mecanisme d'acció de la cisteamina	17
Figura 6. Regulació del colesterol intracel·lular	19
Figura 7. Visions clàssica i actual de la patogènesi de la malaltia de Niemann-Pick tipus C	20
Figura 8. Representació esquemàtica dels diferents fenotips clínics amb els símptomes característics de cadascun, tant a nivell sistèmic com neurològic	21
Figura 9. Imatges de microscopia de fluorescència de fibroblasts després de realitzar el test de la filipina	26
Figura 10. Algoritme diagnòstic de laboratori proposat pel <i>The NP-C Guidelines Working Group</i>	27
Figura 11. Model de l'estructura de la proteïna NPC1	29
Figura 12. Model proposat de transferència del colesterol des de les LDL via NPC2-NPC1 fins a la membrana lisosòmica	30
Figura 13. Mecanisme d'acció del miglustat en el metabolisme dels esfingolípid	32
Figura 14. Senyals canòniques del <i>splicing</i>	33
Figura 15. La maquinària de <i>splicing</i>	34
Figura 16. Passos clau del mecanisme de <i>splicing</i>	35
Figura 17. Diferents tipus de <i>splicing</i> alternatiu	36
Figura 18. Condició necessària pel mecanisme de NMD	39
Figura 19. Model del mecanisme de NMD en els mamífers	40
Figura 20. Estructura del nucli 20S del proteasoma	42
Figura 21. Exportació i degradació de les proteïnes mal plegades	43
Figura 22. Estructura de la cistinosina amb la localització d'algunes de les mutacions identificades en pacients espanyols	118
Figura 23. Tipus de mutacions identificades al gen <i>NPC1</i>	123
Figura 24. Efecte dels diferents tipus de mutacions sobre la proteïna	124
Figura 25. Mutacions analitzades a nivell de l'expressió de la proteïna NPC1	128

TAULES

Taula 1. Classificació de les LSDs segons la via de degradació, la proteïna defectuosa i el producte acumulat	7
Taula 2. Escala de discapacitat per la malaltia de Niemann-Pick tipus C	24
Taula 3. Mètodes utilitzats al llarg d'aquesta tesi	43
Taula 4. Fenotip clínic i genotip dels últims pacients espanyols diagnosticats de cistinosi	67
Taula 5. Fenotip clínic, fenotip bioquímic i genotip dels últims pacients NPC diagnosticats	82

ABREVIATURES

ALLN	N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal
ATP	Adenosin trifosfat
pb	Parells de bases
CBP	<i>Cystine-binding protein</i>
cDNA	DNA complementari
CHX	Cicloheximida
DNA	Àcid desoxiribonucleic
EJC	<i>Exon junction complex</i>
E/L	Endosoma/Lisosoma
ERAD	<i>Endoplasmic reticulum-associated degradation</i>
ESE	<i>Exonic splicing enhancer</i>
ESS	<i>Exonic splicing silencer</i>
GlcCer	Glucosilceramida
GSH	Glutatió
HDAC	Deacetilases d'histones
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
ISE	<i>Intronic splicing enhancer</i>
ISS	<i>Intronic splicing silencer</i>
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
LacCer	Lactosilceramida
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>
LD	<i>Lipid droplets</i>
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LPDS	<i>Lipoprotein deficient serum</i>
LSDs	<i>Lysosomal storage disorders</i>
MG132	Carbobenzoxyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal
mRNA	RNA missatger
M6P	Manosa-6-fosfat
NMD	<i>Nonsense-mediated mRNA decay</i>
NPC	Niemann-Pick tipus C

ORPs	<i>OSBP-related proteins</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PET	Tomografia per emissió de positrons
PKC	Proteïna quinasa C
PPT	<i>Polypyrimidine tract</i>
PTC	<i>Premature termination codon</i>
QMPSF	<i>Quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments</i>
RE	Reticle endoplasmàtic
RM6P	Receptor de manosa-6-fosfat
RNA	Àcid ribonucleic
SNC	Sistema nerviós central
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
snRNAs	<i>Small nuclear RNAs</i>
snRNPs	<i>Small nuclear ribonucleoprotein particles</i>
SS	<i>Splice site</i>
SSCP	<i>Single strand conformation polymorphism</i>
SSD	<i>Sterol-sensing domain</i>
TGN	<i>trans-Golgi network</i>
TM	Transmembrana
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
VSPG	<i>Vertical supranuclear gaze palsy</i>
WB	Western blot

INTRODUCCIÓ

I. EL LISOSOMA

1 ESTRUCTURA I FUNCIO

Els lisosomes són els orgànuls cel·lulars responsables de la degradació i el reciclatge de diversos metabòlits (proteïnes, lípids, oligosacàrids i àcids nucleics). Aquests estan rodejats d'una bicapa lipídica que conté un gran nombre de proteïnes que participen en el transport de partícules entre la llum lisosòmica i el citosol, a més d'embolcallar un ventall d'enzims amb capacitats lítiques (Sandhoff & Kolter, 1996). La principal característica bioquímica dels lisosomes rau en el pH àcid que hi ha al seu interior, el qual s'assoleix gràcies a una bomba ATPasa protònica i permet el correcte funcionament dels enzims lisosòmics.

El lisosoma és un dels components de la via endocítica, que és un conjunt de cossos multivesiculars que conté un complex sistema d'endomembranes (Gruenberg & Stenmark, 2004). Aquesta via també inclou els endosomes primerencs i els endosomes tardans, que són els passos previs als lisosomes en aquesta cadena digestiva (Vellodi, 2005).

Actualment, es coneix que els lisosomes són uns orgànuls molt més complexos del que es pensava inicialment, i això ha fet modificar el concepte històric que els designava com els escombriaires de la cèl·lula. Els lisosomes juntament amb la maquinària dels endosomes i autofagosomes, i en coordinació amb el sistema ubiquitina-proteasoma, representen un mecanisme regulatori i de reciclatge altament complex i necessari per al correcte funcionament de les cèl·lules (Walkley, 2007). Però, a més de representar el destí final per a aquelles molècules destinades a la destrucció, els lisosomes estan involucrats en molts altres processos cel·lulars, com l'homeòstasi del colesterol, la reparació de les membranes, i la senyalització i mort cel·lular (Saftig & Klumperman, 2009).

2 SÍNTESI I TRANSPORT DE LES PROTEÏNES LISOSÒMIQUES

Els enzims lisosòmics són glicoproteïnes que es sintetitzen a nivell del reticle endoplasmàtic (RE) rugós i es mantenen inactives durant aquest procés, ja que només són actives al pH baix del lisosoma. Una vegada sintetitzades són translocades a la llum del RE, on són N-glicosilades. La N-glicosilació consisteix en la transferència d'oligosacàrids a la cadena polipeptídica de la proteïna, donant lloc a la glicoproteïna. Després són desplaçades a l'aparell de Golgi on adquireixen un lligand de manosa-6-fosfat (M6P), el qual és reconegut pels receptors de manosa-6-fosfat (RM6P) a la xarxa del *trans*-Golgi (TGN) (Fig. 1). La unió entre el receptor i l'enzim té lloc a la cara luminal de la

membrana, ahora a la cara citosòlica, el receptor s'uneix a vesícules de transport específiques revestides de clatrina. A l'interior d'aquestes vesícules el complex glicoproteïna-receptor serà dirigit als endosomes tardans, on el pH baix donarà lloc a la seva dissociació. L'enzim seguirà el seu camí cap als lisosomes i el receptor serà reciclat i retornat a la membrana de l'aparell de Golgi, o bé serà enviat a la membrana plasmàtica (Braulke & Bonifacino, 2009). La posterior eliminació del fosfat de la manosa dels enzims disminueix la probabilitat de què aquests siguin retornats al Golgi units al receptor. L'etapa final de maduració dels enzims inclou processos proteolítics, de correcte plegament i d'agregació amb altres proteïnes.

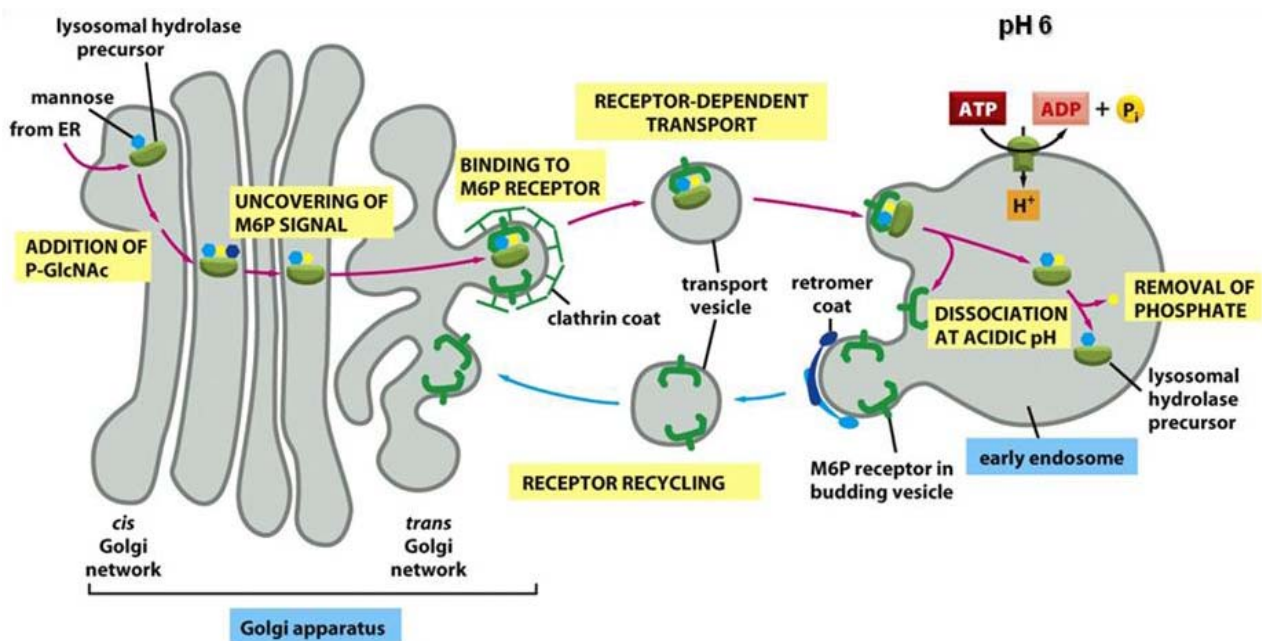


Figura 1. Síntesi i transport dels enzims lisosòmics. Extret d'Alberts et al., 2007.

Durant els últims anys, diferents estudis han demostrat l'existència de rutes de transport dels enzims lisosòmics independents dels RM6P. És el cas de les proteïnes de la membrana del lisosoma que no depenen dels RM6P sinó que presenten pèptids senyals, generalment a l'extrem C-terminal, que les dirigeixen cap als lisosomes. Per a aquestes proteïnes de membrana s'han proposat dues vies de tràfic intracel·lular (Hunziker & Geuze, 1996). La via directa en la que la proteïna és transportada del TGN als endosomes primerencs i tardans i després als lisosomes, i la via indirecta que es basa en el transport de la proteïna des del TGN fins a la membrana plasmàtica seguida de la internalització en els endosomes primerencs i el transport fins als endosomes tardans i els lisosomes (Braulke & Bonifacino, 2009).

3 VIES DE DEGRADACIÓ LISOSÒMICA

La degradació lisosòmica és crítica per a molts processos fisiològics incloent el recanvi de proteïnes cel·lulars, la destrucció de proteïnes anòmales, la regulació de receptors de membrana, l'alliberació de nutrients endocitats, la inactivació d'organismes patògens i el processament d'antígens (Mullins & Bonifacino, 2001).

En quant a l'origen de les substàncies que són degradades pels enzims del lisosoma, es pot dividir bàsicament entre productes intracel·lulars i extracel·lulars. En el cas dels primers s'anomena autofàgia, mentre que en el cas dels segons es pot distingir entre endocitosi i fagocitosi en funció de la molècula degradada (Fig. 2):

- **Autofàgia:** l'òrganul envellit o les proteïnes endògenes que es desitja degradar són tancats en membranes, creant un autofagosoma, que després es fusiona amb el lisosoma o l'endosoma tardà. Es tracta d'un procés regulat i que requereix d'un marcatge previ dels components cel·lulars que s'han de remodelar per a la seva posterior destrucció.

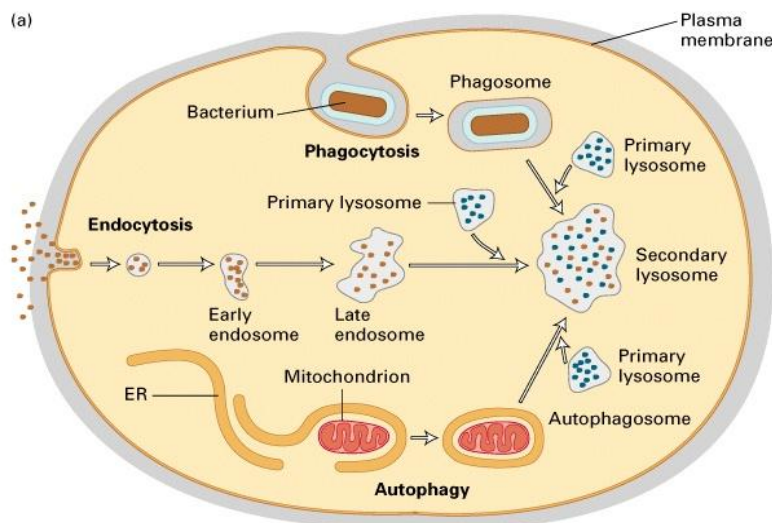


Figura 2. Vies de degradació lisosòmica.

- **Endocitosi:** les macromolècules ingerides del medi extracel·lular són embolcallades per vesícules i alliberades als endosomes primerencs. Des d'aquí, algunes de les molècules són recuperades selectivament i reciclades cap a la membrana plasmàtica, mentre que altres passen als endosomes tardans. Quan aquests últims maduren, ja es parla de lisosomes.

- Fagocitosi: té lloc als fagocits, que són cèl·lules especialitzades en la degradació de grans partícules i microorganismes, que són englobats formant fagosomes. Després aquests es fusionen amb el lisosoma de forma anàloga als autofagosomes.

4 MALALTIES LISOSÒMIQUES

Les malalties d'acumulació lisosòmica (LSDs) són un grup de més de 70 malalties metabòliques hereditàries que són degudes a l'absència o a la reducció de l'activitat d'una hidrolasa lisosòmica específica o d'altres proteïnes rellevants per al correcte funcionament del sistema endosoma/lisosoma (E/L) (Platt & Walkley, 2004). Es coneix que algunes LSDs són degudes a defectes en el processament post-traducciona d'enzims lisosòmics, a errors en la localització d'aquestes hidrolases, a dèficits de proteïnes activadores d'aquests enzims, i a defectes en el funcionament de proteïnes lisosòmiques transmembrana o solubles no enzimàtiques (Platt & Walkley, 2004).

La incidència de les LSDs a la població general és baixa, fet que fa que siguin considerades malalties rares o minoritàries. Tot i això, algunes d'aquestes malalties poden arribar a tenir una freqüència d'aparició elevada en determinades poblacions, com és el cas de les comunitats d'ètnia gitana o de jueus asquenasites (Charrow, 2004).

Les LSDs són malalties monogèniques. S'han descrit múltiples mutacions en cadascun dels gens i s'ha observat que a vegades aquestes poden donar lloc a diferents fenotips clínics. No obstant, és complicat establir correlacions genotip-fenotip donada l'elevada heterogeneïtat al·lèlica en la majoria d'aquestes malalties. Un cas d'alta heterogeneïtat al·lèlica és el de les malalties de Hurler i Scheie que són causades per mutacions diferents en un mateix gen, però també existeixen casos d'heterogeneïtat gènica, com és el cas de la malaltia de Niemann-Pick tipus C i a la gangliosidosi GM2, que poden ser degudes a mutacions en dos gens diferents.

4.1 CLASSIFICACIÓ

Les LSDs es poden classificar segons la naturalesa bioquímica del producte acumulat o bé segons el mecanisme causant de la malaltia. La primera classificació però pot originar problemes quan s'acumula més d'un substrat en una mateixa malaltia. Encara que sovint es fa la classificació d'acord amb el compost majoritari acumulat, potser la classificació més útil és la que té en compte l'enzim o proteïna defectuosa (Futerman & van Meer, 2004). A la Taula 1 es pot veure el recull de les LSDs ordenades segons una combinació d'ambdues classificacions.

Taula 1. Classificació de les LSDs segons la via de degradació, la proteïna defectuosa i el producte acumulat.

MALALTIA	PROTEÏNA DEFECTUOSA	PRODUCTE ACUMULAT
Esfingolipidosis		
Fabry	α -galactosidasa A	Globotriasilceramida
Lipogranulomatosi de Farber	Ceramidasa	Ceramida
Gaucher	β -glucosidasa/Saposina C	Glucosilceramida
Krabbe	Galactocerebròsid- β -galactosidasa	Galactosilceramida
Leucodistròfia metacromàtica	Arilsulfatasa A/Saposina B	Glicolípid sulfatats
Niemann-Pick tipus A/B	Esfingomielinasa	Esfingomielina
Def. de l'activador d'esfingolípid	Proteïna activadora (SAP)	Glicolípid
Gangliosidosi GM1	β -galactosidasa	Gangliòsid GM1
Gangliosidosi GM2 (Tay-Sachs)	β -hexosaminidasa A	Gangliòsid GM2
Gangliosidosi GM2 (Sandhoff)	β -hexosaminidasa A i B	Gangliòsid GM2
Gangliosidosi GM2	Proteïna activadora de GM2	Gangliòsid GM2
Mucopolisacaridosis (MPS)		
MPS I (Hurler/Scheie)	α -iduronidasa	Dermatan i heparan sulfat
MPS II (Hunter)	Iduronat-2-sulfatasa	Dermatan i heparan sulfat
MPS IIIA (Sanfilippo A)	Heparan <i>N</i> -sulfatasa (sulfamidasa)	Heparan sulfat
MPS IIIB (Sanfilippo B)	<i>N</i> -acetil- α -glucosaminidasa	Heparan sulfat
MPS IIIC (Sanfilippo C)	AcetilCoA: α -glucosamida <i>N</i> -acetiltransferasa	Heparan sulfat
MPS IIID (Sanfilippo D)	<i>N</i> -acetilglucosamina-6-sulfatasa	Heparan sulfat
MPS IVA (Morquio A)	<i>N</i> -acetilgalactosamina-6-sulfat-sulfatasa	Queratan i condroitin-6-sulfat
MPS IVB (Morquio B)	β -galactosidasa	Queratan sulfat
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	Arilsulfatasa B	Dermatan sulfat
MPS VII (Sly)	β -glucuronidasa	Heparan, dermatan i condroitin-4 i -6-sulfat
MPS IX	Hialuronidasa	Hialuronan
Glucoproteïnosis		
Aspartilglucosaminúria	Aspartilglucosaminidasa	Aspartilglucosamina
Fucosidosi	α -fucosidasa	Fucòsids i glicolípid
α -manosidosi	α -manosidasa	Oligosacàrids amb manosa
β -manosidosi	β -manosidasa	Man(β 1 \rightarrow 4)GlcNAc
Sialidosi	Sialidasa	Sialiloligosacàrids
Schindler	α - <i>N</i> -acetilgalactosaminidasa	Glico-conjugats
Lipidosis		
Wolman i acumulació de colesterol	Lipasa àcida	Ésters de colesterol
Defectes en proteïnes membrana		
Cistinosis	Cistinosina	Cistina
Malaltia de Danon	LAMP2	Restes citosòliques
Malaltia de Salla i infantil d'acumulació d'àcid siàlic	Sialina	Àcid siàlic
Mucolipidosi (ML) IV	Mucolipina-1	Lípids i mucopolisacàrids
Niemann-Pick tipus C	NPC1/NPC2	Colesterol i esfingolípid
Altres		
Galactosialidosi	Catepsina A	Sialiloligosacàrids
I Cell (ML II) i polidistròfia pseudo-Hurler (ML III)	UDP- <i>N</i> -acetilglucosamina: <i>N</i> -acetilglucosaminil-1-fosfotransferasa	Oligosacàrids, mucopolisacàrids i lípids
Def. múltiple de sulfatases	Enzim generador de C α -formilglicina	Sulfàtids
Lipofuscinosi ceroide (NCL) 1	Palmitoiltoesterasa-1 (CLN1)	Tioésters lipidats
Lipofuscinosi ceroide (NCL) 2	Tripeptidil amino peptidasa-1 (CLN2)	Subunitat C d'ATP sintasa
Lipofuscinosi ceroide (NCL) 3	Transportador d'arginina	Subunitat C d'ATP sintasa
NCL-like	Catepsina D	Lipofuscina ceroide
Picnodisostosi	Catepsina K	Proteïnes de l'òs
Pompe	α -glucosidasa	Glicogen

4.2 PATOFISIOLOGIA

El concepte inicial sobre la patogènesi d'aquestes malalties postulava que aquestes eren causades per la deficiència d'un enzim lisosòmic seguida per l'acumulació d'un substrat majoritari que en situació normal seria degradat per aquest mateix enzim (Hers & Van Hoof, 1973). Com a conseqüència, el substrat ara no degradat s'acumulava al sistema E/L causant engrandiment de les cèl·lules, col·lapse de les funcions cel·lulars i eventualment mort cel·lular. Aquest efecte va rebre el nom de la "hipòtesi de la citotoxicitat" (Desnick et al., 1976). En els últims anys s'ha vist que aquesta és una concepció simplista, ja que en aquestes malalties a vegades s'acumulen diferents productes, i sovint aquest cúmul és secundari i no està directament relacionat amb el defecte enzimàtic primari; per exemple, en la malaltia de Niemann-Pick tipus C té lloc una acumulació secundària de gangliòsids GM2 i GM3 a les neurones.

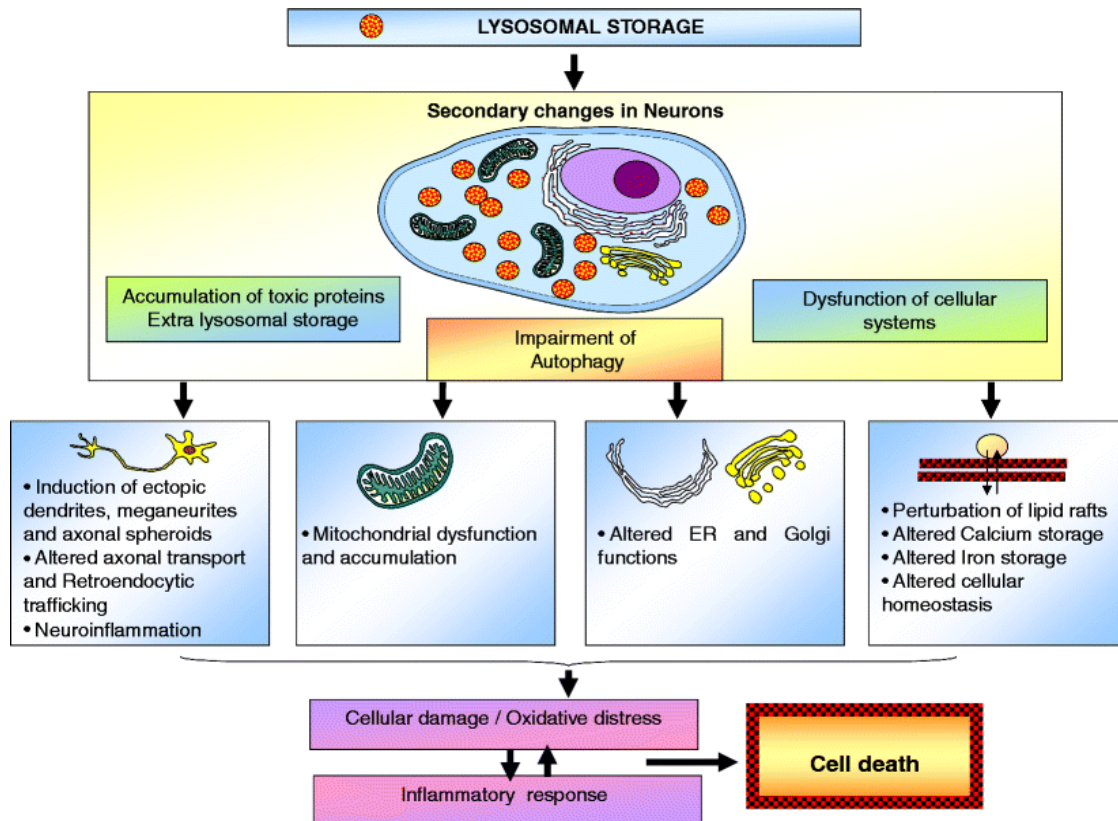


Figura 3. Mecanismes implicats en la neurodegeneració a les LSDs. Extret de Bellettato & Scarpa, 2010.

Moltes LSDs originen alteracions a nivell del sistema nerviós central (SNC), encara que la concentració del material acumulat és més baixa al cervell que en altres òrgans. Això possiblement és degut a la vulnerabilitat de les neurones, deguda al limitat potencial de regeneració i a la manca de vies metabòliques compensatòries (Futerman & van Meer, 2004). La neurodegeneració no és un

fenomen simple i aïllat; hi ha altres esdeveniments implicats, com: canvis secundaris en les neurones, transport axonal alterat (Coleman, 2005), disfunció de les vies de degradació proteica i macroautofàgica (Settembre et al., 2008), disfunció mitocondrial (Lin & Beal, 2006), alteració del calci intracel·lular i de les funcions del reticle endoplasmàtic (RE) (Mattson, 2007). A més, també s'ha considerat la possible associació entre el mecanisme inflamatori i la neurodegeneració, ja que les respostes inflamatòries en el cervell són comuns en les LSDs (Ausseil et al., 2008). Tots aquests mecanismes estan resumits a la Fig. 3.

4.3 CLÍNICA

Les LSDs originen diversos fenotips clínics, que van des de les formes clàssiques severes infantils fins a les formes més atenuades que normalment són de presentació més tardana. Una característica comuna a les LSDs és l'afectació del desenvolupament i la ràpida progressió dels símptomes. L'edat d'aparició d'aquestes malalties pot ser des d'una presentació neonatal fins a adulta, encara que la majoria són malalties pediàtriques. Més del 60% de les LSDs que afecten a la població infantil causen diferents graus de neurodegeneració i acostumen a correspondre's amb les formes més severes (Bellettato & Scarpa, 2010).

Molts signes i símptomes són comuns per a algunes d'aquestes malalties, fet que dificulta el diagnòstic. Alguns dels símptomes característics de les LSDs són: visceromegàlies (hepatomegàlia i esplenomegàlia), *hydrops fetalis*, dismorfismes, afectació del sistema nerviós central (retard psicomotor, atàxia, trastorns del comportament i psiquiàtrics), i anomalies de tipus esquelètic, cardíac, gastrointestinal, renal, oftalmològic i dermatològic (Wraith, 2002).

II. MALALTIES CAUSADES PER DEFECTES EN PROTEÏNES LISOSÒMIQUES DE MEMBRANA

LISOSÒMIQUES DE MEMBRANA

Algunes LSDs no són degudes a un defecte enzimàtic sinó que són causades pel funcionament incorrecte de proteïnes de membrana. Dins d'aquest grup es troben la cistinosi i la malaltia de Niemann-Pick tipus C, que són dues malalties de transport lisosòmic i són objecte d'estudi d'aquesta tesi.

1 LA CISTINOSI

La cistinosi (MIM 219800) és un defecte metabòlic que es caracteritza per l'acumulació intracel·lular de cistina, el disulfur de l'aminoàcid cisteïna, en els lisosomes de diferents teixits i òrgans. Aquest cúmul és conseqüència d'un error en el transport d'aquesta cistina a través de la membrana del lisosoma en direcció cap al citosol (Fig. 4).

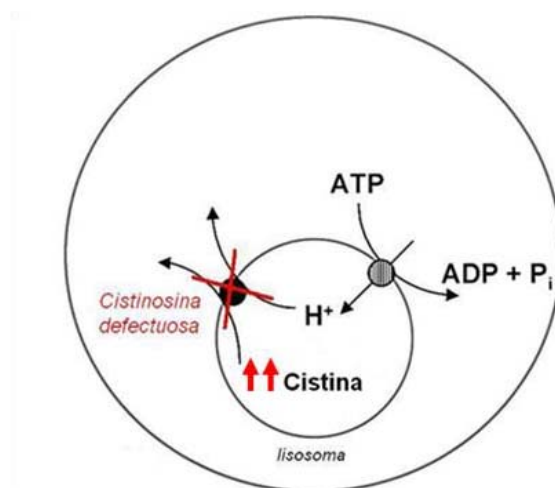


Figura 4. La cistinosi: un defecte de transport de la cistina a nivell lisosòmic. Modificat de Kalatzis & Antignac, 2002.

És una malaltia monogènica amb herència autosòmica recessiva, la qual s'estima que té una incidència d'un cas per cada 100.000-200.000 nascuts vius (Gahl et al., 2002).

1.1 ASPECTES HISTÒRICS

Encara que els primers casos de cistinosi van ser relatats per Abderhalden al 1903, no va ser fins als anys trenta que es van assolir més coneixements sobre aquesta malaltia; quan Fanconi, de Toni

i Debré per separat van descriure nens amb glucosúria renal, proteïnúria, acidosi i raquitisme hipofosfatèmic. Aquesta alteració tubular renal, anomenada síndrome de Fanconi, és característica de la cistinosi nefropàtica. A finals dels anys quaranta, Dent va observar una aminoacidúria generalitzada en pacients amb aquesta malaltia, malgrat la concentració d'aminoàcids en el plasma d'aquests era normal. Al 1952, Bickel i altres investigadors van descriure l'associació entre la síndrome de Fanconi i la progressió del dany glomerular en un gran nombre de pacients. Posteriorment, al 1967, l'anàlisi d'aminoàcids mitjançant cromatografia d'intercanvi iònic va ser prou sensible per mesurar petites quantitats de cistina en mostres de teixits. Aquesta tècnica va revelar elevades quantitats de cistina intracel·lular lliure en pacients amb cistinosi (Gahl et al., 2001).

1.2 METABOLISME DE LA CISTINA I PATOGÈNESI

La cistina és el producte de l'oxidació de dues molècules de cisteïna. Aquesta cistina es troba de manera abundant en diverses proteïnes, com la queratina del cabell, la insulina i alguns enzims digestius, on està involucrada en l'estabilització de l'estructura terciària d'aquestes macromolècules.

La cistina pot entrar directament als lisosomes mitjançant proteïnes que continguin cistina o bé entrar a la cèl·lula a través dels transportadors $b^{0,+}AT/rBAT$ de la membrana. Després de la degradació proteica, la sortida de cistina dels lisosomes via cistinosina està regulada per un gradient de protons, però defectes en aquesta originen l'elevació dels nivells de cistina característica de la cistinosi. La cistina citosòlica és reduïda a cisteïna, la qual és el substrat limitant del cicle responsable de la producció de glutatió (GSH), el major antioxidant de la cèl·lula.

Encara avui la patogènesi de la cistinosi no és del tot compresa, ja que no s'ha trobat una explicació prou convincent que vinculi l'acumulació lisosòmica de cistina amb la disfunció cel·lular i la síndrome de Fanconi. Les tres hipòtesis principals que han estat proposades al llarg dels anys han estat: l'alteració del metabolisme de l'ATP, l'increment de l'apoptosi o de l'oxidació cel·lular (Wilmer et al., 2010).

Observacions recents donen suport a la hipòtesi que, a més del transport de cistina, hi ha altres funcions lisosòmiques que estan danyades. S'ha observat l'acumulació d'autofagosomes en cèl·lules cistinòtiques, fet que indicaria que existeix una alteració en la fusió lisosoma-autofagosoma que podria induir la mort cel·lular (Periyasamy-Thandavan et al., 2009). També s'ha detectat un augment en l'activitat de la quitotriosidasa plasmàtica, la qual està associada amb l'activitat macrofàgica i induïda per l'estrès lisosòmic (Hollak et al., 1994).

1.3 DESCRIPCIÓ CLÍNICA

Com en altres malalties d'acumulació lisosòmica, les manifestacions inicials de la cistinosi generalment apareixen uns mesos després del naixement. Els primers símptomes de la cistinosi s'inicien amb la insuficiència dels túbuls renals a l'hora de reabsorbir petites molècules, causant la síndrome de Fanconi. Aquesta síndrome es caracteritza per una pèrdua excessiva per l'orina de proteïnes de baix pes molecular, glucosa, aminoàcids, fosfat, calci, magnesi, sodi, potassi, bicarbonat, carnitina, aigua i altres molècules petites. Això es tradueix en l'aparició de poliúria, polidipsia, desequilibri electrolític, deshidratació, raquitisme i retard del creixement (Broyer et al., 1981).

Posteriorment, si no s'administra el tractament, a més de la insuficiència renal crònica, que requereix diàlisi i/o trasplantament renal, poden sorgir altres complicacions a nivell retinal (fotofòbia), endocrí (hipotiroidisme), hepàtic, gastrointestinal, muscular i neurològic.

Basant-se en l'edat d'aparició i la severitat dels símptomes, s'han descrit diferents fenotips clínics (Gahl et al., 2001). La classificació general separa les formes nefropàtiques de les que no ho són. La cistinosi nefropàtica es divideix en la infantil (clàssica) i la intermèdia (juvenil o adolescent). La no nefropàtica, inicialment anomenada benigna o de tipus adulta, actualment rep el nom de cistinosi ocular, ja que l'ull és l'únic afectat.

- La cistinosi nefropàtica infantil (MIM 219800), la més comú i amb fenotip més sever, es caracteritza per un retard en el creixement i per l'aparició de la síndrome de Fanconi entre els 6 i 18 mesos d'edat, i si no es tracta hi ha insuficiència renal terminal abans dels 10 anys de vida.
- La cistinosi intermèdia o juvenil (MIM 219900), és d'aparició més tardana en el temps ja que es manifesta entre els 12 i 17 anys d'edat. No produeix una tubulopatia tan severa ni retard del creixement com en el cas de la forma infantil. La progressió de l'afectació glomerular és més lenta, però també evoluciona cap a la insuficiència renal terminal, entre la segona i tercera dècada de vida.
- La cistinosi ocular (MIM 219750) es presenta amb dipòsits de cristalls a la còrnia, però no està associada a l'afectació renal ni a la resta de manifestacions sistèmiques.

Fa un temps es va descriure un altre fenotip clínic, anomenat atípic, el qual es caracteritza per la presència de símptomes amb un grau de severitat que es troba entre la forma infantil i la intermèdia (Attard et al., 1999; Kalatzis et al., 2002).

1.4 DIAGNÒSTIC BIOQUÍMIC

El diagnòstic dels pacients es realitza mesurant el contingut de cistina en els leucòcits. El protocol a seguir consta de dues parts, l'aïllament de leucòcits a partir de sang sencera (Smolin et al., 1987) i la valoració de cistina. Els nivells de cistina poden mesurar-se emprant:

- el mètode de *cystine-binding protein* (Oshima et al., 1974). És un assaig específic i sensible que implica la utilització de CBP (*cystine-binding protein*) comercial i cistina marcada radioactivament. Aquest assaig es basa en la competició per unir-se a la CBP entre la cistina no marcada present a la mostra i la cistina marcada amb ^{14}C . Quant menor és la mesura de la radioactivitat, major és la quantitat de cistina lliure no marcada a la mostra (radiocompetició).
- cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC) (de Graaf-Hess et al., 1999).
- cromatografia líquida-espectrometria de masses (LC-MS/MS) (Chabli et al., 2007). Aquesta és la tècnica més sensible de totes les utilitzades.

Les persones sanes tenen menys de 0.2 nmols d'hemicistina per mil·ligram de proteïna, mentre que els pacients de cistinosi presenten valors superiors (els valors de cistina s'expressen en unitats d'hemicistina, degut a què els mètodes inicials de quantificació es basaven en una reducció de cistina seguida d'un assaig per determinar cisteïna). En el cas de la cistinosi infantil, la concentració de cistina intraleucocitària és superior a la de les altres formes i oscil·la entre 5 i 15 nmols hemicistina/mg de proteïna. Pel que fa a la cistinosi juvenil la concentració de cistina oscil·la entre 3 i 6 nmols, a diferència de la forma adulta en què es troba entre 1 i 3,5 nmols hemicistina/mg proteïna (Pintos, 2003).

1.5 CARACTERÍSTIQUES MOLECULARS

1.5.1 EL GEN *CTNS*

El gen responsable, *CTNS* (MIM 606272), codifica per una proteïna integral de membrana anomenada cistinosina la qual té la funció de transportar la cistina fora del lisosoma. Quan aquesta proteïna és deficient o bé està absent, la cistina lliure s'acumula als lisosomes i forma cristalls que danyen els òrgans on el gen s'expressa de manera més important, com són el ronyó, el pàncrees, el múscul esquelètic, els ulls, i en menor intensitat a la placenta, al cor, al pulmó, al fetge, i encara més dèbilment al cervell.

El gen *CTNS* va ser mapat al cromosoma 17p13 a l'any 1995 i aïllat al 1998. Aquest gen conté 12 exons, distribuïts a través d'aproximadament 23 kb del DNA genòmic, dels quals els dos primers no són codificants (Town et al., 1998). Al ser una malaltia monogènica, pel que sabem fins a l'actualitat, tots els pacients amb cistinosi presenten mutacions en aquest gen.

Posteriorment s'ha descrit un altre transcrit del gen *CTNS* que codifica per una isoforma anomenada CTNS-LKG (Taranta et al., 2008). Aquesta isoforma és deguda a un *splicing* alternatiu dins de l'exó 12, fet que reemplaça el pèptid senyal de localització al lisosoma de l'extrem C-terminal per una llarga seqüència d'aminoàcids. El paper a nivell cel·lular d'aquesta nova isoforma actualment està sent investigat.

Les mutacions descrites fins al moment inclouen delecions i insercions, a més de mutacions de canvi de sentit, sense sentit i canvis que afecten al mecanisme de *splicing*. També s'han descrit tres mutacions al promotor del gen *CTNS*, el qual s'estén 316 pb *upstream* del codó d'inici de la traducció (Phornphutkul et al., 2001), i s'ha demostrat que aquests canvis redueixen l'activitat d'aquest promotor.

A diferència de moltes altres malalties en què les mutacions més freqüents acostumen a ser les de canvi de sentit, a la cistinosi hi ha una alta incidència de delecions. Segons Shotelersuk i col·laboradors, la gran presència de delecions al gen *CTNS* és deguda a la susceptibilitat del cromosoma 17p a patir-les (Shotelersuk et al., 1998).

La mutació més comuna associada a la cistinosi és una delecio de 57kb (Town et al., 1998), que elimina els 9 primers exons i una part de l'exó 10 del gen *CTNS* (Forestier et al., 1999; Touchman et al., 2000), a més de la regió 5' *upstream* que codifica pel gen *CARKL* i els dos primers exons no codificants del gen *TRPV1*. La funció del gen *CARKL* ha estat identificada en la fosforilació de la sedoheptulosa, un metabòlit intermediari de la via de les pentoses fosfat (Wamelink et al., 2008). El gen *TRPV1* codifica per un canal d'ions, l'activació del qual s'ha suggerit que protegeix davant del dany renal (Wang et al., 2008). La contribució dels gens *CARKL* i *TRPV1* a la patogènesi dels pacients homozigots per la delecio de 57kb encara no ha estat del tot estudiada, però s'ha observat que aquests pacients tenen un fenotip extra-renal més sever i una major mortalitat (Gahl et al., 2007). Aquesta mutació es troba en el 75% dels al·lels mutats d'origen europeu i s'ha demostrat que és deguda a un efecte fundador que probablement es va donar a la meitat del primer mil·lenni (Forestier et al., 1999; Shotelersuk et al., 1998).

1.5.2 CORRELACIONS GENOTIP-FENOTIP

Pel que fa a la correlació genotip-fenotip bioquímic, s'han detectat diverses mutacions al gen *CTNS* (Town et al., 1998; Thoene et al., 1999; Anikster et al., 2000), la diferència entre les quals es troba en la quantitat d'activitat residual de la cistinosina.

Respecte a la correlació genotip-fenotip clínic, la majoria de les mutacions associades amb la forma infantil són mutacions que provoquen pèrdua de funció de la proteïna perquè la trunquen, ja sigui per una inserció/deleció que deriva en un codó *stop* prematur o bé perquè es crea una mutació sense sentit. Tot i així, algunes mutacions de canvi de sentit han estat detectades en el fenotip nefropàtic infantil, principalment en els últims tres segments transmembrana, i es pensa que aquestes tenen un efecte sever en l'estructura de la cistinosina. No obstant, la majoria de les mutacions de canvi de sentit estan més comunament associades a les formes clíniques intermèdies i generalment estan localitzades als segments que es troben entre els dominis transmembrana i a la regió N-terminal (Attard et al., 1999). Per tot això, sembla que els individus amb cistinosi infantil són portadors de mutacions severes en ambdós al·lels, mentre que els individus amb la forma juvenil de la malaltia presenten una mutació severa i una intermèdia, o bé dues d'intermèdies.

1.5.3 LA PROTEÏNA CISTINOSINA

La cistinosina és una proteïna lisosòmica de membrana de 55 kDa que consta de 367 aminoàcids, 7 dominis transmembrana, una regió N-terminal de 128 aminoàcids que inclou 7 llocs potencials de N-glicosilació i una cua C-terminal de 10 aminoàcids (Town et al., 1998). La cua C-terminal s'ha predit que està orientada cap al citosol i en canvi la regió N-terminal cap a la llum del lisosoma.

S'han identificat dues senyals que juguen un paper en la localització de la cistinosina al lisosoma: un motiu clàssic tirosina-GYDQL situat a la cua C-terminal i una nova senyal conformacional situada al cinquè *loop* (Cherqui et al., 2001).

Aquesta proteïna és un cotransportador de cistina i protons (Kalatzis et al., 2001). El sistema de transport de cistina es caracteritza per una cinètica saturable i un elevat grau d'especificitat pel lligand, la L-cistina, ja que no transporta altres aminoàcids.

1.6 TERÀPIA

L'èxit del tractament de la cistinosi requereix un diagnòstic primerenc, ja que si no s'aplica el tractament a la infància pot donar-se una insuficiència renal, que derivarà en la necessitat de fer diàlisi i/o trasplantament de ronyó.

Les necessitats terapèutiques dels individus afectes depenen de l'estadi de la malaltia en què es troben. Existeix la teràpia de suport que consisteix en el reemplaçament d'electròlits, i per altra banda hi ha la teràpia específica que es basa en el tractament amb cisteamina.

La cisteamina (β -mercaptoetilamina) és un aminotiol simple que depleciona la cistina dels lisosomes (Fig. 5). Després de travessar la membrana plasmàtica i lisosòmica, la cisteamina reacciona amb la cistina per produir cisteïna, una part de la qual surt lliurement i una altra mitjançant la formació del complex cisteïna-cisteamina, el qual pot sortir del lisosoma a través del transportador de lisina (Gahl et al., 1985). Si es pren el tractament correctament (per via oral a una dosi de 50 mg/kg/dia dividida en 4 preses al llarg del dia) es pot establitzar la funció glomerular, millorar la velocitat de creixement i evitar la necessitat de reposició d'hormona del creixement.

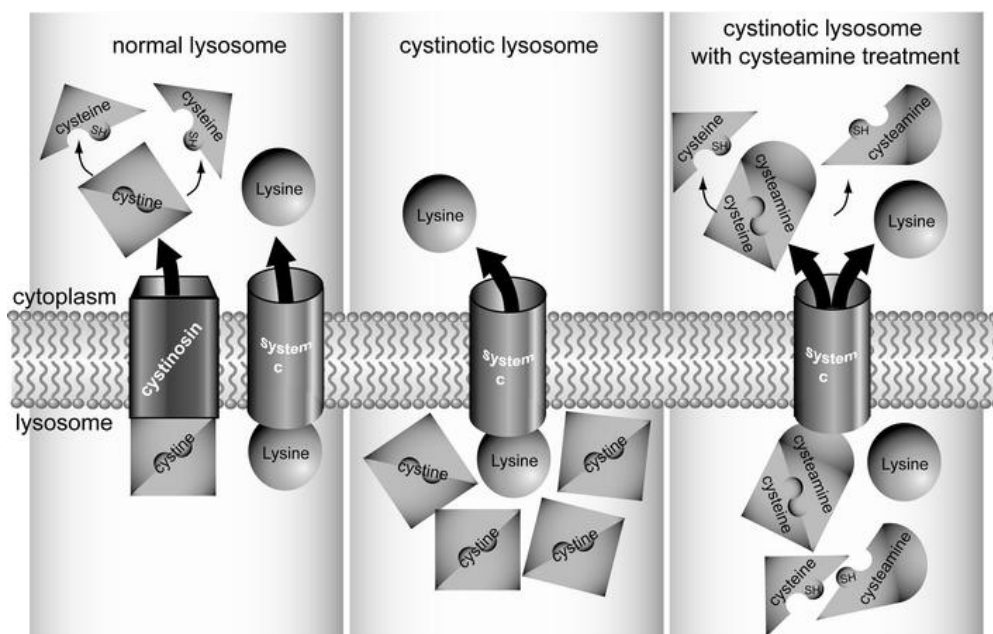


Figura 5. Mecanisme d'acció de la cisteamina. Extret de Wilmer et al., 2010.

Encara que l'administració de cisteamina (CystagonTM) alleuja molts dels símptomes associats a la cistinosi, no té efecte sobre l'acumulació de cristalls a la còrnia. Per aquest motiu s'ha provat el tractament amb cisteamina per via tòpica (col·liri), el qual ha estat eficient en la dissolució dels cristalls i a més mitiga la fotofòbia i el dolor als ulls.

2 LA MALALTIA DE NIEMANN-PICK TIPUS C

La malaltia de Niemann-Pick tipus C (NPC) (MIM 257220) és una malaltia d'acumulació lisosòmica complexa, que es caracteritza a nivell cel·lular pel cúmul de múltiples lípids, per l'homeòstasi incorrecte del calci lisosòmic i del colesterol, i pels defectes en el tràfic cel·lular.

El NPC és una malaltia monogènica que presenta una herència autosòmica recessiva i té una incidència estimada d'un cas per cada 120.000 nascuts vius (Vanier, 2010).

2.1 ASPECTES HISTÒRICS

A finals dels anys 20, Albert Niemann i Ludwig Pick van descriure un grup heterogeni de malalties d'acumulació lisosòmica que tenien en comú la presència d'hepatoesplenomegàlia i el cúmul d'esfingomielina, amb o sense implicació neurològica. Al 1958 Crocker i Farber van mostrar que existia una gran variabilitat clínica, igual que en els nivells d'esfingomielina acumulada en els teixits. Aquests fets van portar a Crocker a proposar una classificació en quatre subgrups: A, B, C i D (Crocker, 1961). Al 1966 Brady i col·laboradors van detectar una severa deficiència de l'activitat esfingomielinasa en teixits de pacients del tipus A i B, però no del C i el D (Brady et al., 1966). Treballs posteriors van portar a reclassificar el tipus C com un defecte cel·lular del tràfic de lípids, especialment del colesterol (Pentchev et al., 1984). El tipus D és una variant al·lèlica del tipus C, representada per individus amb origen a Nova Escòcia, on es detecta de manera homogènia la mutació p.G992W (Greer et al., 1998).

2.2 METABOLISME DEL COLESTEROL I PATOGÈNESI

El colesterol és un lípid fonamental per a les cèl·lules dels mamífers. És un component indispensable de les membranes cel·lulars i actua com a precursor de les hormones esteroidees, els oxisterols i la vitamina D; a més, la seva desregulació està implicada en nombrosos processos patològics. El manteniment dels nivells apropiats de colesterol a les membranes intracel·lulars és crucial per a la funció cel·lular. Els nivells de colesterol lliure són alts a la membrana plasmàtica (60-80% del colesterol cel·lular) i baixos al RE. Aquests nivells són fortament controlats per mecanismes que estan presents al RE. Tal com es mostra a la Fig. 6, el colesterol pot ser subministrat de manera exògena a les cèl·lules mitjançant la via del receptor de lipoproteïnes de baixa densitat (LDL), o alternativament pot ser sintetitzat *de novo* al RE per la HMG-CoA reductasa. Aquesta última via és emprada pel SNC degut a la incapacitat de les LDL de travessar la barrera hematoencefàlica.

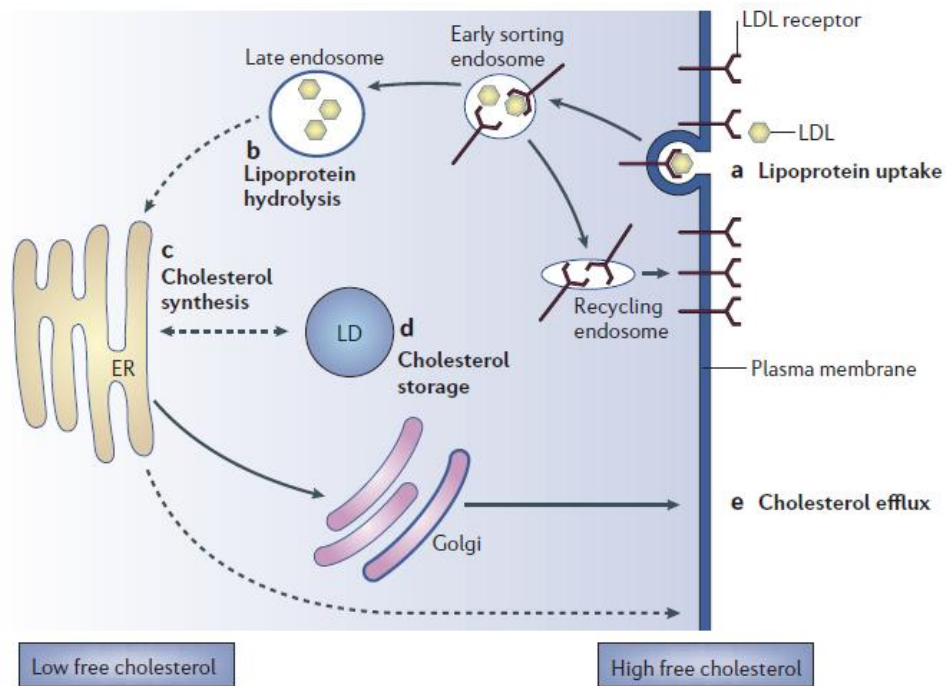


Figura 6. Regulació del colesterol intracel·lular. Extret de Martin & Parton, 2006.

El colesterol és endocitat com a éster de colesterol mitjançant els receptors de membrana de les LDL (a) i després circula cap als endosomes tardans/lisosomes on és hidrolitzat a colesterol lliure i àcids grassos per la lipasa àcida (b). Aquest colesterol lliure entra a formar part del conjunt cel·lular, juntament amb el colesterol sintetitzat *de novo* al reticle endoplasmàtic (ER) (c). L'excés de colesterol és transformat a ésters de colesterol i emmagatzemat en els *lipid droplets* (LD) (d), o es dirigeix a través de la superfície cel·lular cap a receptors extracel·lulars (e). A la figura, les línies contínues indiquen transport vesicular, mentre que les línies puntejades senyalen les vies en les que hi ha evidències tant de tràfic vesicular com no vesicular.

Les LDL endocitades són dirigides cap al sistema E/L, on són hidrolitzades i el colesterol lliure (no esterificat) és alliberat. En les cèl·lules normals, aquest colesterol és transportat ràpidament fora dels endosomes cap a la membrana plasmàtica i el RE (Mesmin & Maxfield, 2009). En canvi en les cèl·lules NPC, el colesterol no pot sortir de la via endocítica i s'acumula als lisosomes. A causa d'aquest segrest, la subsegüent inducció de les respostes homeostàtiques dependents de colesterol, especialment la formació d'ésters de colesterol, es retarda i també s'acumulen altres metabòlits com els esfingolípid (Patterson et al., 2001). Aquests esdeveniments són els que explicarien la patologia NPC a nivell visceral, ja que en el SNC els metabòlits majoritàriament acumulats són els gangliòsids GM2 i GM3, i tot i que el cúmul de colesterol és present, està en menor grau que en els teixits perifèrics (Zervas et al., 2001). Això seria la descripció de la visió clàssica de la patogènesi d'aquesta malaltia, representada esquemàticament a la Fig. 7, esquerra.

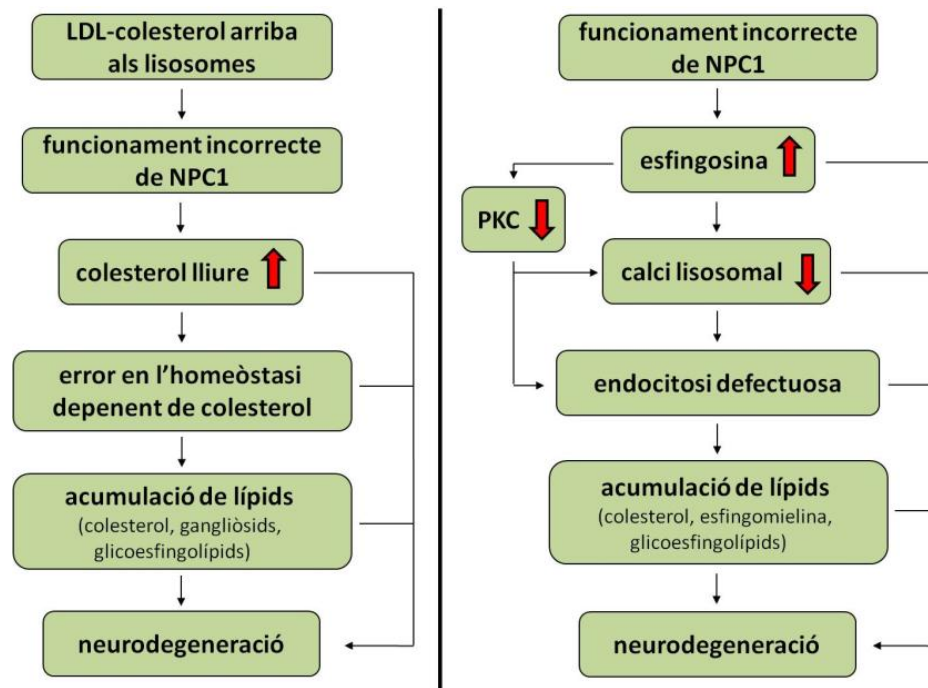


Figura 7. Visions clàssica (esquerra) i actual (dreta) de la patogènesi de la malaltia de Niemann-Pick tipus C.

Algunes línies d'investigació han suggerit que el colesterol no seria el principal metabòlit causant d'aquesta patologia, ja que:

- les teràpies per reduir els nivells de colesterol no tenen cap benefici en els pacients (Patterson et al., 1993).
- existeixen pacients amb fenotip bioquímic variant, els quals no tenen cúmuls tan importants de colesterol però presenten els trets clínics de la malaltia, igual que les formes clàssiques (Sun et al., 2001).
- s'ha demostrat a nivell experimental que a les cèl·lules NPC, el colesterol pot ser transportat fora del sistema E/L degut a: la sobreexpressió de Rab9 (Narita et al., 2005), l'activació de la proteïna quinasa C (PKC) (Walter et al., 2009) o l'elevació del calci citosòlic (Lloyd-Evans et al., 2008).
- s'ha documentat que en algunes malalties on la proteïna NPC1 és funcional, el colesterol també s'acumula als lisosomes (White et al., 2004; Trushina et al., 2006).
- el miglustat (NB-DNJ; OGT-918), l'únic tractament aprovat per la malaltia de NPC, redueix la biosíntesi de glicoesfingolípids sense reduir els nivells de colesterol (te Vruchte et al., 2004).

La ruta proposada que actualment sona amb més força, és la que té com a metabòlit destacat, l'esfingosina. Aquesta és un potent inhibidor de la PKC, dels canals de calci, del cicle cel·lular

i un mediador de l'apoptosi (Kågedal et al., 2001). Els nivells d'esfingosina estan elevats en les cèl·lules NPC, alhora que aquest és l'únic dels metabòlits que s'acumulen en aquesta patologia capaç d'induir el fenotip NPC en cèl·lules normals (Lloyd-Evans et al., 2008).

Segons aquest nova visió (Fig. 7, dreta), la disfunció de la proteïna NPC1 originaria la ràpida acumulació d'esfingosina que afectaria a les reserves de calci lisosòmic alhora modulades per la inhibició de la PKC. La inhibició de la PKC i la falta de sortida de calci des del compartiment E/L donarien lloc a defectes del tràfic cel·lular, que al seu torn causarien acumulacions secundàries d'altres lípids, com el colesterol i els glicoesfingolípid. Com a malaltia complexa, la neurodegeneració seria el resultat de la combinació d'aquests esdeveniments (Lloyd-Evans & Platt, 2010).

2.3 DESCRIPCIÓ CLÍNICA

La presentació clínica de la malaltia de NPC és molt heterogènia, amb diferents edats de presentació, compreses entre el període neonatal i l'edat adulta. De la mateixa manera, l'esperança de vida dels pacients varia entre pocs dies fins als 60 anys d'edat (Vanier & Millat, 2003).

La malaltia de NPC té implicacions viscerals, principalment a nivell del fetge i de la melsa, a més de manifestacions neurològiques que es presenten en diferents moments i tenen una evolució independent (Fig. 8).

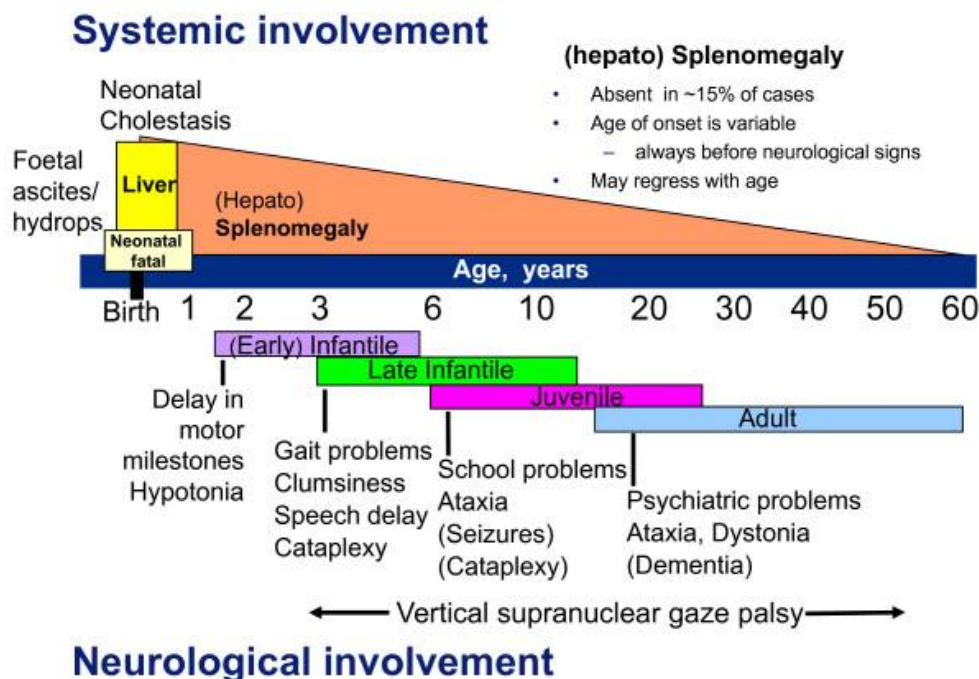


Figura 8. Representació esquemàtica dels diferents fenotips clínics amb els símptomes característics de cadascun, tant a nivell sistèmic com neurològic. Extret de Vanier, 2010.

Deixant de banda un petit grup de pacients que moren al naixement o durant els 6 primers mesos de vida a causa d'una fallada hepàtica o respiratòria, tots els pacients acaben desenvolupant una neurodegeneració progressiva i fatal. Els pacients amb la forma típica manifesten un trastorn neurològic que consisteix principalment en: atàxia cerebel·lar, disàrtria, disfàgia, demència progressiva i en la majoria dels casos paràlisi supranuclear de la mirada vertical (VSPG) (Solomon et al., 2005). La cataplexia, les convulsions i la distonia són altres trets força comuns; els trastorns psiquiàtrics són freqüents en el fenotip adult. Excepte a la forma neonatal, la malaltia sistèmica no acostuma a ser molt severa, per exemple, l'esplenomegàlia fluctua i acaba disminuint amb el temps.

Els fenotips clínics descrits segons l'edat d'aparició dels primers símptomes neurològics són (Wraith et al., 2009):

- Neonatal: una icterícia colestàtica prolongada apareix durant els primers dies o setmanes de vida, normalment associada a una hepatoesplenomegàlia progressiva (Kelly et al., 1993). En la majoria dels casos, la icterícia es resol espontàniament entre els 2-4 mesos i només l'hepatoesplenomegàlia es manté durant un període variable de temps, precedint l'aparició dels símptomes neurològics. Per contra, en el 10% d'aquests pacients, la icterícia empitjora ràpidament i acaba desembocant en una fallada hepàtica. Els nadons que presenten aquesta forma clínica severa acostumen a morir abans dels 6 mesos de vida (Vanier et al., 1988). Els pacients NPC no mostren manifestacions neurològiques durant el període neonatal, encara que hi ha exemples de pacients que han mort degut a aquesta forma neonatal severa, que tenen germans que presenten les formes neurològiques infantil o juvenil (Vanier & Millat, 2003).
- Infantil precoç (2 mesos-2 anys): el retard del desenvolupament motriu des dels 8-9 mesos i la hipotonia són els primers símptomes neurològics presents, els quals són plenament evidents entre els 1-2 anys. Els següents símptomes en aparèixer són: la pèrdua de les habilitats motores i una notable regressió mental seguida per una espasticitat pronunciada. La supervivència dels pacients rarament sobrepasa els 5 anys.
- Infantil tardana (2-6 anys): el retard en el llenguatge està present, a més d'alteracions de la marxa, freqüents caigudes i falta de destresa causades per l'atàxia, entre els 3-5 anys. La cataplexia es desenvolupa sovint i ocasionalment pot ser el símptoma de presentació principal. Els problemes motors empitjoren i el deteriorament neurològic es fa més evident. Una part important dels pacients presenten convulsions. Quan l'atàxia progressa, dóna lloc a la disfàgia, la disàrtria i la demència. En estadis tardans, els pacients desenvolupen

espasticitat i trastorns de la deglució, que en molts casos requereixen d'una gastrostomia. En aquest fenotip clínic, la mort es produeix entre els 7-12 anys.

- Juvenil (6-15 anys): una moderada esplenomegàlia (o hepatoesplenomegàlia) és un símptoma freqüent. Els problemes escolars que impliquen dificultats en l'escriptura i en l'atenció són molt comuns. La VSPG està present quasi de manera invariable i sovint és el primer indicatiu de malaltia. Els nens es tornen més maldestres i mostren majors dificultats d'aprenentatge. La cataplexia, típicament gelàstica, és un altre símptoma comú. L'atàxia aviat es fa òbvia, amb freqüents caigudes i dificultats per córrer; també apareixen la disàrtria i la disfàgia. En estadis posteriors, la disàrtria empitjora i els pacients deixen de caminar. Finalment, els pacients presenten espasticitat i trastorns de la deglució que requereixen d'una gastrostomia. L'esperança de vida és força variable, ja que alguns individus continuen vius als 30 anys (Wraith et al., 2009).
- Adulta (>15 anys): els trets comuns d'aquest fenotip clínic són: atàxia cerebel·lar, disàrtria, problemes cognitius, alteracions del moviment, esplenomegàlia, desordres psiquiàtrics i disfàgia (Sévin et al., 2007). La simptomatologia més comuna de la forma neurològica adulta és la mateixa que la de la forma juvenil però atenuada. Una tercera part dels casos tenen una presentació psiquiàtrica aïllada durant anys, abans de l'aparició dels símptomes motors i cognitius. Els símptomes psiquiàtrics consisteixen en quadres clínics molt diversos com: psicosi, deliris paranoïdes, al·lucinacions visuals i sonores, depressió, agressivitat i aïllament social.

Per realitzar el seguiment de la progressió de la malaltia o bé de la resposta al tractament, és important poder quantificar el grau de discapacitat causat pel deteriorament neurològic. Per aquest motiu, Pineda i col·laboradors van dissenyar una escala de discapacitat específica per aquesta malaltia (Iturriaga et al., 2006; Pineda et al., 2010), la qual es troba representada a la Taula 2.

Taula 2. Escala de discapacitat per a la malaltia de Niemann-Pick tipus C. Extret de Pineda et al., 2010.

Deambulació	Puntuació	Llenguatge	Puntuació
Maldestre	1	Retard en l'aprenentatge	1
Marxa atàxica autònoma	2	Disàrtria moderada	2
Deambulació assistida a l'exterior	3	Disàrtria severa	3
Deambulació assistida a l'interior	4	Comunicació no verbal	4
Cadira de rodes	5	Absència de comunicació	5

Manipulació	Puntuació	Deglució	Puntuació
Tremolor	1	Masticació anormal	1
Dismetria/distonia lleu	2	Disfàgia ocasional	2
Dismetria/distonia moderada	3	Disfàgia diària	3
Dismetria/distonia severa	4	Tub nasogàstric/botó gàstric	4

Epilèpsia	Puntuació	Moviments oculars	Puntuació
Convulsions ocasionals	1	Seguiment ocular lent	1
Convulsions sensibles als antiepilèptics	2	Oftalmoplègia vertical	2
Convulsions resistents als antiepilèptics	3	Oftalmoplègia completa	3

2.4 DIAGNÒSTIC BIOQUÍMIC

Els tests realitzats de rutina al laboratori acostumen a donar resultats normals en els pacients NPC. També existeixen algunes anàlisis que poden encaminar cap al diagnòstic, però que no són específiques, com:

- el perfil de lípids en plasma, que sembla correlacionar amb el grau de severitat de l'acumulació de colesterol (Garver et al., 2010).
- l'activitat quitotriosidasa es troba moderadament elevada (Ries et al., 2006) però a vegades pot ser normal.
- l'activitat esfingomielinasa és normal o elevada en leucòcits (això permet realitzar el diagnòstic diferencial amb la malaltia de Niemann-Pick tipus A/B) però sovint es troba parcialment deficient en fibroblasts (Vanier & Millat, 2003).

Actualment el diagnòstic bioquímic específic per la malaltia de NPC es basa en demostrar que existeix un augment del colesterol a nivell E/L i una disminució dels ésters de colesterol. Existeixen dos mètodes, el test de la filipina i la mesura de la velocitat de formació d'ésters de colesterol, els quals requereixen la utilització de cèl·lules vives i per aquest motiu s'empra com a mostra el cultiu de fibroblasts de la pell.

- El test de la filipina és l'assaig més sensible i específic. Durant uns primers dies els fibroblasts són cultivats en un medi suplementat amb un sèrum sense lipoproteïnes (LPDS) i després en un medi complert. A continuació, les cèl·lules són fixades i tenyides amb filipina, un antibiòtic sintètic que forma de manera específica complexos amb el colesterol lliure. L'examinació de les mostres mitjançant microscopia de fluorescència revela la presència de nombroses vesícules perinuclears fluorescents en les cèl·lules NPC positives (Fig. 9a). Aquest patró de cúmul abundant, el qual rep el nom de fenotip bioquímic clàssic, s'observa en un 80-85% dels casos, aproximadament. A la resta dels casos, després de cultivar els fibroblasts en un medi suplementat amb LDL pures enlloc del medi complert, s'observa un cúmul moderat descrit com a fenotip bioquímic variant (Fig. 9c i d) (Vanier et al., 1991).
- La cinètica de la formació d'ésters de colesterol mostra valors molt baixos en les línies cel·lulars amb fenotip bioquímic clàssic però només un defecte moderat en aquelles amb fenotip variant (Vanier et al., 1991). Aquest test és complex, es realitza mitjançant una tècnica radioactiva, a més té un cost elevat i requereix molt temps, per això només s'utilitza com a test secundari en alguns laboratoris.

La valoració del cúmul de colesterol en els fibroblasts cultivats dels pacients utilitzant la tècnica citoquímica proporciona un diagnòstic clar en la majoria dels casos, però pot ser difícil prendre una decisió respecte algunes línies cel·lulars que no presenten un test de filipina clarament positiu. En

aquest casos i en els que tot i mostrar una filipina negativa, la història clínica sigui molt suggestiva de NPC, l'anàlisi mutacional és indispensable per a establir un diagnòstic definitiu.

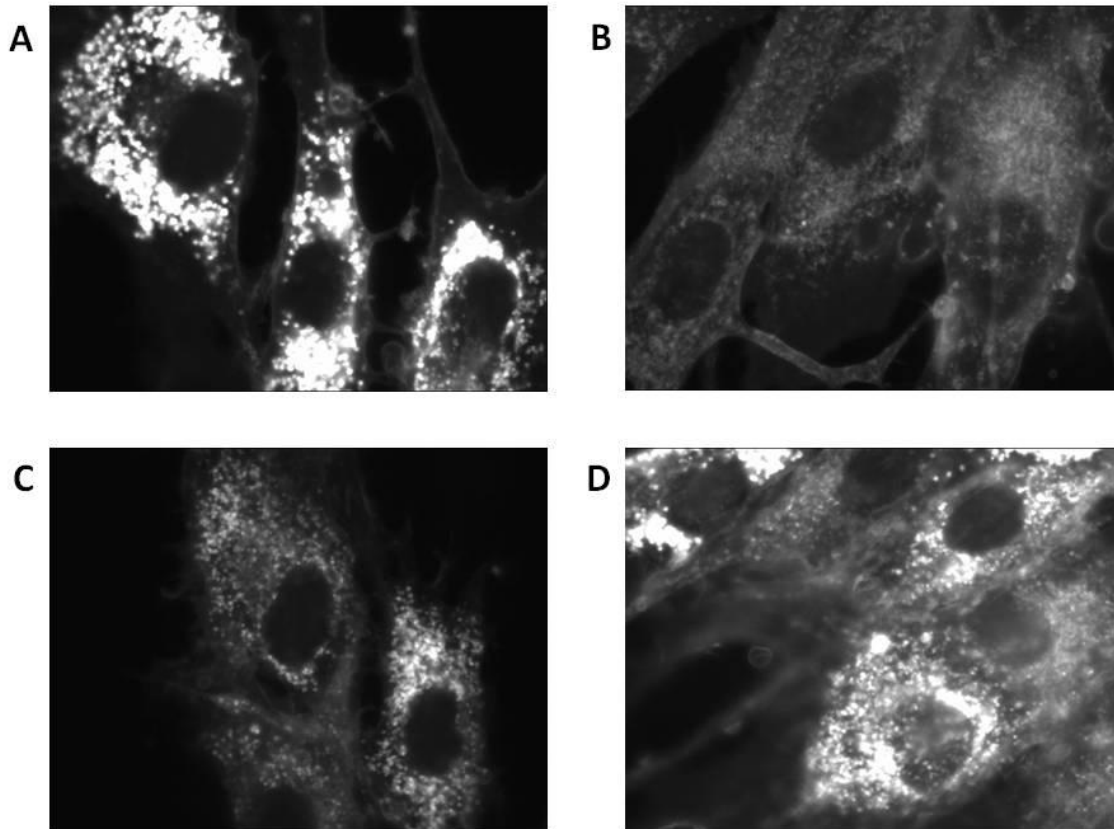


Figura 9. Imatges de microscopia de fluorescència de fibroblasts després de realitzar el test de la filipina (realitzades pel nostre grup a la Secció d'Errors Congènits del Metabolisme (IBC)).

A) Fibroblasts NPC amb fenotip bioquímic clàssic; B) Fibroblasts control; C) Fibroblasts NPC amb fenotip bioquímic variant; D) Fibroblasts NPC amb fenotip bioquímic variant suplementats amb LDL pures durant 24h.

Recentment, s'ha demostrat que dos productes de l'oxidació del colesterol, el $\text{cholestane-3}\beta,5\alpha,6\beta\text{-triol}$ i el 7-ketocholesterol , es troben incrementats de manera considerable al plasma dels pacients NPC1, suggerint l'ús d'aquests oxisterols de cara al diagnòstic i l'avaluació del tractament en aquesta malaltia (Porter et al., 2010). Per aquest motiu, s'ha desenvolupat un mètode sensible i específic de LC-MS/MS per quantificar aquests oxisterols en el plasma, el qual podria representar una millora diagnòstica gràcies a què és una tècnica ràpida i no invasiva (Jiang et al., 2011).

A la Fig. 10 es recull un algorisme diagnòstic d'ús al laboratori (Patterson et al., 2012) que acaba de ser consensuat pel *The NP-C Guidelines Working Group*.

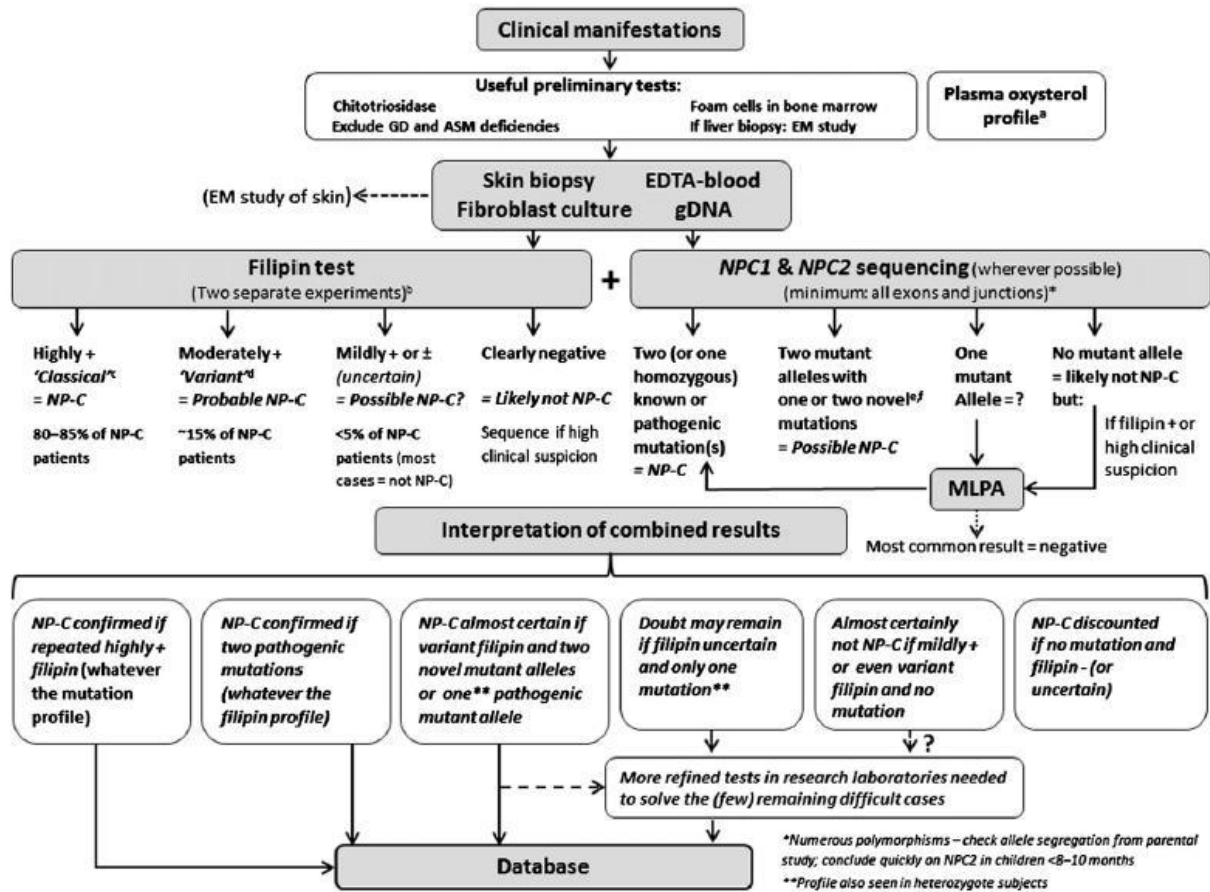


Figura 10. Algorisme diagnòstic de laboratori proposat pel *The NP-C Guidelines Working Group*. Extret de Patterson et al., 2012.

2.5 CARACTERÍSTIQUES MOLECULARS

2.5.1 ELS GENS *NPC1* I *NPC2*

La presència de mutacions en algun dels dos gens, *NPC1* (MIM 607623) o *NPC2* (MIM 601015), és la causa d'aquesta malaltia.

El gen *NPC1*, situat al cromosoma 18q11-q12, ocupa 56 kb i conté 25 exons (Carstea et al., 1997). Aproximadament el 95% dels pacients presenten mutacions en aquest gen, el qual codifica per una gran glicoproteïna de membrana que majoritàriament es localitza als endosomes tardans (Higgins et al., 1999). Fins al moment, el número de mutacions identificades en el gen *NPC1* està proper a les 300. La mutació p.I1061T és particularment prevalent (20-25% dels al·lels) a determinats països com França i Regne Unit (Millat et al., 1999), però és molt menys freqüent a Portugal, Espanya i Itàlia (Ribeiro et al., 2001; Fernandez-Valero et al., 2005; Fancello et al., 2009). La segona mutació més freqüent a Europa, és la p.P1007A (Greer et al., 1999; Millat et al., 2001a). La mutació p.G992W, típica dels pacients de Nova Escòcia (tipus D de la malaltia) (Greer et al., 1998), es troba esporàdicament en

pacients d'un altre origen. A mida que es genotipen més pacients, un major nombre de mutacions són classificades com a recurrents, encara que algunes d'elles es troben principalment en pacients amb un origen ètnic comú.

El gen *NPC2* (conegut inicialment com *HE1*), situat al cromosoma 14q24.3, ocupa 13.5 kb i conté 5 exons (Naureckiene et al., 2000). Fins avui només s'han identificat a tot el món 30 famílies amb mutacions en aquest gen, hi ha al voltant de 20 mutacions descrites. La proteïna lisosòmica per la qual codifica és soluble i s'uneix al colesterol no esterificat amb gran afinitat (Ko et al., 2003; Vanier & Millat, 2004). La mutació sense sentit p.E20X és relativament freqüent (Millat et al., 2001b; Verot et al., 2007).

2.5.2 CORRELACIONS GENOTIP-FENOTIP

Els estudis publicats fins al moment que parlen sobre correlacions genotip-fenotip en els pacients NPC, tant els que tenen mutat el gen *NPC1* com el *NPC2*, coincideixen en què les mutacions correlacionen amb la presentació neurològica de la malaltia però no amb les manifestacions sistèmiques (Vanier & Millat, 2003).

Al gen *NPC1*, les mutacions sense sentit o les de canvi de pauta de lectura presenten una bona correlació amb la forma neurològica més severa. Les mutacions de canvi de sentit posen de manifest la importància funcional de dos dominis de la proteïna NPC1, el *sterol-sensing domain* i el *cysteine-rich luminal loop*. Pel que fa al primer, les mutacions que es presenten en homozigosi són molt deletèries, ja que donen lloc a falta de proteïna NPC1 madura i per tant a un fenotip tant bioquímic com clínic molt sever (Millat et al., 2001a). El *cysteine-rich luminal loop* conté aproximadament un terç de totes les mutacions descrites, amb un impacte a nivell cel·lular i clínic variable (Greer et al., 1999; Park et al., 2003); per exemple, les dues mutacions prevalents esmentades anteriorment estan localitzades en aquest domini. La p.I1061T en homozigosi ha estat clàssicament associada a un fenotip bioquímic clàssic i a la forma clínica juvenil (Millat et al., 1999). En canvi, la p.P1007A és una mutació que típicament dóna lloc a un fenotip bioquímic variant (Greer et al., 1999; Millat et al., 2001a), i en homozigosi ha estat descrita en dos germans amb la presentació adulta de la malaltia (Ribeiro et al., 2001).

De la mateixa manera, al gen *NPC2*, les mutacions que trunquen la proteïna estan associades amb els fenotips neurològics més severos. Per contra, les mutacions de canvi de sentit descrites es corresponen amb formes clíniques més diverses, incloent la juvenil i l'adulta (Millat et al., 2001b; Chikh et al., 2005; Verot et al., 2007).

2.5.3 LES PROTEÏNES NPC1 I NPC2

La proteïna NPC1 és una gran glicoproteïna (1277 aminoàcids) de 13 dominis transmembrana (Fig. 11), la qual resideix principalment als endosomes tardans i interacciona de manera transitòria amb els lisosomes i el trans-Golgi *network* (Higgins et al., 1999; Neufeld et al., 1999).

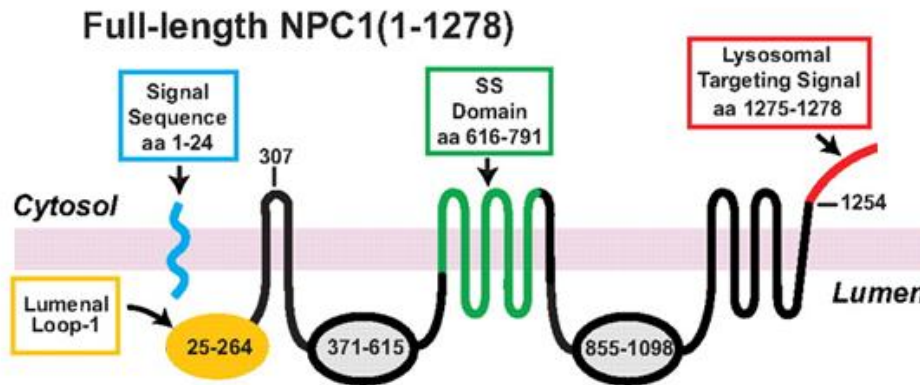


Figura 11. Model de l'estructura de la proteïna NPC1. Extret de Infante et al., 2008.

El model està basat en el treball de Davies & Ioannou 2000. El domini *sterol-sensing domain* (SSD) està localitzat entre el tercer i setè segment transmembrana.

Posseeix un *sterol-sensing domain* (aminoàcids 615-797) que presenta homologies amb HMG-CoA reductasa, SCAP, patched i NPC1L1; tot i que sembla necessari per a la funció de la proteïna, encara que es desconeix el seu rol exacte. Dos dels dominis luminals semblen jugar un paper en les interaccions proteïna-proteïna: el *cysteine-rich loop* amb un *ring-finger motif* (aminoàcids 855-1098), i un domini altament conservat amb un *leucine-zipper motif* localitzat a la cua N-terminal (aminoàcids 25-264) (Davies & Ioannou, 2000). Aquest últim s'ha demostrat que posseeix un lloc d'unió a colesterol.

La proteïna NPC2 és petita (132 aminoàcids) i soluble. És transportada als lisosomes per la via del receptor de manosa-6-fosfat i uneix colesterol amb gran afinitat (Storch & Xu, 2009).

Encara que la NPC1 i la NPC2 són proteïnes força diferents a nivell molecular, el fenotip que presenten els pacients NPC que tenen mutacions al gen *NPC1* o *NPC2* no són diferenciables. Per aquest motiu, s'assumeix que ambdues proteïnes cooperen en la sortida del colesterol de l'interior del lisosoma, treballant seqüencialment en la mateixa via.

Basant-se en el que es coneix a l'actualitat, s'ha proposat un model "*handoff*" on les dues proteïnes treballarien coordinadament (Kwon et al., 2009). Segons aquest model, mostrat a la Fig. 12, el colesterol de l'interior del lisosoma s'uniria a NPC2 amb el seu grup hidroxil exposat; a continuació,

tindria lloc una transferència d'aquest al domini N-terminal de NPC1, quedant la zona hidrofòbica orientada cap a la membrana i això permetria la sortida del colesterol cap al citosol a través del glicocàlix. Recentment, s'ha publicat un treball (Deffieu & Pfeffer, 2011) que donaria suport a aquest model, ja que es demostra la interacció directa a pH àcid entre les proteïnes NPC1 i NPC2, concretament en el segon domini luminal de la proteïna NPC1 i no a nivell de l'extrem N-terminal com s'havia especulat (Wang et al., 2010).

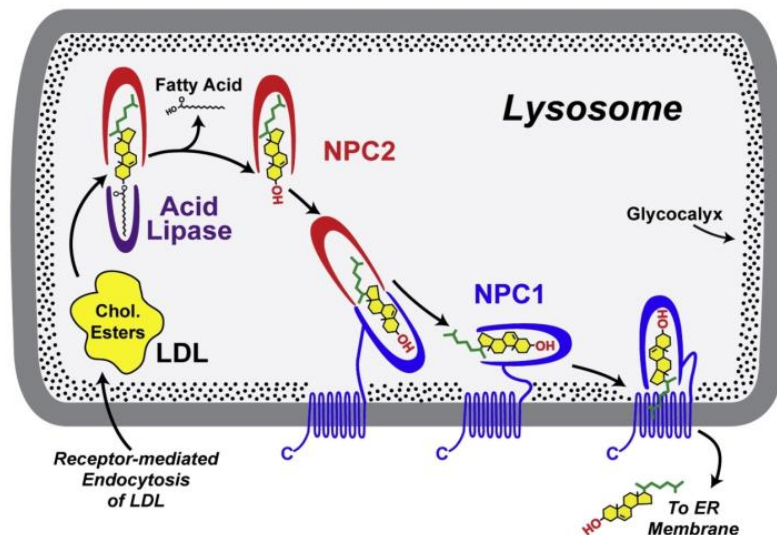


Figura 12. Model proposat de transferència del colesterol des de les LDL via NPC2-NPC1 fins a la membrana lisosòmica. Extret de Kwon et al., 2009.

Com té lloc la sortida del colesterol cap al citosol es desconeix, encara que sembla ser que aquest seria transferit des de la llum dels lisosomes per NPC1 a un acceptor citosòlic. S'ha descrit que aquest podria ser ORP5, una proteïna de la família de les ORPs (*OSBP-related proteins*), la qual interactuaria amb NPC1 en zones de membranes d'unió transitòria entre la membrana del lisosoma i la del RE (Du et al., 2011).

Alguns estudis indiquen que el paper de les proteïnes NPC2/NPC1 en el transport de colesterol està restringit als lisosomes. Hi ha dades que suggereixen que el moviment del colesterol des de la membrana plasmàtica al RE no requereix de NPC1 (Abi-Mosleh et al., 2009), a més la implicació d'aquestes dues proteïnes en el processament cel·lular del colesterol sintetitzat de forma endògena és encara un tema de debat (Cruz & Chang, 2000).

Existeixen diverses incerteses sobre les funcions precises que realitzen NPC1 i NPC2. S'ha suggerit també que podrien estar involucrades en els processos de fusió/fissió entre l'endosoma tardà i el lisosoma. Una altra qüestió sense resoldre és si NPC1 regula directament o fa de mediador en el

transport d'altres materials lisosòmics. Uns bons candidats serien els glicolípid, els quals representen la principal acumulació lipídica al cervell, en contraposició a la quantitat minoritària de colesterol que hi ha a les neurones. L'acumulació dels gangliòsids GM2 i GM3 al cervell no és específica de la malaltia de NPC, encara que l'increment de GM2 té lloc molt abans i és major en aquesta que en altres malalties lisosòmiques (Walkley & Vanier, 2009). Però fins al moment no hi ha dades publicades que donin suport a la idea de què els glicolípid siguin transportats per NPC1 o NPC2.

2.6 TERÀPIA

Gran part de la teràpia es basa en intentar pal·liar mitjançant tractament farmacològic els diferents símptomes, com per exemple, l'epilèpsia, la cataplexia, la distonia i l'espasticitat (Pérez-Poyato & Pineda, 2011).

Pel que fa al tractament específic de la malaltia, s'han provat sense èxit el transplantament de moll d'os (Hsu et al., 1999) i el transplantament de fetge (Gartner et al., 1986), ja que en ambdós casos la progressió del deteriorament neurològic no s'atura.

Per altra banda, basant-se en la hipòtesi que el colesterol és el principal causant de la patologia, es va provar l'administració de fàrmacs hipocolesterolèmics juntament amb una dieta baixa en colesterol; i encara que semblava reduir la quantitat de colesterol al fetge, no es va observar cap millora en la simptomatologia neurològica després de 2 anys de tractament (Schiffmann, 1996).

A arrel de què l'acumulació de glicolípid semblava estar relacionada amb la neuropatologia d'aquesta malaltia, es va decidir administrar el miglustat, un inhibidor de la glucosilceramida sintasa que travessa la barrera hematoencefàlica (Fig. 13), aprovat anteriorment com a teràpia de reducció de substrat en la malaltia de Gaucher tipus 1. Es va iniciar un assaig clínic, primer en pacients adolescents i adults, i posteriorment en nens, el resultat del qual va ser l'estabilització del curs de la malaltia en el 72% dels pacients tractats durant un any o més (Patterson et al., 2007). Al gener de 2009, la Unió Europea va aprovar la indicació del miglustat com a tractament de les manifestacions neurològiques en pacients NPC adults i pediàtrics. Un estudi multicèntric internacional d'una cohort de 66 pacients tractats amb miglustat durant una mitja de 1,46 anys (Pineda et al., 2009), va mostrar una reducció significativa de la velocitat de progressió de la malaltia en la majoria dels pacients. Les formes clíniques d'inici tardà generalment són les que responen millor. Recentment, *The NP-C Guidelines Working Group* ha discutit sobre la indicació, la utilitat clínica i la monitorització del tractament amb miglustat (Wraith et al., 2009; Patterson et al., 2012). Es recomana tractar els pacients tan aviat com mostrin alguna manifestació neurològica. Degut als efectes adversos ja coneguts del miglustat, com

diarrea, gasos, pèrdua de pes i tremolors, no és recomanable tractar pacients que de moment només presentin simptomatologia sistèmica. Cal senyalar que el miglustat no té cap efecte sobre les manifestacions sistèmiques de la malaltia de NPC.

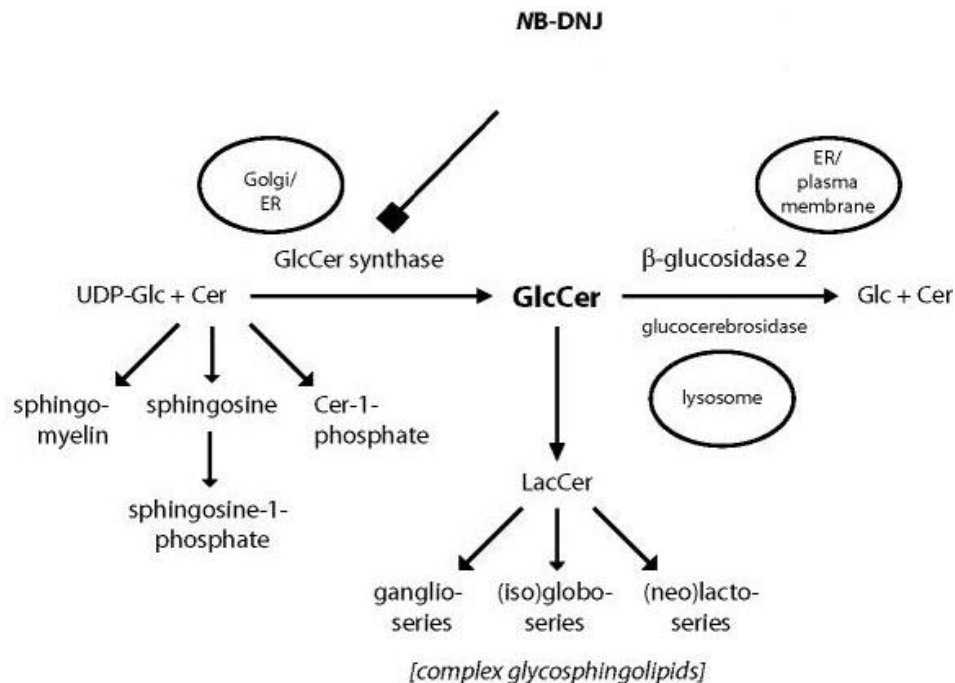


Figura 13. Mecanisme d'acció del miglustat en el metabolisme dels esfingolípid. Modificat de van der Spoel et al., 2008.

Actualment s'està duent a terme una intensa recerca per trobar altres vies terapèutiques mitjançant l'ús de models cel·lulars o animals. S'han publicat dades sobre el tractament de ratolins models de NPC amb imatinib (Alvarez et al., 2008), curcumina (Lloyd-Evans et al., 2008), fàrmacs antiinflamatoris (Smith et al., 2009), neuroesteroides com l'alopregnanolona (Mellon et al., 2008), i 2-HP-β-ciclodextrina (Davidson et al., 2009). En el cas de la curcumina, s'ha observat guany de pes, increment de la mobilitat, disminució de la tremolor i major supervivència que els no tractats. Alhora aquest tractament redueix els nivells de glicoesfingolípid i esfingosina-1-fosfat als cervells dels ratolins NPC (Lloyd-Evans et al., 2008). Pel que fa a la 2-HP-β-ciclodextrina, la seva administració dóna com a resultat una reducció dels nivells de diversos lípids acumulats, tant al fetge com al cervell dels ratolins NPC, a més d'un efecte significatiu en l'esperança de vida d'aquests (Davidson et al., 2009). A Estats Units s'està tractant d'aconseguir una designació de fàrmac orfe per aquest últim compost, però el traspàs de la majoria d'aquests assajos a pacients humans no és senzill, tant pel que fa a efectes adversos (Ward et al., 2010) com a la limitació que suposa administrar el tractament quan ja fa temps que els símptomes han aparegut.

III. MECANISMES MOLECULARS ANALITZATS EN AQUESTA TESI

1 *SPLICING*

El *splicing* és una etapa crucial de l'expressió gènica, que consisteix en l'eliminació dels introns del pre-mRNA i la unió dels exons per donar lloc al mRNA madur. Les funcions de la maquinària de *splicing*, anomenada *spliceosoma*, són: identificar de manera fiable els exons, ignorar els segments de pre-mRNA que imiten exons (pseudoxons), unir els exons contigus i regular de manera apropiada el *splicing* alternatiu per satisfer les necessitats fisiològiques de les cèl·lules i els teixits (Wang & Cooper, 2007).

1.1 LES SENYALS I LA MAQUINÀRIA DE *SPLICING*

Per generar correctament un mRNA madur, el mecanisme de *splicing* requereix de l'acció coordinada de diversos elements que actuen en *cis*, els quals componen el que rep el nom del codi del *splicing*. Entre aquests elements es troben les senyals canòniques (Fig. 14) que consisteixen en seqüències conservades que estan localitzades a les proximitats de les zones d'unió exó-intró: el 5' *splice site* (5'SS), el 3' *splice site* (3'SS), el *branch site* que està situat upstream del 3'SS i el polypyrimidine tract (PPT) que està localitzat entre el 3'SS i el *branch site* (Cartegni et al., 2002). Aquestes seqüències inicialment són reconegudes per complementarietat de bases amb RNAs nuclears petits (*small nuclear RNAs*, snRNAs), els quals s'associen a proteïnes per formar les ribonucleoproteïnes nuclears petites (*small nuclear ribonucleoprotein particles*, snRNPs) que conjuntament amb altres proteïnes (factors de *splicing*) donen lloc al *spliceosoma* (Wang & Cooper, 2007).

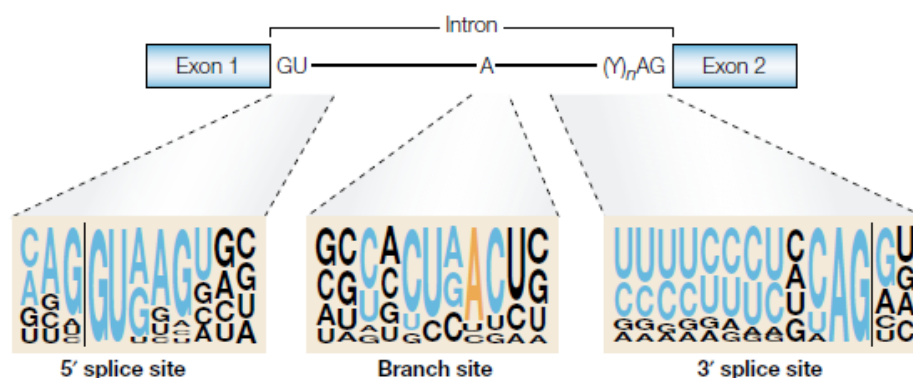


Figura 14. Senyals canòniques del *splicing*. Extret de Cartegni et al., 2002.

Es mostren les seqüències consens humanes, on la mida dels nucleòtids és proporcional a la freqüència de cadascun en cada posició.

Les senyals canòniques no són suficients per si soles per a definir els exons, ja que hi ha moltes seqüències presents en els pre-mRNAs que segueixen els mateixos patrons i que no són considerades com a tals per la maquinària de *splicing*. Són necessaris altres motius menys conservats, adjacents als llocs donadors i acceptors de *splicing* que també participen en el procés (Fig. 15). Es tracta dels llocs exònics o intrònics estimuladors del *splicing* (ESE i ISE, respectivament) i els llocs exònics o intrònics inhibidors del *splicing* (ESS i ISS, respectivament) (Smith & Valcárcel, 2000; Hastings & Krainer, 2001), els quals dirigeixen la maquinària als llocs apropiats i inhibeixen l'ús de llocs crítics de *splicing*. Aquestes seqüències interaccionen amb un grup de proteïnes, les proteïnes SR, que actuen com a lloc d'ancoratge de les altres proteïnes que intervien en el *splicing* i permeten l'estructuració del *spliceosoma* al seu voltant (Reed, 1996; Graveley, 2000).

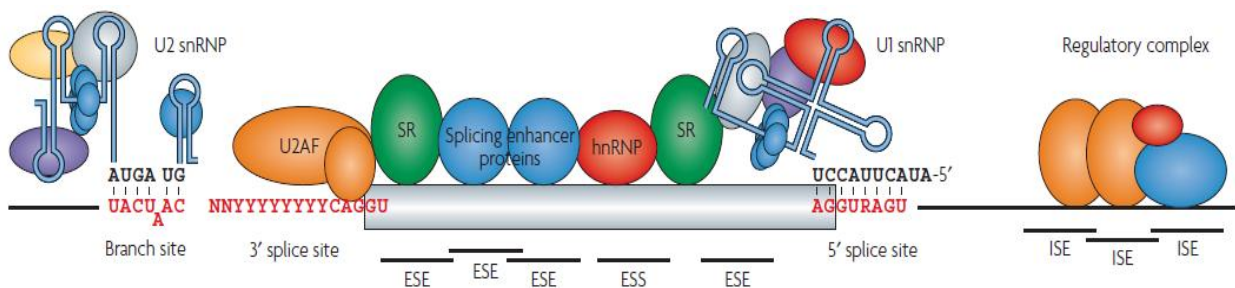


Figura 15. La maquinària de *splicing*. Extret de Wang & Cooper, 2007.

A més de les seqüències en *cis*, també és important l'acció dels elements en *trans* i és aquí on de nou prenen importància les proteïnes SR. Aquestes proteïnes juguen un paper essencial en el reconeixement tant dels llocs de *splicing* constitutiu com dels de *splicing* alternatiu (veure apartat III.1.3 de la introducció) (Graveley, 2000; Sanford et al., 2003). Es caracteritzen per la presència d'un domini RS i un o dos dominis d'unió al RNA del tipus RRM. El domini RS, que és el que els hi dona nom, és un domini ric en arginines (R) i serines (S), i és el que acostuma a permetre la interacció amb els altres factors de *splicing* (Bourgeois et al., 2004). Les proteïnes SR intervien en el *splicing* constitutiu afavorint la captació i l'estabilització de la snRNP U1 i l'U2AF als llocs de splicing 5' i 3', respectivament.

1.2 EL MECANISME DE *SPLICING* ALS MAMÍFERS

Tal com es representa a la Fig. 16, la formació del *spliceosoma* és iniciada pel reconeixement del 5' *splice site* (lloc donador de *splicing*) per part de la snRNP U1 mitjançant interaccions RNA-RNA i la col·laboració de diferents factors. Alhora, el 3' *splice site* (lloc acceptor de *splicing*) i el *branch site* (lloc de ramificació) són reconeguts per l'U2AF. Aquestes proteïnes, junt amb les proteïnes de la

família SR, estableixen ponts entre els llocs 5' i 3' d'un mateix exó o d'exons diferents a través de l'intró que els separa. Posteriorment s'uneix la snRNP U2 al *branch site* per permetre la unió del complex snRNP U4/U6 i U5. Amb la unió de totes les snRNPs, el complex esdevé catalíticament actiu i es procedeix al tall i a l'empalmament dels dos exons mitjançant un mecanisme consistent en dos passos catalítics de transesterificació.

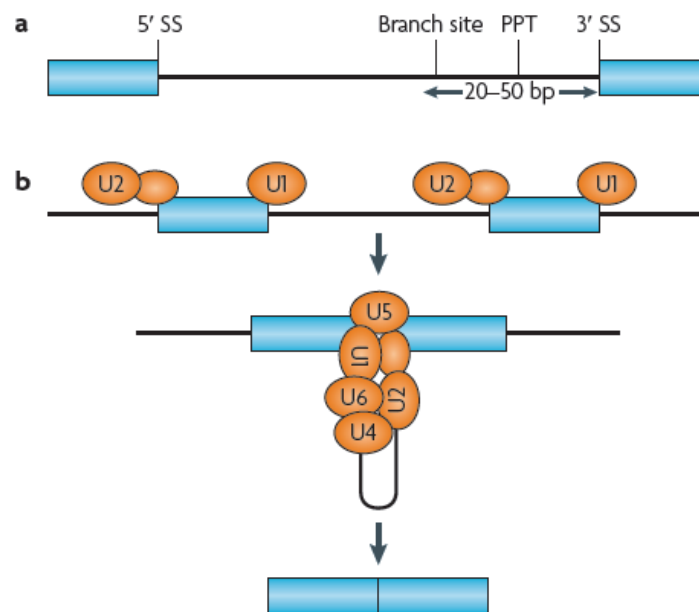


Figura 16. Passos clau del mecanisme de *splicing*. Extret de Keren et al., 2010.

1.3 *SPLICING* ALTERNATIU

La divisió dels gens en exons, deguda a l'existència del mecanisme de *splicing*, ha resultat ser una font de diversitat proteòmica, ja que d'un mateix pre-mRNA es poden generar múltiples RNAs madurs gràcies al *splicing* alternatiu. Existeixen diferents tipus de *splicing* alternatiu, els quals poden ser classificats en 4 grups principals (Keren et al., 2010):

- *Exon skipping*: un exó és eliminat del pre-mRNA juntament amb els seus introns flanquejants (Fig. 17a). Aquest representa al voltant del 40% dels *splicings* alternatius en els eucariotes superiors.
- Selecció d'un lloc de *splicing* 3' o 5' alternatiu: dos o més llocs de *splicing* són reconeguts com l'extrem d'un exó (Fig. 17b i c). En el cas del 3' representa un 18.4% i del 5' un 7.9% dels *splicings* alternatius.

- Retenció d'un intró: un intró és manté formant part del mRNA madur (Fig. 17d). És el tipus menys freqüent a invertebrats i vertebrats, ja que només representa el 5%.
- Variants complexes: exons mútuament excloents (Fig. 17e), ús d'un promotor alternatiu (Fig. 17f) i ús d'un lloc de poliadenilació alternatiu (Fig. 17g).

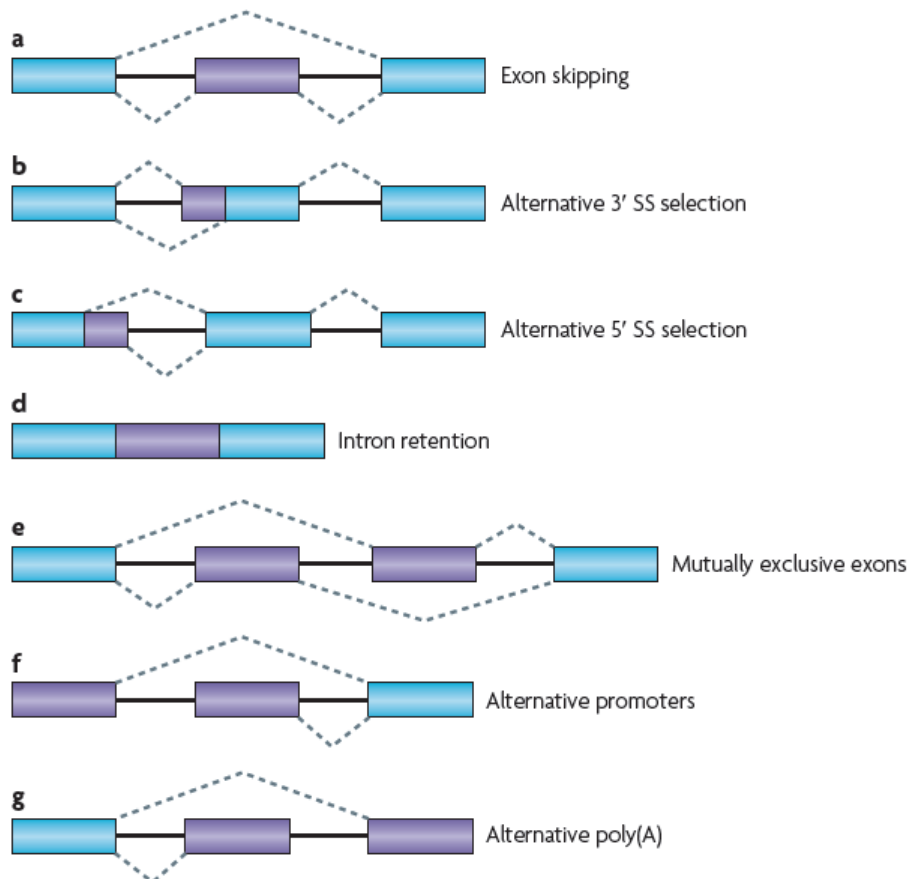


Figura 17. Diferents tipus de *splicing* alternatiu. Extret de Keren et al., 2010.

Els exons constitutius estan representats en blau i les regions alternatives en lila. Els introns estan representats amb línies contínues, en canvi les línies puntejades indiquen les opcions de *splicing*.

Els diferents *splicings* alternatius poden succeir alhora o ser incompatibles en un mateix tipus cel·lular, en un mateix temps de desenvolupament o en certes condicions fisiològiques, fet que dificulta encara més la definició de què és un exó, ja que en unes ocasions una seqüència ho serà i en altres no (Lopez, 1998).

1.4 *SPLICING* I MALALTIA

Alteracions en el mecanisme de *splicing* poden ser causa directa de malaltia, poden modificar la severitat del fenotip o bé estar relacionades amb la susceptibilitat a patir una malaltia. Els

mecanismes que modifiquen al *splicing* impliquen alteracions dels elements en *cis* dins del gen afectat o bé dels factors en *trans* que són requerits per a la regulació del *splicing*. Els efectes en *cis* tenen un impacte directe en l'expressió d'un únic gen, mentre que els efectes en *trans* tenen el potencial d'afectar l'expressió de múltiples gens (Wang & Cooper, 2007). Els primers afecten al codi de *splicing*, en canvi els segons afecten a la maquinària de *splicing* (per exemple, mutacions en gens implicats en l'ensamblatge i funcionament de les snRNPs) (Briese et al., 2005) o activen el mecanisme de guany de funció del RNA (per exemple, expansió de repeticions de microsatèl·lits) (Ranum & Cooper, 2006).

Quin percentatge de canvis causants de malaltia correspon a mutacions de *splicing*? Antigament s'estimava que representaven al voltant del 15%, però només reflexava les mutacions que afectaven als llocs donadors i acceptors de *splicing* (Krawczak et al., 1992). Avui en dia sabem que existeixen altres mutacions que afecten al *splicing* degut a l'alteració d'altres components del codi de *splicing*, a la creació de llocs críptics de *splicing* o a l'alteració de l'estructura secundària (Pagani & Baralle, 2004). Gràcies a aquest coneixement, durant els últims anys s'ha suggerit que el 60% de les mutacions que són causa de malaltia podrien alterar el mecanisme de *splicing* (López-Bigas et al., 2005).

2 NONSENSE-MEDIATED mRNA DECAY

El mecanisme de *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) és un mecanisme post-transcripcional que proveeix a les cèl·lules eucariotes de mitjans per degradar els mRNAs erronis que acaben la seva traducció prematurament (Isken & Maquat, 2007). Aquest tipus de transcrits poden sorgir a causa de mutacions de canvi de pauta de lectura o sense sentit, moltes de les quals causen malalties al no sintetitzar-se proteïnes funcionals. Les dianes del NMD també poden crear-se com a resultat d'un error dels processos cel·lulars, com el cas de pre-mRNAs en què el *splicing* s'ha donat de manera ineficient o transcrits provinents de gens propensos a patir errors en els reordenaments del DNA. Els perills potencials que suposa la no degradació dels mRNAs que codifiquen per proteïnes truncades, són exemplificats per les nombroses malalties hereditàries recessives que adquireixen un fenotip dominant negatiu quan el NMD falla al seleccionar com a candidats, transcrits que acaben prematurament la seva traducció (Holbrook et al., 2004). Per tant, el NMD proporciona a les cèl·lules un important mitjà per assegurar la qualitat del mRNA i amb això, la qualitat de l'expressió gènica.

Actualment es coneix que el NMD i les proteïnes que juguen un paper clau en aquesta via, tenen altres funcions importants a més del control de qualitat del mRNA. Aquestes funcions inclouen la regulació de l'expressió de certes classes de gens, un paper en vies especialitzades de degradació del mRNA, funcions en la síntesi de DNA i en el cicle cel·lular, i contribució en el manteniment dels telòmers (Isken & Maquat, 2007).

2.1 CONDICIONS NECESSÀRIES PER A QUÈ ACTUÏ EL NMD

El NMD normalment té lloc quan la traducció acaba prematurament en un dels tres codons d'aturada, que és el que rep el nom de *premature termination codon* (PTC). Les condicions necessàries a nivell de RNA i factors proteics per a què un PTC desencadeni el NMD varien segons l'organisme.

En els mamífers, la posició d'un PTC determina si aquest provoca o no l'activació del NMD, per aquest motiu es va establir la norma segons la qual, els PTCs que estan seguits per una unió exó-exó que està localitzada a més de 50-55 nucleòtids *downstream* generalment desencadenen el NMD (Fig. 18). D'acord amb aquesta norma, els codons de terminació normal, els quals no desencadenen el NMD, normalment resideixen a l'últim exó (aquests no estan seguits per cap unió exó-exó), i aquells que no es troben a l'últim exó acostumen a estar seguits per una o dos unions exó-exó que no estan localitzades a més de 50-55 nucleòtids *downstream* (Nagy & Maquat, 1998). Segons això, els mRNAs que deriven de gens sense introns i que per tant no tenen unions exó-exó, són immunes al NMD

(Maquat & Li, 2001). Però com a totes les normes, existeixen excepcions, ja que hi ha transcrits que són susceptibles al NMD encara que la distància entre un PTC localitzat al penúltim exó i la unió exó-exó situada *downstream* és menor de 50-55 nucleòtids (Carter et al., 1996).

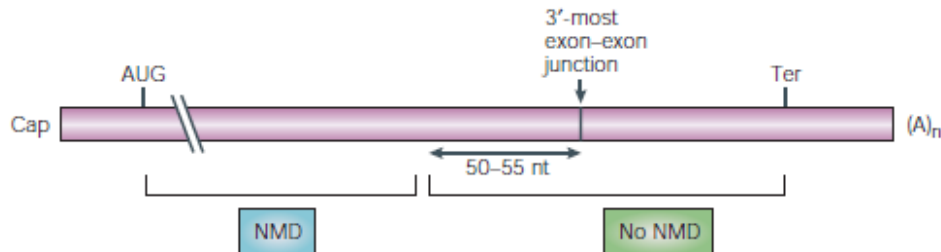


Figura 18. Condició necessària pel mecanisme de NMD. Extret de Maquat, 2004.

A més, el NMD requereix de la col·locació d'un complex proteic anomenat *exon junction complex* (EJC) a més de 25-30 nucleòtids *downstream* del codó de terminació, el qual és dipositat en posició *upstream* de les unions exó-exó generades com a conseqüència del *splicing* del pre-mRNA (l'eliminació dels introns). Durant la traducció d'un transcrit que no conté cap PTC, tots els EJCs són eliminats del mRNA pel ribosoma traductor, això valida aquest mRNA com lliure d'errors i es manté estable. En canvi, si el ribosoma troba un PTC a 5' d'un EJC, es considera que el transcrit presenta errors i té lloc el NMD.

2.2 EL MECANISME DE NMD ALS MAMÍFERS

Tal com es representa a la Fig. 19, una vegada el mRNA ha estat generat a partir del *splicing* del pre-mRNA i exportat des del nucli fins al citosol, els nous mRNAs sintetitzats que contenen un PTC són dianes pel mecanisme de NMD.

Del *splicing* del pre-mRNA en resulta la unió al cap 5' de l'heterodímer CPB80-CPB20, la col·locació d'un EJC a la posició *upstream* de cadascuna de les unions exó-exó del mRNA i la unió també de la proteïna PABP2 a la cua polyA 3'. Els components del nucli de l'EJC són eIF4AIII, RNA-binding-motif protein Y14, mago nashi homologue (MAGOH) i Barentsz (BTZ). L'UPF3 o UPF3X NMD factor, es pensa que és reclutat pels EJCs al nucli i és exportat amb el mRNA al citosol. Llavors, l'UPF3 o UPF3X recluta l'UPF2, el qual és fonamentalment citosòlic. En l'aturada de la traducció en un PTC està implicat el complex SURF, el qual està format per la quinasa SMG1 juntament amb UPF1, eRF1 i eRF3. Generalment, si la traducció acaba a més de 50-55 nucleòtids *upstream* d'una unió exó-exó (això és, a més de 25-30 nucleòtids *upstream* d'un EJC), llavors el NMD tindrà lloc. La unió d'UPF1 a l'EJC

desencadena la fosforilació de la mateixa UPF1 i el NMD, promovent la repressió de la traducció i el reclutament dels elements responsables de la degradació del mRNA (Isken & Maquat, 2008).

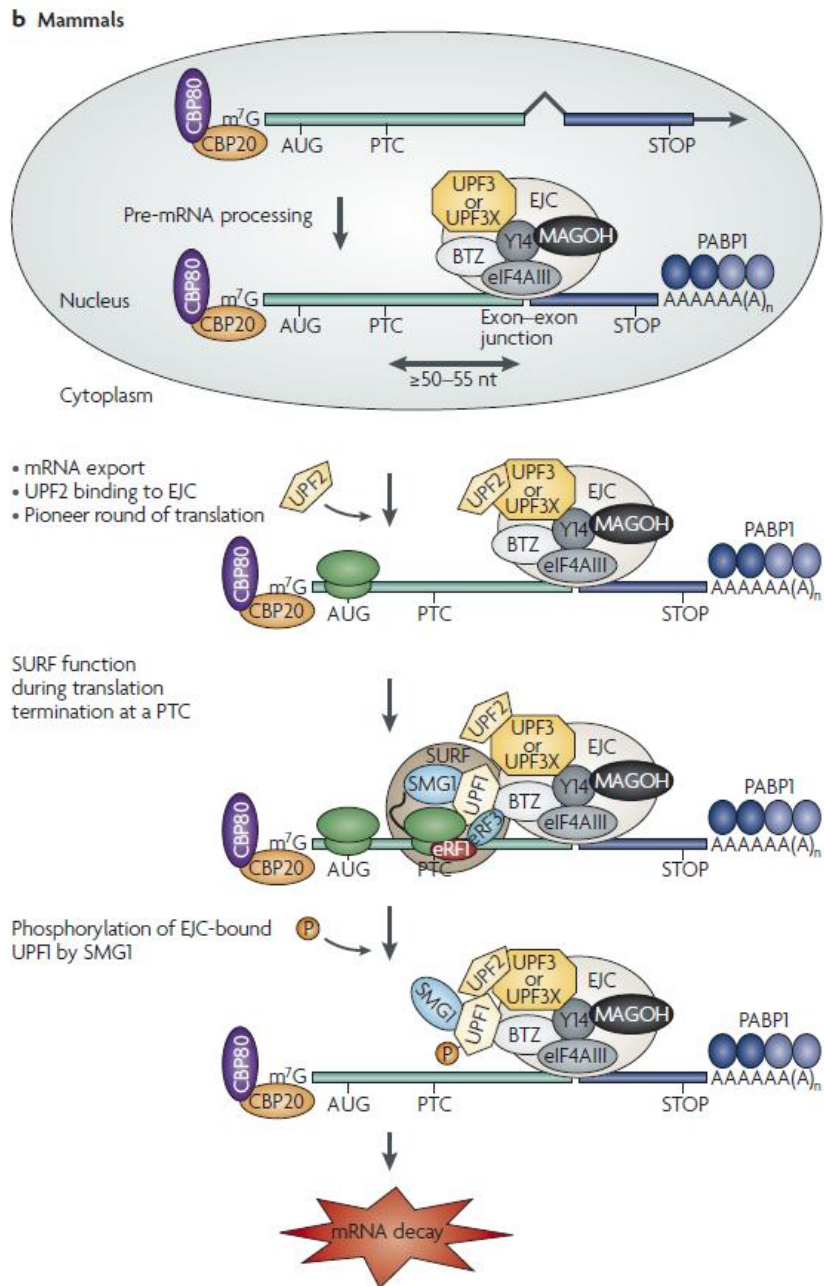


Figura 19. Model del mecanisme de NMD als mamífers. Extret de Isken & Maquat, 2008.

La degradació del mRNA és possible tant des de l'extrem 5' com del 3', depenent del tipus de transcrit, i en alguns casos sembla fins i tot iniciar-se abans de completar l'exportació nuclear del mRNA (Holbrook et al., 2004). El NMD s'inicia des de l'extrem 5' del mRNA, on s'inclou el *decapping* seguit per la degradació mitjançada per exonucleases en sentit 5'-3', i des de l'extrem 3' del mRNA, on s'inclou la *deanylation* seguida de la degradació mitjançada per exonucleases en sentit 3'-5' (Lejeune et al., 2003). Actualment no és possible determinar les eficiències relatives de la degradació en sentit

5'-3' i 3'-5' durant el NMD, així que no està clar quina de les dues vies és més representativa d'aquest procés.

El mRNA que contingui una mutació que genera un PTC i que s'escapi d'aquest mecanisme de degradació, pot donar lloc a la síntesi d'un polipèptid truncat. Normalment, una proteïna d'aquestes característiques és detectada pels mecanismes de control de qualitat del RE (veure apartat III.3.2 de la introducció), encara que les proteïnes truncades que siguin estables poden escapar d'aquesta degradació.

3 DEGRADACIÓ PROTEICA PROTEASÒMICA

Les vies de l'autofàgia-lisosoma i la ubiquitina-proteasoma són les dues rutes principals de degradació de proteïnes i orgànuls a les cèl·lules eucariotes (Rubinsztein, 2006). El sistema ubiquitina-proteasoma regula diversos processos cel·lulars, com la transducció de senyals, el control del cicle cel·lular, la regulació transcripcional, la inflamació i l'apoptosi, mitjançant la degradació de proteïnes i el manteniment de l'homeòstasi proteica (Goldberg, 2007).

3.1 EL PROTEASOMA

Els proteasomes són complexos multiproteics amb forma de barril que estan compostos per diferents parts: la 26S que reconeix les proteïnes poliubiquitinitzades, la 19S que regula el pas de la proteïnes desubiquitinitzades cap al nucli del proteasoma, i la 20S que està formada per diferents subunitats β catalítiques, de les quals 3 ($\beta 1$ *caspase-like*, $\beta 2$ *trypsin-like* i $\beta 5$ *chymotrypsin-like*) són llocs proteolítics que funcionen conjuntament en la degradació proteica (Fig. 20) (Moore et al., 2008).

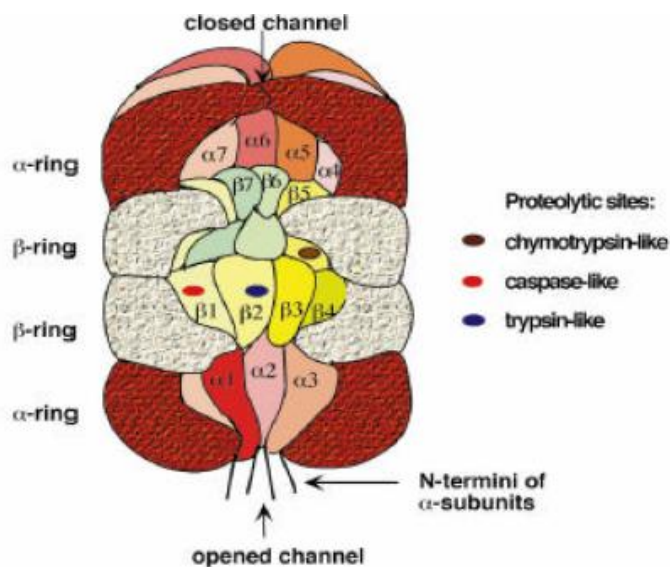


Figura 20. Estructura del nucli 20S del proteasoma.

3.2 MECANISMES DE CONTROL DE QUALITAT DEL RETICLE ENDOPLASMÀTIC

En presència de proteïnes mal plegades, la cèl·lula desencadena al RE el mecanisme que rep el nom de *unfolded protein response* (UPR). Aquesta resposta està dirigida inicialment a incrementar la transcripció de gens que codifiquen xaperones del RE, per intentar recuperar el plegament correcte de les proteïnes mal plegades. Només en el cas que després de diversos intents, la proteïna no recuperi el seu plegament, s'activa la transcripció de gens que codifiquen proteïnes involucrades en la

translocació i la degradació de les proteïnes al citosol, i la forma mal plegada és enviada a degradar (Alberts et al., 2007).

La degradació associada al reticle endoplasmàtic (ERAD) té lloc quan la proteïna mal plegada ha estat durant un temps a la llum del RE, és reconeguda com immadura i es porta a terme la seva translocació al citosol amb la finalitat de ser degradada pel proteasoma mitjançant la via de les ubiquitines (Fig. 21). Que es generin proteïnes mal plegades és un fet comú a la cèl·lula, per aquest motiu l'ERAD té un paper clau com a control de qualitat (Sitia & Braakman, 2003).

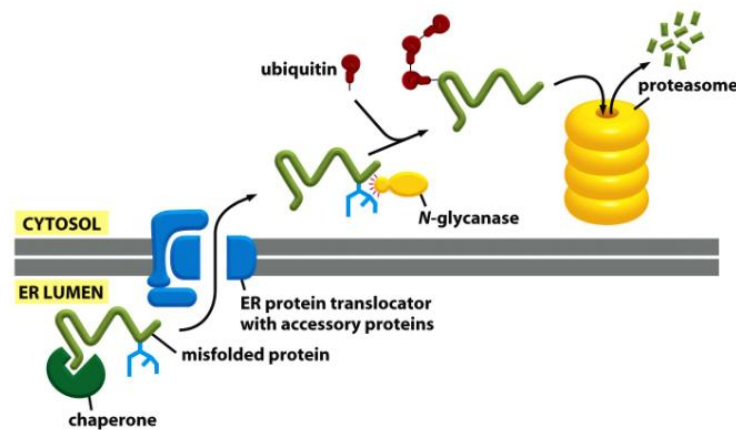


Figura 21. Exportació i degradació de les proteïnes mal plegades. Extret d'Alberts et al., 2007.

Moltes proteïnes són degradades pel proteasoma després d'haver estat modificades covalentment amb ubiquitina, la qual és conjugada a través del seu extrem carboxi. En aquesta conjugació hi estan implicats tres tipus d'enzims: E1 (enzim activador d'ubiquitina) que hidrolitza ATP i forma un conjugat entre ell mateix i la ubiquitina; E2 (enzim conjugador d'ubiquitina) que rep la ubiquitina d'E1 i forma un conjugat similar amb la ubiquitina; E3 (liligasa d'ubiquitina) que s'uneix tant a E2 com al substrat (la proteïna que ha de ser degradada) i transfereix la ubiquitina al substrat. Freqüentment, la ubiquitina per si mateixa a través de diferents rondes d'ubiquitinització dona lloc a la formació d'una cadena de poliubiquitina. Una vegada al proteasoma, les proteïnes són reduïdes a pèptids, els quals són alliberats al citosol i on són trencats per les peptidases (Ciechanover, 2006).

MÈTODES

Els mètodes emprats en les publicacions incloses en aquesta tesi estan resumits a la taula que es troba a continuació (Taula 3). S'indica en quins dels articles presentats ha estat utilitzat cadascun dels mètodes.

Taula 3. Mètodes utilitzats al llarg d'aquesta tesi.

MÈTODE	PUBLICACIÓ
Aïllament de lipoproteïnes	Article 2 i 4
Citoquímica amb filipina	Article 2
Cromatografia de gasos	Article 4
Extracció de DNA	Articles 1 i 2
Extracció de RNA	Articles 2 i 3
Microscopia de fluorescència	Article 2
PCR	Articles 1, 2 i 3
PCR a temps real	Articles 2, 3 i 4
Retrotranscripció	Articles 2, 3 i 4
Seqüenciació de DNA	Articles 1 i 2
Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)	Article 1
Tècniques de cultiu cel·lular	Articles 2, 3 i 4
Western blot	Articles 3 i 4

OBJECTIUS

Aquesta tesi ha tingut com a objectiu principal l'anàlisi de les bases moleculars de dues malalties de transport lisosòmic: la cistinosi i la malaltia de Niemann-Pick tipus C.

Els objectius concrets van ser:

- Realitzar l'estudi mutacional del gen *CTNS* en mostres de pacients amb cistinosi d'origen espanyol i marroquí.
- Realitzar l'estudi mutacional dels gens *NPC1* i *NPC2* en mostres de pacients amb Niemann-Pick tipus C principalment d'origen espanyol.
- Establir correlacions genotip-fenotip en ambdues malalties.
- Caracteritzar l'efecte específic d'aquelles mutacions del gen *NPC1* que alteren el mecanisme de *splicing*.
- Analitzar l'efecte a nivell de mRNA del mecanisme de NMD en presència de mutacions del gen *NPC1* que originen PTCs.
- Establir una possible relació causal entre les mutacions de canvi de sentit identificades i els nivells d'expressió de la proteïna NPC1, mitjançant l'anàlisi de la seva estabilitat i de la via implicada en la seva degradació.
- Valorar l'ús d'inhibidors de la degradació proteasòmica com a aproximació terapèutica pels pacients NPC que presentin determinades mutacions de canvi de sentit.

RESULTATS

INFORME SOBRE LA CONTRIBUCIÓ DE LA DOCTORANDA A LES PUBLICACIONS D'AQUESTA TESI DOCTORAL

Títol de la tesi: ASPECTES MOLECULARS DE DUES MALALTIES DE TRANSPORT LISOSÒMIC: LA CISTINOSI I LA MALALTIA DE NIEMANN-PICK TIPUS C

Autora: Judit Macías Vidal

Directors: Maria Josep Coll Rosell i Oriol Bachs Valldeneu

ARTICLE 1

Títol: Analysis of the *CTNS* gene in 32 cystinosis patients from Spain

Autors: Macías-Vidal J, Rodés M, Hernández-Pérez JM, Vilaseca MA, Coll MJ

Publicació: Clin Genet. 2009; 76(5):486-9

Índex d'impacte (2010 JCR Science Edition): 2.942

Aportació de la doctoranda: La feina experimental presentada va ser realitzada per la doctoranda a partir d'un grup de pacients diagnosticats bioquímicament de cistinosi a l'Institut de Bioquímica Clínica i a l'Hospital Sant Joan de Déu prèviament. La doctoranda va elaborar el primer esborrany de l'article i va participar a la redacció del manuscrit final. Les dades clíniques presentades van ser facilitades pels metges que s'indiquen als agraïments.

ARTICLE 2

Títol: Molecular analysis of 30 Niemann-Pick type C patients from Spain

Autors: Macías-Vidal J, Rodríguez-Pascau L, Sánchez-Ollé G, Lluch M, Vilageliu L, Grinberg D, Coll MJ; Spanish NPC Working Group

Publicació: Clin Genet. 2011; 80(1):39-49

Índex d'impacte (2010 JCR Science Edition): 2.942

Aportació de la doctoranda: La major part de la feina presentada va ser realitzada per la doctoranda a partir dels pacients diagnosticats bioquímicament de NPC a l'Institut de Bioquímica Clínica. Exceptuant la determinació de 5 dels al·lels mutats identificats, conjuntament amb l'estudi de 7 dels polimorfismes analitzats en el pacient NPC57 i l'anàlisi dels diferents transcrits observats en els

pacients NPC02 i NPC29, que van ser duts a terme pel grup del Dr. Grinberg i la Dra. Vilageliu del Departament de Genètica de la Facultat de Biologia. La doctoranda va elaborar el primer esborrany de l'article i va participar a la redacció del manuscrit final. Les dades clíniques presentades van ser facilitades pels metges que formen part del *Spanish NPC Working Group*.

ARTICLE 3

Títol: Nonsense-mediated mRNA decay process in nine alleles of Niemann-Pick type C patients from Spain

Autors: Macías-Vidal J, Gort L, Lluch M, Pineda M, Coll MJ

Publicació: Mol Genet Metab. 2009; 97(1):60-4

Índex d'impacte (2010 JCR Science Edition): 3.539

Aportació de la doctoranda: La totalitat de la feina experimental presentada va ser realitzada per la doctoranda a partir de mostres de pacients NPC diagnosticats prèviament a l'Institut de Bioquímica Clínica. La doctoranda va elaborar el primer esborrany de l'article i va participar a la redacció del manuscrit final.

ARTICLE 4

Títol: Proteasomal degradation role in missense mutations causing Niemann-Pick type C disease

Autors: Macías-Vidal J, Girós M, Bachs O, Coll MJ

Publicació: Article en preparació

Aportació de la doctoranda: La totalitat de la feina experimental presentada en aquest treball va ser realitzada per la doctoranda. Tanmateix la doctoranda va elaborar el primer esborrany de l'article i va participar a la redacció final del manuscrit.

En darrer lloc esmentar que de forma paral·lela al desenvolupament dels aspectes centrals d'aquesta tesi, la doctoranda ha participat en quatre treballs de col·laboració relacionats, que han donat lloc a articles que es presenten en forma d'annex.

ARTICLE 5

Títol: Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: genotype-phenotype correlations

Autors: Fernández-Valero EM, Ballart A, Iturriaga C, Lluch M, Macías J, Vanier MT, Pineda M, Coll MJ

Publicació: Clin Genet. 2005; 68(3):245-254

Índex d'impacte (2010 JCR Science Edition): 2.942

Aportació de la doctoranda: En el moment de la preparació d'aquest treball, la doctoranda estava com a estudiant en pràctiques a l'Institut de Bioquímica Clínica i va realitzar l'anàlisi mutacional de 3 dels pacients diagnosticats bioquímicament de NPC. A més, 9 dels pacients recollits en aquesta publicació van quedar amb algun al·lel pendent de tipificar, motiu pel qual van ser recuperats per realitzar l'estudi del cDNA que es descriu a l'article 2.

ARTICLE 6

Títol: Clinical experience with miglustat therapy in pediatric patients with Niemann-Pick disease type C: a case series

Autors: Pineda M, Perez-Poyato MS, O'Callaghan M, Vilaseca MA, Pocovi M, Domingo R, Ruiz del Portal L, Verdú-Pérez A, Temudo T, Gaspar A, Garcia-Peñas JJ, Roldán S, Martín-Fumero L, Blanco de la Barca O, García-Silva MT, Macías-Vidal J, Coll MJ

Publicació: Mol Genet Metab. 2010; 99(4):358-66

Índex d'impacte (2010 JCR Science Edition): 3.539

Aportació de la doctoranda: La doctoranda va realitzar l'anàlisi mutacional dels pacients, així com l'estudi molecular de la pseudodeficiència del gen de la quitotriosidasa dels pacients en tractament. La doctoranda també va participar en la redacció final del manuscrit.

ARTICLE 7

Títol: Niemann-Pick type C disease: From neonatal cholestasis to neurological degeneration. Different phenotypes

Autors: Quijada-Fraile P, Martín-Hernández E, Martínez de Aragón A, Macías-Vidal J, Coll MJ, Nogales-Espert A, García-Silva MT

Publicació: An Pediatr (Barc). 2010; 73(5):257-63

Índex d'impacte (2010 JCR Science Edition): 0.570

Aportació de la doctoranda: En aquest article, la doctoranda va portar a terme l'anàlisi mutacional dels pacients que s'hi presenten.

ARTICLE 8

Títol: Characterisation of two deletions involving *NPC1* and flanking genes in Niemann-Pick type C disease patients

Autors: Rodríguez-Pascau L, Toma C, Macías-Vidal J, Cozar M, Lykopoulou L, Coll MJ, Grinberg D, Vilageliu L

Publicació: Article sotmès a Molecular Genetics and Metabolism

Índex d'impacte (2010 JCR Science Edition): 3.539

Aportació de la doctoranda: En aquest treball, la doctoranda va realitzar la cerca de mutacions del pacient NPC57 i el respectiu estudi de portadors als seus pares.

Conformitat dels directors de tesi:

Dra. Maria Josep Coll Rosell

Dr. Oriol Bachs Valldeneu

PRESENTACIÓ DELS RESULTATS

La feina realitzada al llarg d'aquesta tesi s'ha centrat en l'anàlisi molecular de pacients amb una malaltia de transport lisosòmic, la cistinosi i la malaltia de NPC, ja que en ambdues patologies les proteïnes afectades són proteïnes transmembrana del lisosoma. El treball d'identificació de les mutacions causants de cistinosi (article 1) és el primer estudi mutacional d'aquesta malaltia realitzat a la població espanyola. Pel que fa als treballs realitzats amb NPC han permès establir el genotip d'un gran nombre de pacients (article 2) i demostrar la implicació de diferents mecanismes cel·lulars en aquesta patologia segons el tipus de mutacions causants: el *splicing* (article 2), el NMD (article 3) i la degradació proteica portada a terme pel proteasoma (article 4). A més, en el cas d'algunes mutacions de canvi de sentit s'ha pogut assajar una aproximació terapèutica basada en l'ús d'inhibidors de la degradació proteasòmica (article 4).

Les publicacions d'aquest compendi s'han estructurat en dos capítols, tal i com es mostra a continuació.

CAPÍTOL I. LA CISTINOSI

Article 1: Estudi mutacional de pacients espanyols i marroquins amb cistinosi

CAPÍTOL II. LA MALALTIA DE NIEMANN-PICK TIPUS C

Article 2: Estudi mutacional de pacients amb Niemann-Pick tipus C: rellevància de les mutacions de *splicing*

Article 3: Anàlisi del mecanisme de *nonsense-mediated mRNA decay* a la malaltia de Niemann-Pick tipus C

Article 4: Anàlisi del mecanisme de degradació proteasòmica a la malaltia de Niemann-Pick tipus C

CAPÍTOL I. LA CISTINOSI

Article 1: Estudi mutacional de pacients espanyols i marroquins afectes de cistinosi

Referència: Macías-Vidal J, Rodés M, Hernández-Pérez JM, Vilaseca MA, Coll MJ. Analysis of the *CTNS* gene in 32 cystinosis patients from Spain. Clin Genet. 2009; 76(5):486-9.

RESUM

Aquesta publicació recull els resultats del primer estudi mutacional del gen *CTNS* realitzat a pacients no relacionats amb cistinosi de la població espanyola, 27 dels quals d'origen espanyol i 5 originaris de Marroc.

Es van caracteritzar 60 al·lels mutats i es van identificar 14 mutacions diferents, de les quals 6 no havien estat descrites prèviament. Aquestes inclouen 3 mutacions de canvi de sentit (p.M1T, p.S270F i p.G309V), 2 mutacions que alteraven la pauta de lectura (p.V99IfsX14 i p.N107RfsX10) i una mutació que afectava al mecanisme de *splicing* (c.682-1G>T).

Entre les mutacions trobades, es va identificar la 57kdel, la mutació més freqüent a nivell mundial, que també va resultar ser-ho a Espanya (34% dels al·lels). Aquesta deleció junt amb unes altres 5 mutacions (p.M1T, p.T7FfsX7, c.61+5G>A, p.T216NfsX12 i p.G308R) representaven un 73% dels al·lels.

De cara a propòsits diagnòstics el coneixement de l'espectre mutacional d'una població facilita la realització del diagnòstic molecular i el consell genètic en les famílies afectes. A la cistinosi en concret, el coneixement de les mutacions presents permet a aquestes famílies poder accedir al diagnòstic prenatal, ja que només és factible mitjançant aquesta eina diagnòstica.

Letter to the Editor

Analysis of the *CTNS* gene in 32 cystinosis patients from Spain

To the Editor:

Cystinosis is an autosomal recessive disorder characterized by intralysosomal accumulation of cystine due to an impaired transport of free cystine out of lysosomes (1).

Three phenotypical forms have been described according to the age of onset and the severity of the clinical symptoms: infantile (OMIM #219800), juvenile (OMIM #219900), and ocular non-nephropathic cystinosis (OMIM #219750).

The cystinosis gene, *CTNS*, is composed of 12 exons and encodes for a 367-amino acid lysosomal membrane protein called cystinosin (2). Up to now, around 85 different mutations have been described.

In this study, we present 32 unrelated cystinosis patients, 27 Spanish and 5 Moroccan (CY1, CY34, CY47, CY48 and CY55). Clinical data were provided by the patient's physician and reported in Table 1. Most of our patients present the infantile nephropathic clinical form, like the rest of studied populations.

Genomic DNA was extracted from whole blood using standard methods. All DNA samples were initially screened for the common 57-kb deletion by multiplex polymerase chain reaction (PCR) system as previously described (4). The remaining alleles were analyzed using self-designed specific intronic primers (available upon request) based on the published sequence (RefSeq NT_010718.15). *CTNS* coding exons (exons 3–12) and their intron boundaries, as well as the promoter region, were screened for mutations as described by our group (5).

Table 2 shows the *CTNS* gene mutations of the 32 unrelated patients. In four patients (CY24, CY39, CY47 and CY54), after sequencing, only one mutation was found. In this study, 14 different mutations were identified, 8 of which were previously described and 6 of them are novel. The 57-kb deletion is the most prevalent mutation in Spain (34% of the mutant alleles), but its frequency is less than in other studied populations (The Netherlands 59% (10), Switzerland–Germany 65% (11)). However, this frequency is higher than in Italian population

(12%) (12). Moreover, this deletion together with other five mutations: p.M1T, p.T7FfsX7, c.61 + 5G > A, p.T216NfsX12 and p.G308R, accounted for 73% of the studied alleles.

Regarding novel mutations, the missense changes (p.M1T, p.S270F, and p.G309V) are probably pathogenic mutations because they were not observed in 100 normal control alleles; after sequencing all genomic DNA, no other mutations have been detected, and the affected amino acid residues are conserved throughout species. The p.M1T mutation abolishes the methionine start codon of cystinosin and this could cause the use of the next ATG codon to initiate translation (translational reinitiation process) (13) of a frameshift protein. There are two previously reported mutations in this codon, p.M1L and p.M1I (14). The last one, p.M1I mutation, was examined by expression assays and the results suggested that the protein is not translated (15). Respect to p.S270F and p.G309V mutations, they are located in a putative transmembrane domain (TM5 and TM6, respectively) and are likely to cause severe structural disruption to the protein. Moreover, functional effect prediction programs as PolyPhen (16) or Panther (17) confirmed the possible pathogenesis of these novel changes.

The novel frameshifting mutations, p.V99IfsX14 and p.N107RfsX10, are undoubtedly disease-causing mutations, as they give rise to a premature termination codon (PTC), and they follow the rules suggested for the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) process (18).

Finally, the analysis of the novel splicing mutation, c.682-1G>T, through splice site prediction software (19, 20) indicates that it originates a disrupted acceptor splice site, which would result in an abnormal splicing.

Concerning genotype–phenotype correlations, as it was previously described in patients presenting the infantile phenotype (9), all infantile patients of our series have on both alleles truncating mutations or mutations affecting conserved amino acids associated with transmembrane regions of the protein.

Table 1. Summary of clinical manifestations of the studied patients

Patient	Age (years)	Clinical phenotype	Fanconi syndrome	Polyuria	Glycosuria	Metabolic acidosis	Vomiting	Hypophosphatemic rickets	Growth retardation	Bone age delayed	Skeletal abnormalities	Corneal cystine crystals
CY1	12	Infantile							X		X	X
CY2	4	Infantile	X	X		X		X	X		X	
CY3	3	Infantile	X	X		X	X		X		X	
CY4	23	Infantile	X									
CY7	15	Infantile	X									X
CY10	7	Infantile		X		X	X	X	X		X	
CY14	17	Infantile							X			
CY18	19	Infantile	X		X			X	X			
CY19 ^a	20	Infantile	X					X	X			
CY20 ^a	20	Infantile		X	X			X	X			
CY32 ^b	7	Infantile										
CY21	4	Infantile	X		X							
CY22	34	Infantile	X			X						
CY23 ^b	39	Infantile	X									
CY27 ^b	44	Infantile	X									
CY24	11	Infantile	X									
CY26	22	Infantile	X			X	X		X	X	X	X
CY28	6	Infantile	X	X		X			X	X	X	X
CY29	21	Infantile	X						X	X	X	X
CY30	6	Infantile	X			X		X	X		X	X
CY33	12	Infantile	X	X		X		X	X		X	X
CY34	5	Infantile	X									
CY35	16	Juvenile	X									X
CY37	12	Infantile	X					X	X		X	X
CY39	3	Infantile	X	X	X	X		X	X		X	X
CY46	14	Infantile	X	X					X	X	X	X
CY47	6	Infantile	X	X					X	X	X	X
CY48	5	Infantile	X	X		X	X	X	X		X	X
CY54	19	Infantile	X							X	X	X
CY55	4	Infantile		X	X							
CY63 ^b	1 month	Infantile										
CY57	27	Infantile	X						X			
CY58	15	Infantile	X	X		X			X		X	X
CY61	10	Infantile	X	X		X			X		X	X
CY62	4	Infantile	X									
CY66	49	Juvenile	X									X

^aPatient previously reported (3).^bSibling with cystinosis.

Letter to the Editor

Table 2. Mutation analysis in cystinosis patients from Spain^a

Patient	Nucleotide change	Amino acid change	Type of mutation	Location on cystinosis protein	Consequence of mutation	Ref.
CY1; CY3	c.922 G>A	p.G308R	Missense	TM6	Amino acid change	(7)
	c.922G>A	p.G308R	Missense	TM6	Amino acid change	(7)
CY2	57-kb deletion	-	Deletion exons 1-10	-	No transcription	(2)
	c.295_310del	p.V99IfsX14	Out-of-frame deletion	Lumen A	Frameshift at 99 and truncated 112 residue protein	N
CY4	c.2T>C	p.M1T	Missense	Lumen A	Amino acid change and removal M start codon	N
	c.518_519delAC	p.Y173X	Out-of-frame deletion	TM2	Frameshift and truncated 173 residue protein	(2)
CY7	57-kb deletion	-	Deletion exons 1-10	-	No transcription	(2)
	c.18_21delGACT	p.T77FfsX7	Out-of-frame deletion	Lumen A	Frameshift at 7 and truncated 13 residue protein	(2)
CY10	c.646dupA	p.T216NfsX12	Out-of-frame insertion	TM3	Frameshift at 216 and truncated 227 residue protein	(7)
	c.646dupA	p.T216NfsX12	Out-of-frame insertion	TM3	Frameshift at 216 and truncated 227 residue protein	(7)
CY14; CY21;	57-kb deletion	-	Deletion exons 1-10	-	No transcription	(2)
CY26; CY30;	57-kb deletion	-	Deletion exons 1-10	-	No transcription	(2)
CY46; CY48;	57-kb deletion	-	Deletion exons 1-10	-	No transcription	(2)
CY58						
CY18; CY28;	57-kb deletion	-	Deletion exons 1-10	-	No transcription	(2)
CY33	c.646dupA	p.T216NfsX12	Out-of-frame insertion	TM3	Frameshift at 216 and truncated 227 residue protein	(7)
CY19	57-kb deletion	-	Deletion exons 1-10	-	No transcription	(2)
	c.320_323delATCA	p.N107RfsX10	Out-of-frame deletion	Lumen A	Frameshift at 107 and truncated 116 residue protein	N
CY20	c.2T>C	p.M1T	Missense	Lumen A	Amino acid change and removal M start codon	N
(CY32)	c.2T>C	p.M1T	Missense	Lumen A	Amino acid change and removal M start codon	N
CY22	c.2T>C	p.M1T	Missense	Lumen A	Amino acid change and removal M start codon	N
(CY23,CY27)	c.682-1G>T	-	3' splice site IVS9	Lumen A	Amino acid change and removal M start codon	N
CY24	c.926G>T	p.G309V	Missense	Cytoplasm B	?	N
	Not found	?	?	TM6	Amino acid change	N
CY29; CY57	c.18_21delGACT	p.T77FfsX7	Out-of-frame deletion	Lumen A	Frameshift at 7 and truncated 13 residue protein	(2)
	c.18_21delGACT	p.T77FfsX7	Out-of-frame deletion	Lumen A	Frameshift at 7 and truncated 13 residue protein	(2)
CY34; CY55	c.61+5G>A	-	5' splice site IVS3	Lumen A	Exon 3 skipping	(8)
	c.61+5G>A	-	5' splice site IVS3	Lumen A	Exon 3 skipping	(8)
CY35	c.18_21delGACT	p.T77FfsX7	Out-of-frame deletion	Lumen A	Frameshift at 7 and truncated 13 residue protein	(2)
	c.416C>T	p.S139F	Missense	TM1	Amino acid change	(9)
CY37	c.18_21delGACT	p.T77FfsX7	Out-of-frame deletion	Lumen A	Frameshift at 7 and truncated 13 residue protein	(2)
	c.518_519delAC	p.Y173X	Out-of-frame deletion	TM2	Frameshift and truncated 173 residue protein	(2)
CY39; CY54	c.1354G>A	p.G339R	Missense	TM7	Amino acid change	(7)
(CY63)	Not found	?	?	?	?	
CY47	c.922G>A	p.G308R	Missense	TM6	Amino acid change	(7)
	Not found	?	?	?	?	
CY61	c.682-1G>T	-	3' splice site IVS9	Cytoplasm B	?	N
	c.682-1G>T	-	3' splice site IVS9	Cytoplasm B	?	N
CY62	57-kb deletion	-	Deletion exons 1-10	-	No transcription	(2)
	c.809C>T	p.S270F	Missense	TM5	Amino acid change	N
CY66	57-kb deletion	-	Deletion exons 1-10	-	No transcription	(2)
	c.416C>T	p.S139F	Missense	TM1	Amino acid change	(9)

^a Nomenclature according to den Dunnen and Antonarakis (6); The A of the ATG of the initiator Met codon in cDNA is denoted nucleotide +1. (?) Sibling with cystinosis. N: Novel mutation identified in this study.

The only two juvenile cystinosis patients (CY35 and CY66) are both compound heterozygous for a truncating mutation and the p.S139F mutation. This last change occurs in the first transmembrane domain because none of the missense mutations associated with infantile nephropathic cystinosis have been found there (9). This fact suggests a less functionality of this region of cystinosin, so the p.S139F mutation could determine the juvenile phenotype.

For diagnostic purposes, the knowledge of the spectrum of mutations in our population facilitates molecular diagnosis and genetic counselling in affected families.

Acknowledgements

We are grateful to the patients and their families. We thank the physicians who referred patients for this study: Dr Camacho (Hospital Sant Joan de Déu), Dr Nieto, Dr Vilalta and Dr Lara (Hospital Infantil Vall d'Hebron), Dr Ariceta (Hospital de Cruces), Dr García Valdecasas (Hospital Virgen del Rocío), Dr Rausell (Hospital Infantil La Fe), Dr García Messeguer (Hospital Universitario La Paz), Dr Oppenheimer (Hospital Clínic), Dr Quintana (Hospital Materno Infantil de Gran Canaria), Dr Daza (Hospital Torrecardenas), Dr Justa (Hospital Miguel Servet), Dr Lamas (Hospital de Melilla), Dr Bueno Fernández (Hospital Regional Universitario Carlos Haya), Dr Sierrasesumaga (Clínica Universitaria de Navarra), and Dr Bravo (Hospital Universitario Virgen de las Nieves). We thank Dr Clementi (University of Padua) for kindly providing us a sample of a heterozygote and a homozygote for the 57-kb deletion. We also appreciate the assistance of V. Reichenbach and R. Sans. This work was partially supported by Orphan Europe. The CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER) is an initiative of the ISCIII.

J Macías-Vidal^a

M Rodés^a

JM Hernández-Pérez^{a,b}

MA Vilaseca^{b,c}

MJ Coll^{a,b}

^aInstitut de Bioquímica Clínica.

Servei de Bioquímica i Genètica Molecular.

Hospital Clínic, Barcelona, Spain,

^bCIBER de Enfermedades Raras (CIBERER),

Barcelona, Spain, and

^cDepartament de Bioquímica Clínica, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

References

- Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA. Cystinosis: a disorder of lysosomal membrane transport. In: Scriver CJ, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw-Hill, 2001: 5085–5108.
- Town M, Jean G, Cherqui S et al. A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet* 1998; 18 (4): 319–324.
- Vilaseca MA, Camacho JA, Briones P, Farre C, Mas A. Biochemical follow-up in late-treated nephropathic cystinosis. *J Inher Metab Dis* 1995; 18 (2): 147–150.
- Anikster Y, Lucero C, Touchman JW et al. Identification and detection of the common 65-kb deletion breakpoint in the nephropathic cystinosis gene (*CTNS*). *Mol Genet Metab* 1999; 66 (2): 111–116.
- Fernandez-Valero EM, Ballart A, Iturriaga C et al. Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: genotype-phenotype correlations. *Clin Genet* 2005; 68 (3): 245–254.
- den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mut* 2000; 15 (1): 7–12.
- Shotelersuk V, Larson D, Anikster Y et al. *CTNS* mutations in an American-based population of cystinosis patients. *Am J Hum Genet* 1998; 63 (5): 1352–1362.
- Alcantara-Ortigoza MA, Belmont-Martinez L, Vela-Amieva M, Gonzalez-Del Angel A. Analysis of the *CTNS* gene in nephropathic cystinosis Mexican patients: report of four novel mutations and identification of a false positive 57-kb deletion genotype with LDM-2/exon 4 multiplex PCR assay. *Genet Test* 2008; 12 (3): 409–414.
- Attard M, Jean G, Forestier L et al. Severity of phenotype in cystinosis varies with mutations in the *CTNS* gene: predicted effect on the model of cystinosin. *Hum Mol Genet* 1999; 8 (13): 2507–2514.
- Heil SG, Levchenko E, Monnens LA, Trijbels FJ, Van der Put NM, Blom HJ. The molecular basis of Dutch infantile nephropathic cystinosis. *Nephron* 2001; 89 (1): 50–55.
- Kiehltopf M, Schickel J, Gonne B et al. Analysis of the *CTNS* gene in patients of German and Swiss origin with nephropathic cystinosis. *Hum Mutat* 2002; 20 (3): 237.
- Mason S, Pepe G, Dall'Amico R et al. Mutational spectrum of the *CTNS* gene in Italy. *Eur J Hum Genet* 2003; 11 (7): 503–508.
- Peabody DS, Berg P. Termination-reinitiation occurs in the translation of mammalian cell mRNAs. *Mol Cell Biol* 1986; 6 (7): 2695–2703.
- Kalatzis V, Cohen-Solal L, Cordier B et al. Identification of 14 novel *CTNS* mutations and characterization of seven splice site mutations associated with cystinosis. *Hum Mutat* 2002; 20 (6): 439–446.
- Kalatzis V, Nevo N, Cherqui S, Gasnier B, Antignac C. Molecular pathogenesis of cystinosis: effect of *CTNS* mutations on the transport activity and subcellular localization of cystinosin. *Hum Mol Genet* 2004; 13 (13): 1361–1371.
- PolyPhen: prediction of functional effect of human nsSNPS, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>. Accessed on: January 2009.
- PANTHER Classification System, <http://www.pantherdb.org/>. Accessed on: January 2009.
- Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay. *Curr Biol* 2002; 12 (6): 196–197.
- BDGP: Splice Site Prediction by Neural Network, http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html. Accessed on: January 2009.
- Human Splicing Finder, <http://www.umd.be/HSF/>. Accessed on: January 2009.

Correspondence:

Dr Maria Josep Coll
 Institut de Bioquímica Clínica,
 Hospital Clínic
 C/ Mejía Lequerica s/n,
 Ed. Helios III Planta baixa
 08028 Barcelona, Spain.
 Tel.: +34 93 2279341
 fax: +34 93 2275668
 e-mail: mjcoll@clinic.ub.es

RESULTATS ANNEXOS

Posteriorment a la data de publicació de l'article, s'ha realitzat la cerca de mutacions a 9 pacients més d'origen espanyol afectes de cistinosi. Els resultats d'aquesta anàlisi mutacional es mostren a la taula que es troba a continuació.

Taula 4. Fenotip clínic i genotip dels últims pacients espanyols diagnosticats de cistinosi.

Pacient	Fenotip clínic	Canvi de nucleòtid (al·lel 1)	Canvi d'aminoàcid (al·lel 1)	Canvi de nucleòtid (al·lel 2)	Canvi d'aminoàcid (al·lel 2)
<i>CY72</i>	Infantil	c.646dupA	p.T216NfsX12	c.646dupA	p.T216NfsX12
<i>CY75</i>	Infantil	57-kb deletion	---	c.518_519delAC	p.Y173X
<i>CY80</i>	Infantil	c.518_519del AC	p.Y173X	c.646dupA	p.T216NfsX12
<i>CY84</i>	Infantil	57-kb deletion	---	c.682-1G>T	---
<i>CY89</i>	Infantil	57-kb deletion	---	c.1354G>A	p.G339R
<i>CY92</i>	Infantil	57-kb deletion	---	57-kb deletion	---
<i>CY93</i>	Infantil	c.1-19_61del	?	c.1-19_61del	?
<i>CY96</i>	Infantil	57-kb deletion	---	57-kb deletion	---
<i>CY101</i>	Infantil	57-kb deletion	---	57-kb deletion	---

?: efecte desconegut.

CAPÍTOL II. LA MALALTIA DE NIEMANN-PICK TIPUS C

Article 2: Estudi mutacional de pacients afectes de Niemann-Pick tipus C: rellevància de les mutacions de *splicing*

Referència: Macías-Vidal J, Rodríguez-Pascau L, Sánchez-Ollé G, Lluch M, Vilageliu L, Grinberg D, Coll MJ; Spanish NPC Working Group. Molecular analysis of 30 Niemann-Pick type C patients from Spain. Clin Genet. 2011; 80(1):39-49.

RESUM

Aquesta publicació engloba els resultats de l'anàlisi mutacional realitzat a 30 pacients NPC no relacionats, que ha permès la identificació de 43 mutacions diferents al gen *NPC1*, de les quals 12 no havien estat descrites anteriorment. Entre els nous canvis hi ha 4 mutacions de canvi de sentit (p.F995L, p.F1079S, p.L1106P i p.G1209E), una mutació sense sentit (p.E1089X), una inserció d'1 pb (p.L1117PfsX4), una deleció en pauta (p.N916del), 4 canvis intrònics (c.58-3280C>G, c.882-28A>T, c.2604+5G>A i c.3591+5G>A) que afecten al procés de *splicing*, i la primera deleció que inclou tot el gen *NPC1* descrita fins ara a la malaltia de NPC.

En totes les mutacions de *splicing*, la formació de transcrits amb un *splicing* aberrant va ser confirmada a través de l'anàlisi del cDNA. A més, la degradació del mRNA mitjançada pel mecanisme de NMD també va ser analitzada. Cal destacar la rellevància dels defectes de *splicing*, un 20% dels al·lels mutats d'aquesta cohort.

Tal com s'havia descrit prèviament en aquesta malaltia, les correlacions genotip-fenotip són limitades degut al gran número de mutacions privades. Per primera vegada, es descriu un pacient homozigot per la mutació p.I1061T que presenta el fenotip clínic infantil sever, i un altre pacient amb fenotip bioquímic variant que té la presentació clínica neonatal de la malaltia.



Short Report

Molecular analysis of 30 Niemann–Pick type C patients from Spain

Macías-Vidal J, Rodríguez-Pascau L, Sánchez-Ollé G, Lluch M, Vilageliu L, Grinberg D, Coll MJ, the Spanish NPC Working Group. Molecular analysis of 30 Niemann–Pick type C patients from Spain. *Clin Genet* 2011; 80: 39–49. © John Wiley & Sons A/S, 2010

Mutations in the *NPC1* or *NPC2* gene are responsible for Niemann–Pick type C (NPC) disease (OMIM #257220), an autosomal recessive neurodegenerative lysosomal storage disorder caused by an incorrect regulation of intracellular lipid trafficking. A molecular analysis carried out in 30 unrelated patients identified 43 distinct mutations in the *NPC1* gene, 12 of which had not been previously described. The novel *NPC1* alleles were four amino acid substitutions (p.F995L, p.F1079S, p.L1106P and p.G1209E), a nonsense mutation (p.E1089X), a 1-bp insertion (p.L1117PfsX4), an in-frame deletion (p.N916del), four intronic changes (c.58-3280C>G, c.882-28A>T, c.2604+5G>A and c.3591+5G>A) that affect the splicing mechanism, and the first deletion including the whole gene described in NPC disease. In all the splice site mutations, the formation of abnormal spliced transcripts was confirmed by cDNA analysis, and mRNA degradation by the nonsense-mediated mRNA decay process was also assessed. As it has been previously reported in this disease, genotype–phenotype correlations are limited due to the large number of private mutations. We describe for the first time one homozygous patient for p.I1061T mutation, who presented the severe infantile clinical onset, and another patient with the variant biochemical phenotype, whose clinical presentation was the neonatal form of the disease.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

**J Macías-Vidal^{a,b},
L Rodríguez-Pascau^{b,c,d},
G Sánchez-Ollé^{b,c,d}, M Lluch^{a,b},
L Vilageliu^{b,c,d}, D Grinberg^{b,c,d}
and MJ Coll^{a,b} and the Spanish
NPC Working Group***

^aInstitut de Bioquímica Clínica, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, Spain, ^bCIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain, ^cDepartament de Genètica, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, and ^dInstitut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain

*The Spanish NPC Working Group includes all physicians who referred patients' samples for the study: A. Alonso (Hospital Virgen del Camino, Pamplona), M. Arellano (Hospital Mútua de Terrassa, Barcelona), O. Blanco de la Barca (Complejo Hospitalario Universitario de Vigo), M. R. Cazorla (Hospital de Fuenlabrada, Madrid), J. Dalmau (Hospital Universitari La Fe, Valencia), R. Domingo (Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia), M. T. García-Silva and E. Martín (Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid), M. Gil-Campos (Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba), P. Jara (Hospital Universitario La Paz, Madrid), D. Lefeber (Radboud University Medical Centre Nijmegen, Nederland), J. A. Martínez-Matos and L. Romero (Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona), I. Ortiz (Hospital General de Elda, Alicante), G. Ozaita (Complejo Hospitalario de Ourense), M. S. Pérez Poyato and M. Pineda (Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona), J. Prieto (Hospital Universitario de Salamanca), S. Roldán (Hospital Virgen de las Nieves, Granada), L. Ruiz del Portal (Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla) and A. Verdú Pérez (Hospital Virgen de la Salud, Toledo).

Key words: large deletion – lysosomal storage disorder – Niemann – Pick type C disease – *NPC1* gene – splice site mutations

Macías-Vidal et al.

Corresponding author: Dr Maria Josep Coll, Institut de Bioquímica Clínica, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, C/Mejía Lequerica s/n, Ed. Helios III Planta baixa, 08028 Barcelona, Spain.
Tel.: +34 932279341;
fax: +34 932275668;
e-mail: mjcoll@clinic.ub.es

Received 12 April 2010, revised and accepted for publication 2 July 2010

Niemann–Pick type C (NPC) disease (OMIM #257220) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM>) is an autosomal recessive lipid storage disorder. At the cellular level, the disease produces a late-endosomal/lysosomal accumulation of endocytosed unesterified cholesterol that leads to the accumulation of a complex pattern of lipids in non-neural tissues and in the brain (1). The clinical manifestations are characterized by the presence of hepatosplenomegaly and severe progressive neurological dysfunction with varying age at onset and later course (2).

Genetic and allelic heterogeneity was established for this disease by the identification of two different genes, *NPC1* (MIM 607623) and *NPC2* (MIM 601015) (3–5). Over 294 and 19 different disease-causing mutations have been reported worldwide in *NPC1* and *NPC2* gene, respectively (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).

A number of studies point towards a key role for the NPC1 and NPC2 proteins in modulating vesicular trafficking of cholesterol and glycolipids (6–8), although whether they work in concert, interacting at the functional and potentially at the structural levels, is unclear. It is worth mentioning that direct protein–protein interactions for NPC2 with NPC1 have not been reported so far (9).

In a previous survey by our group, we reported the mutational analysis of the *NPC1* gene in a cohort of 40 Spanish patients and we suggested a unique origin for p.C177Y and p.G993EfsX4 mutations in contrast to p.I1061T mutation that showed different origins. Here, we present the molecular analysis in 30 unrelated NPC patients, which allowed the identification of 12 novel mutations in the *NPC1* gene including a large deletion and several splice site mutations that have been characterized at RNA level.

Materials and methods

Patients

Samples were obtained from 31 patients belonging to 30 unrelated families. Most of them were

of Spanish origin, except for seven patients from other ethnic backgrounds: Moroccan, Costa Rican, Ecuadorian and Dutch. Nine patients (NPC02, 03, 07, 13, 21, 29, 36, 38 and 40) had been previously described by our group (10), but one of the mutant alleles in each of them had remained unidentified. Diagnosis of NPC disease was determined by cytochemical demonstration of pathologically enriched cholesterol via filipin staining in cultured skin fibroblasts as described by Vanier et al. (11). Classification of patients with respect to their clinical characteristics was as previously proposed (12).

Mutation screening: analysis of cDNA and genomic DNA

To identify mutations in *NPC1* gene, sequence analysis of its cDNA was performed. The changes identified were confirmed by sequencing the corresponding genomic DNA region. When only one mutation was found in the cDNA sequence, all exons and intron boundaries were sequenced.

To detect possible mutations whose mRNAs are candidate to suffer nonsense-mediated mRNA decay (NMD) process (13), cells were treated with cycloheximide (CHX) (Sigma, St. Louis, MO) according to the protocol previously described (14). RNA extraction and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were performed using standard methods. *NPC1* cDNA was amplified in 10 overlapping PCR fragments using either specific primers previously described (15) or self-designed primers, which are available upon request. To analyse the occurrence of exon 11 skipping in CHX-treated or untreated fibroblasts from the NPC29 patient and from a healthy individual, cDNA was amplified using the forward primer specific for the skipped transcript (overlapping exons 10 and 12) 5'TTGGGAGGCTATGATGGTTTA3' and the reverse primer in exon 14 5'GGTTTCCCC TTGAAGACGTT3'. The real-time PCR method used to quantify the mRNA levels in this patient was previously described (14). To determine the intronic change that causes exonization of 374

bp in the NPC59 patient, primers based on the sequence of intron 1 were used (primer sequences available upon request). PCR products were screened for mutations by DNA sequencing using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing v3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), according to the manufacturer's instructions. The sequencing reactions were run on an ABI Prism® 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Genomic DNA was extracted from cultured skin fibroblasts by standard methods. *NPC1* and *NPC2* exons and their intron boundaries were amplified using primers and PCR conditions previously described (10, 16). PCR products were purified and sequenced as described in the preceding paragraphs. Novel mutations were analysed in 50 healthy controls.

Characterization of the mutations of patient NPC57

To confirm the presence of p.T1066N mutation in exon 21 of the *NPC1* gene in samples from the NPC57 patient and from their parents, gDNA was amplified.

To analyse the deletion, quantitative real-time PCR experiments were performed using the StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). All PCR reactions, with a final volume of 10 µl, were run in triplicate and contained 50 ng of DNA. Exons 1, 21 and 25 of the *NPC1* gene and exon 5 of the *PMM2* gene, which was used as endogenous control, were run in separate wells. The reagents were SYTO®9 green fluorescent nucleic acid stain (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, Oregon) and Ampli Taq® Gold DNA Polymerase with Gene Amp® 10× PCR Gold buffer and MgCl₂ solution (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers used to amplify the *PMM2* fragment were forward 5'AGGCTGTTTATCTATGTTGCC3' and reverse 5'CACCAGGCCATATCTTATTT3'. PCR conditions were 95°C for 10 min, then 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The runs were monitored via the STEPONE Software v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Levels of gDNA were relatively quantified by evaluating C_t values according to the comparative C_t (ΔΔC_t) method (Applied Biosystems, Foster City, CA).

A total of 13 polymorphisms located in the *NPC1* gene were analysed by PCR amplification and sequencing. In particular, three of the polymorphisms were in the 5'UTR region, four were in intron 1, and the remaining six were in exons 4, 6, 12, 17, 18 and 25 (last exon of the gene),

Molecular analysis of 30 NPC patients

respectively. Parents' samples were also analysed for these polymorphisms.

Mutation nomenclature

All mutations were described according to the recommended nomenclature (17) (the updates found at the web page: <http://www.HGVS.org/mutnomen/>). Gene nucleotide numbering was according to the GenBank sequence NM_000271.3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), with +1 as A of the start codon. The ATG codon represents +1 for the amino acid numbering according to NPC1 protein sequence NP_000262.1.

Results

Clinical and biochemical phenotype

The clinical and biochemical phenotype distribution of the unrelated NPC patients is summarized in Table 1. Clinical phenotypes were classified according to the age at onset of neurological symptoms, except for the neonatal fatal systemic form. The group of 30 patients included 3 (10%) neonatal, 10 (33.3%) severe infantile (onset at age <2 years), 6 (20%) late infantile (onset at age 3–5 years), 6 (20%) juvenile (onset at age 5–16 years) and 2 (6.6%) adult (onset at age >16 years) clinical forms. In three patients, the clinical phenotype could not be established due to the lack of data relating to disease progression.

Regarding the biochemical phenotype, 21 (70%) of the patients presented the classical phenotype (a massive unesterified cholesterol accumulation) and 8 (26.6%) of them showed the variant phenotype (a moderate unesterified cholesterol accumulation). No biochemical classification was possible in one patient because the filipin staining could not be performed.

Mutation analysis

Table 1 shows the *NPC1* genotypes of the patients included in this study. Molecular analysis of *NPC1* gene allowed the identification of 43 different mutations, 12 of which had not been described before. The novel mutations were four amino acid substitutions [p.F995L (c.2983T>C), p.F1079S (c.3236T>C), p.L1106P (c.3317T>C) and p.G1209E (c.3626G>A)], a nonsense mutation [p.E1089X (c.3265G>T)], a 1-bp insertion [p.L1117PfsX4 (c.3349dupC)], an in-frame deletion [p.N916del (c.2746_2748delAAT)], four intronic changes that affect the splicing mechanism (c.58-3280C>G, c.882-28A>T, c.2604+5G>A

Macías-Vidal et al.

Table 1. Clinical, biochemical and mutational features of 30 Niemann–Pick C disease patients

Patient	Origin	Clinical phenotype ^a	Biochemical phenotype ^b	Nucleotide change (allele 1)	Amino acid change ^c (allele 1)	Nucleotide change (allele 2)	Amino acid change ^c (allele 2)	Ref.
NPC73 ^d	Spanish	Neonatal	Classical	c.2604+5G>A	p.I839_D868del	c.2604+5G>A	p.I839_D868del	N
NPC55	Spanish	Neonatal	Classical	c.3591+5G>A	p.[S1160_S1197del, V1177_S1197del, S1197_V1198ins15]	c.3591+5G>A	p.[S1160_S1197del, V1177_S1197del, S1197_V1198ins15]	N
NPC61	Spanish	Neonatal	Variant	c.[2932C>T; 3467A>G]	p.[R978C; N1156S]	c.3019C>G	p.P1007A	18, 4, 19
NPC02 ^d	Spanish	Severe infantile	Classical	c.3245+1dupG	p.[S1062RfsX15, S1082_Q1090delinsR]	c.3265G>T	p.E1089X	10, N
NPC07 ^d	Spanish	Severe infantile	Classical	c.894dupT	p.V299CfsX9	c.2612A>G	p.Y871C	10, 20
NPC40 ^d	Spanish	Severe infantile	Classical	c.1935T>A	p.C645X	c.3236T>C	p.F1079S	10, N
NPC47	Ecuadorian	Severe infantile	Classical	c.530G>A	p.C177Y	c.530G>A	p.C177Y	18
NPC51	Spanish	Severe infantile	Classical	c.1436G>A	p.C479Y	c.3160G>A	p.A1064T	10, 21
NPC53	Spanish	Severe infantile	Classical	c.352_353delAG	p.Q119VfsX8	c.2830G>A	p.D944N	22, 21
NPC57	Spanish	Severe infantile	Classical	c.3197C>A	p.T1066N	Deletion of the whole NPC1 gene	-	10, N
NPC62	Moroccan	Severe infantile	Classical	c.3182T>C	p.I1061T	c.3182T>C	p.I1061T	23
NPC63	Spanish	Severe infantile	Classical	c.2324A>C	p.Q775P	c.2830G>A	p.D944N	21
NPC64	Moroccan	Severe infantile	Classical	c.3317T>C	p.L1106P	c.3317T>C	p.L1106P	N
NPC03 ^d	Spanish	Late infantile	Classical	c.530G>A	p.C177Y	c.2604+5G>A	p.I839_D868del	18, N
NPC21 ^d	Spanish	Late infantile	Classical	c.882-28A>T	p.K295RfsX6	c.1274C>A	p.S425X	N, 10
NPC36 ^{d,e}	Spanish	Late infantile	Classical	c.1554-1009G>A	p.A519QfsX1	c.2883_2897del	p.I962_F966del	24, 10
NPC38 ^d	Spanish	Late infantile	Variant	c.1554-1009G>A	p.A519QfsX1	c.3754G>C	p.V1198GfsX4 ^f	24, 10
NPC45	Costa Rican	Late infantile	Classical	c.2201G>T	p.S734I	c.2201G>T	p.S734I	25
NPC54	Spanish	Late infantile	Variant	c.352_353delAG	p.Q119VfsX8	c.2974G>T	p.G992W	22, 19
NPC29 ^d	Spanish	Juvenile	Variant	c.1436G>A	p.C479Y	?	?	10
NPC46	Spanish	Juvenile	Classical	c.1900G>A	p.V664M	c.3104C>T	p.A1035V	25, 18
NPC49	Spanish	Juvenile	Classical	c.2292G>A	p.A750_G765del	c.3425T>C	p.M1142T	18, 21
NPC52	Spanish	Juvenile	Variant	c.2932C>T	p.R978C	c.2983T>C	p.F995L	18, N
NPC58	Spanish	Juvenile	Classical	c.2746_2748delAAT	p.N916del	c.3451G>A	p.A1151T	N, 26
NPC60	Spanish	Juvenile	Variant	c.1554-1009G>A	p.A519QfsX1	c.3182T>C	p.I1061T	24, 23
NPC50	Spanish	Adult	Variant	c.2974G>C	p.G992R	c.2983T>C	p.F995L	21, N
NPC56/NPC56 ^g	Spanish	Adult	Classical	c.3349dupC	p.L1117PfsX4	c.3672C>G	p.F1224L	N, 10
NPC48	Dutch	Unknown	Unknown	c.2861C>T	p.S954L	c.3626G>A	p.G1220E	19, N
NPC59	Moroccan	Unknown	Variant	c.58-3280C>G	p.V20CfsX6	c.2819C>T	p.S940L	N, 19
NPC65	Moroccan	Unknown	Classical	c.3557G>A	p.R1186H	c.3557G>A	p.R1186H	4

? , not found; N, novel mutation identified in this report; NMD, nonsense-mediated mRNA decay.

^aClassification of clinical phenotypes by age at onset of neurological symptoms (12), except for the neonatal fatal systemic form that includes those patients who died from liver failure in the first months of life. We included in the unknown form those patients who were diagnosed at the neonatal period on the systemic signs but not presented any neurological symptom yet.

^bDefined by the degree of severity of alterations of intracellular cholesterol processing.

^cNote that in some cases, the putative protein might not be synthesized due degradation of the mRNA by NMD.

^dPatients previously reported (10), but they had only identified one mutated allele.

^eNote that this patient was mentioned as NPC111 in the article in which the c.1554-1009G>A mutation was first described (24).

^fNote that this mutation was previously described as p.G1252R (10).

^gPatient 56 and 56' are affected siblings.

and c.3591+5G>A), and a large deletion that includes the whole *NPC1* gene.

We also found a novel mutant allele carrying two *in cis* mutations, p.[R978C;N1156S], as shown by analysis on the NPC61 parents' DNA (not shown).

Our analysis of *NPC1* gene allowed completion of 29 genotypes. In one patient (NPC29), after sequencing both cDNA and genomic DNA, one allele still remains unknown (see subsequent sections).

Splicing mutations

The electrophoretic profile of RT-PCR products obtained from total RNA isolated from several patients' fibroblasts, which bear novel splice site mutations (c.58-3280C>G, c.882-28A>T, c.2604+5G>A and c.3591+5G>A) or previously described changes (c.1554-1009G>A, c.2292G>A and c.3754G>C), showed multiple bands (Fig. 1). Therefore, these mutations are worth to be described in more detail.

The presence of the intronic mutation c.58-3280C>G promotes a pseudoexon insertion that corresponds to 374 bp of intron 1, which was detected by direct sequencing (c.57_58ins374) (Fig. 1a). This change presumably creates a novel acceptor region and activates a cryptic donor splice site (splicing score 0.92), whereas the naturally used adjacent splice sites of the surrounding exons remain functional, resulting in the generation of an aberrant transcript. The inserted intronic sequence led to a premature termination codon (PTC), but the extra band was present in both CHX-treated and untreated samples, suggesting no degradation by the NMD mechanism (not shown).

The c.882-28A>T intronic change, which involves the conserved adenosine residue of the lariat branch point in intron 6, causes an abnormally spliced cDNA with the complete skipping of exon 7 (c.882_954del73) (Fig. 1b). The loss of exon 7 disrupts the reading frame leading to a PTC, which activates mRNA degradation by the NMD process (not shown).

The c.2604+5G>A splice mutation, which is located in a conserved position of the donor splice site of intron 17, promotes skipping of exon 17 (c.2515_2604del190) (Fig. 1c).

The analysis of c.3591+5G>A products reveals three abnormally spliced cDNAs: one with an insertion of the first 45 bp of intron 23 (c.3591_3592ins45), another with a deletion of the last 63 bp of exon 23 (c.3529_3591del63) and a third one with the skipping of exon 23 (c.3478_3591del114) (Fig. 1d).

Molecular analysis of 30 NPC patients

Among the previously described mutations, the deep intronic change c.1554-1009G>A (24) is located in intron 9 and creates a cryptic donor splice site resulting in the incorporation of 194 bp of the intron 9 (c.1553_1554ins194) as a pseudoexon (Fig. 1e).

The c.2292G>A mutation leads to the creation of an acceptor splice site in exon 15, generating a transcript with an in-frame deletion of the first 48 bp of exon 15 (c.2246_2293del48) (Fig. 1f).

The c.3754G>C mutation affects the last nucleotide of exon 24, which plays a key role in governing the splicing efficiency, and generates skipping of exon 24 (c.3592_3754del163) (Fig. 1g). In a previous report (10), the effect on NPC1 protein of this change was indicated as p.G1252R; nevertheless, skipping of exon 24 disrupts the reading frame, and the predicted translation product of this mRNA, which is not degraded by the NMD process (not shown), is a truncated protein.

Different transcripts found in the sample from patient NPC02

In a previous study (10), one of the mutant alleles, c.3245+1dupG, of this patient was found. Here, we report the identification of a mutation in the second allele, p.E1089X. Thus, the two disease-causing mutations of the patient were now identified. However, the analysis of the cDNA from the patient showed the appearance of four different transcripts (Fig. 2) as a result of the combination of the presence/absence of the dupG and of an alternative pattern of splicing that skipped the first 25 nucleotides of exon 22 (from position c.3246 to c.3270). In wild-type individuals, this alternative splicing was also observed but at very low levels and was only detectable upon CHX treatment (not shown). In the patient, one abundant transcript was that bearing the extra G and in which the alternative acceptor site within exon 22 had been used (Fig. 2, transcript D). This is consistent with the fact that this transcript would not be affected by NMD because the frameshift caused by the addition of the G nucleotide would be corrected by the elimination of the 25 nucleotides of exon 22 due to the alternative splicing. The analysis of the genomic and cDNA samples from the parents confirmed this hypothesis. The father carries the duplication of the G and the mother the nonsense p.E1089X mutation. At the cDNA level, the p.E1089X mutation was not observed, suggesting degradation by NMD.

Macías-Vidal et al.

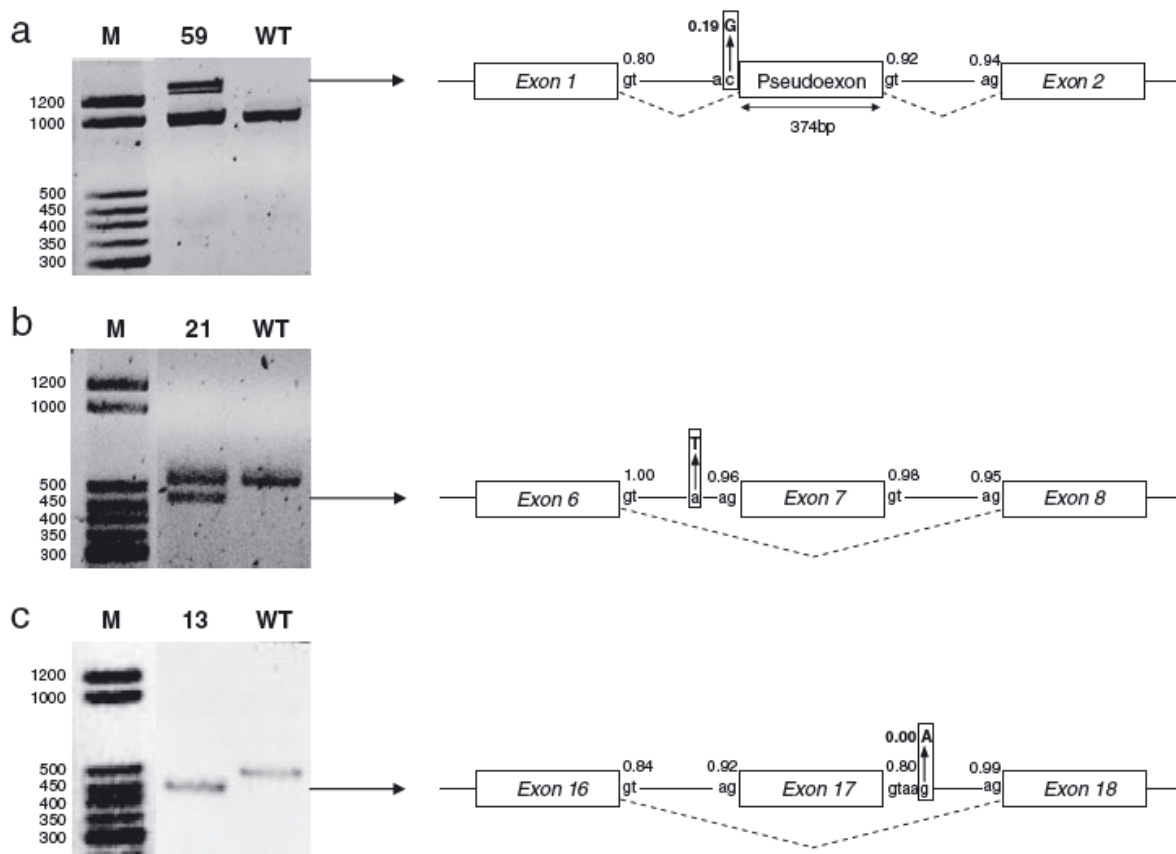


Fig. 1. Abnormal *NPC1* mRNAs in cases with splice site mutations. Agarose gel electrophoresis of reverse transcription-polymerase chain reaction products and schematic depictions of samples of *NPC1* cDNA isolated from the patients' fibroblasts treated with cycloheximide. The splice scores (calculated with *BDGP* software) are shown above the corresponding 5' and 3' splice sites. The mutant scores are in bold letters. Mutations are indicated by arrows. M, molecular weight of 50-bp DNA marker (expressed in bp); WT, wild-type individual. (a) Patient 59 with c.58-3280C>G mutation. The intermediate band corresponds to heteroduplex. (b) Patient 21 with c.882-28A>T mutation. (c) Patient 13 with c.2604+5G>A mutation in homozygosity. (d) Patient 55 with c.3591+5G>A mutation in homozygosity. (e) Patients 36, 38 and 60 with c.1554-1009G>A mutation. (f) Patient 49 with c.2292G>A mutation. (g) Patient 38 with c.3754G>C mutation. The upper band corresponds to heteroduplex.

Large deletion allele carried by patient NPC57

The first analysis of samples from patient NPC57 revealed homozygosity for mutation p.T1066N. However, while the father was heterozygous for this change, the mother did not carry the mutation. The analysis of 13 polymorphisms within the *NPC1* gene (three in the 5'UTR region: rs1620047, rs1788774 and rs1652354; four in intron 1: rs1788781, rs1788783, rs1788826 and rs7226548; and six in the coding region: p.Y129Y, p.H215R, p.M642I, p.I858V, p.N931N and p.R1266Q) in the patient and parents suggested a deletion of the maternal allele, because the polymorphisms covered all the gene from the 5'UTR to the last exon. Quantitative PCR analyses revealed that the patient and the mother have half of the amount of *NPC1* gDNA. The relative quantification (RQ) of the *NPC1* DNA was normalized to *PMM2* DNA levels (endogenous

control) using the comparative C_t ($\Delta\Delta C_t$) method. The control sample (wild-type individual) was set as the reference value (RQ = 1). Sample from the father showed RQ around 1, whereas the patient and the mother showed RQ around 0.50 for the exon 21 and also the first and the last exons of the *NPC1* gene. To determine the limits of the NPC57 deletion, additional polymorphisms located in other chromosome 18 flanking genes will be analysed.

Unidentified allele

Regarding NPC29 patient, apart from the identification of p.C479Y mutation in one allele, an extra band corresponding to the skipping of exon 11 (lost of 103 bp) was detected. However, no mutation that could explain this alternative splicing was found after cDNA and gDNA

Molecular analysis of 30 NPC patients

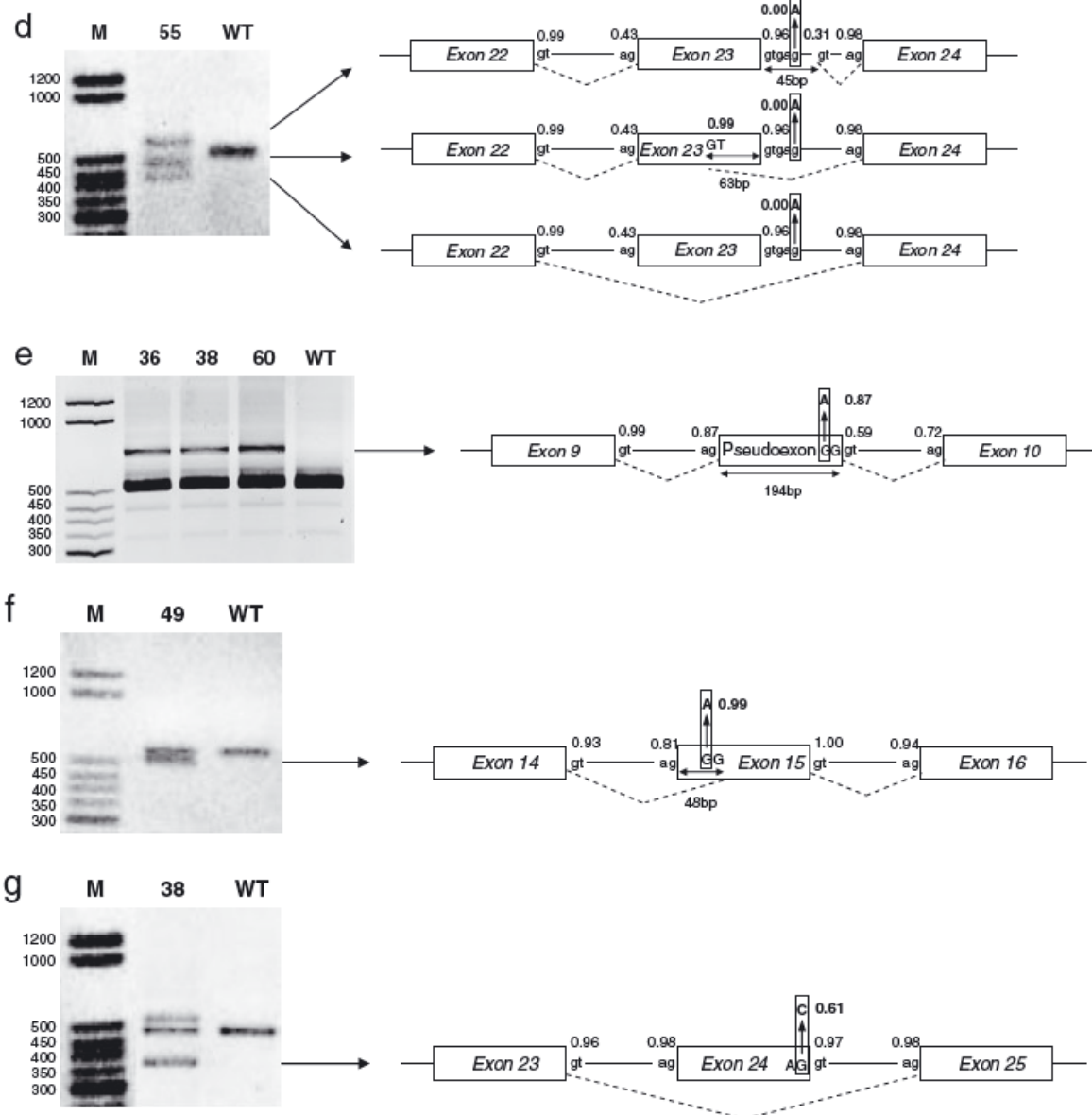


Fig. 1. Continued

sequencing. To analyse whether this transcript was naturally produced, we performed the same PCR amplification in cDNA from wild-type fibroblasts. The extra band was also detected in the wild-type sample, although the intensity was lower than in that of the patient (Fig. 3a). CHX treatment showed that this transcript was partly subjected to NMD. To further confirm these results, an additional PCR using a forward primer specifically designed for the amplification of the transcript lacking exon 11 was carried out. As shown in Fig. 3b, in all cases, a band of the expected size (416 bp) was obtained, suggesting that this alternative product is not related with the disease in

the patient. The analysis of polymorphic markers in the coding region of the *NPC1* gene and the normal mRNA levels observed by real-time PCR (RQ around 1) in this patient did not suggest the presence of a whole *NPC1* deletion or a mutation targeted by the NMD process. *NPC2* gene was also analysed in this patient but no change was detected.

Discussion

Mutation profile

As previously reported (27), molecular results in NPC patient series of this study show a broad

Macías-Vidal et al.

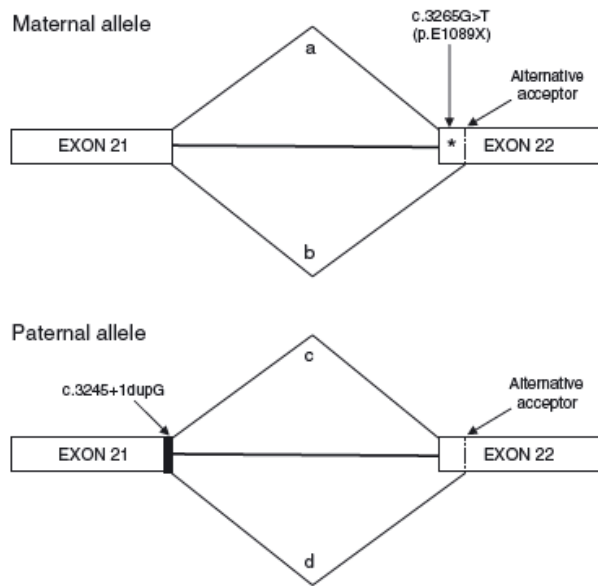


Fig. 2. *NPC1* transcripts observed in samples from patient NPC02. The maternal allele generates one transcript (a), which uses normal splice sites but contains the nonsense mutation c.3265G>T (p.E1089X) in exon 22, and another transcript (b) that uses an alternative acceptor site within exon 22 and skips the first 25 nucleotides of exon 22. The paternal allele bears an extra G nucleotide at the end of exon 21 and generates two transcripts depending on the usage of the normal (c) or alternative (d) acceptor site.

spectrum of disease-causing mutations in the *NPC1* gene.

The mutation profile of the studied cohort mainly shows mutant alleles containing missense alterations; however, it is worth mentioning the relevance of splicing defects. The true prevalence of this type of mutation is probably underestimated because deep intronic sequences are not conventionally sequenced, and in mRNA analysis, the aberrant transcripts (usually with a frameshift and a PTC) are usually prone to degradation by NMD (28).

Mutation p.I1061T is the most common *NPC1* mutation in patients of Western European descent (23). In our cohort of 55 Spanish NPC patients, including those of this study together with the ones reported in our preceding survey (10), this mutation accounts for 8% of the mutant alleles. The frequency of p.I1061T mutation is lower than that reported by other authors (23, 25, 29); however, it is similar to that described in the Portuguese and Italian populations (18, 30). Mutation p.P1007A was the second most frequent allele, with a frequency of 4.5%, in agreement with previous studies (20). The intronic change c.1554-1009G>A, first described by our group in the Spanish patient NPC36 (24), which causes a splicing error,

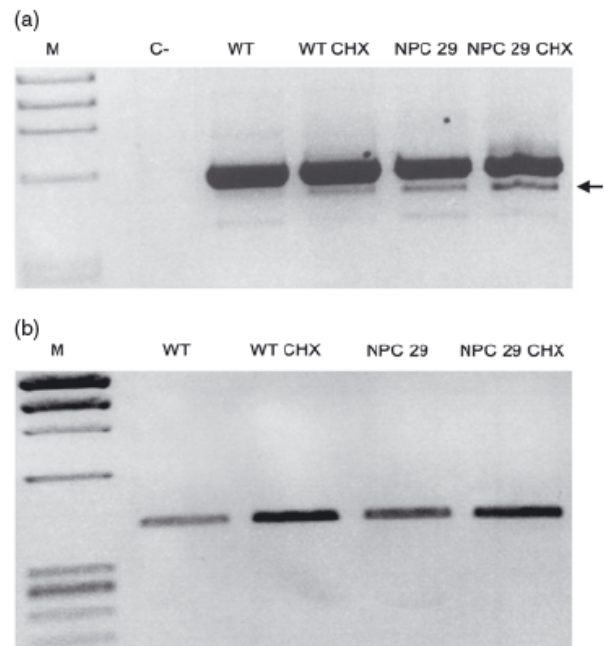


Fig. 3. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification of fragments of the *NPC1* cDNA in samples from a wild-type (WT) individual and patient 29 (NPC29), in the absence or presence of cycloheximide (CHX). M, molecular weight marker; C-, negative control (PCR without DNA). (a) Amplification of fragment 5 of the *NPC1* cDNA, including exons 9–13. The arrow indicates the band corresponding to the skipping of exon 11. (b) Amplification of the skipped transcript using a specific forward primer overlapping exons 10 and 12.

appeared to be relatively common in our country, because three patients (NPC36, NPC38 and NPC60) were compound heterozygous for this mutation (2.7%). There is a great allelic heterogeneity, because few mutations are present in more than one patient.

Referring to the novel mutations, the missense changes (p.F995L, p.F1079S, p.L1106P and p.G1209E) are probably pathogenic mutations due to the fact that they were not observed in 100 healthy control alleles; after sequencing all *NPC1* gene, no other mutations were found, and the affected amino acid residues are conserved throughout species. Moreover, functional effect prediction programs such as POLYPHEN (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) or PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) confirmed the possible pathogenesis of these novel changes (not shown). Although to verify these predictions, it should be necessary to perform expression studies on these alleles.

Among the other novel changes, there is the mutation p.N916del that causes an in-frame deletion. Although the effect of this deletion was not

confirmed by expression studies, the previous programs suggest that residue 916 is relevant for the NPC1 protein.

Mutations p.E1089X and p.L1117PfsX4 are undoubtedly disease-causing mutations, as they create a PTC that triggers mRNA degradation by the NMD mechanism (not shown).

The analysis of the novel splicing mutations (c.58-3280C>G, c.882-28A>T, c.2604+5G>A and c.3591+5G>A) using splicing prediction software (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) indicates that they disrupt natural splice sites. The effect of each mutation on the splicing score is shown in Fig. 1. In all cases, the formation of abnormal spliced transcripts has been confirmed by cDNA analysis. Nevertheless, to provide evidence that the observed intronic changes are disease causing, it should be necessary to evaluate them using minigene transfection assays. In the case of the novel deep intronic change, c.58-3280C>G, the fact that after CHX treatment no difference was observed in the cDNA from the patient NPC59 may be due to the escape of the NMD process. Termination codons are recognized by the NMD apparatus as premature if they are located more than 50–55 nucleotides upstream of the 3'-most exon–exon junction, but a number of apparent exceptions have been previously reported. The mechanisms involved in these individual cases of NMD resistance include the proximity of nonsense mutations to the natural initiation codon, translation re-initiation downstream of the nonsense codon and the presence of a sequence *cis*-acting element that confers immunity to the 50–55 nucleotide boundary rule (31). The same as the c.1554-1009G>A mutation (24), this intronic point mutation resulting in pseudoexon insertion can be effectively targeted with antisense therapy. In the case of c.882-28A>T mutation, the appearance of skipping of exon 7 coincides with what it was described for the c.882-28A>G mutation (32), because both of them affect the same nucleotide. Regarding the previously described c.2292G>A mutation, the observed effect in cDNA PCR product is the same as the one reported by other authors (18, 25).

We also describe a large deletion in one NPC patient, including the whole *NPC1* gene. To our knowledge, this is the first large deletion described in a NPC patient.

One allele remained unidentified, in the case of patient NPC29, in spite of the comprehensive analysis at the genomic and cDNA levels. The facts that a mutation on one *NPC1* allele was identified and that no mutation in *NPC2* was found strongly suggest that the missing mutation is in the *NPC1*

Molecular analysis of 30 NPC patients

gene. An aberrant splicing including the skipping of exon 11 was observed; however, it also occurred in wild-type individuals, indicating that it is not related to the disease. No other aberrant splicing was detected, which rules out the presence of a deep intronic mutation. The mutation (in exon 9) and polymorphisms in exons 4 and 12 were found in heterozygosity, both at the genomic and at the cDNA levels. These data rule out a complete deletion of the gene or a mutation in a regulatory region that prevents the transcription of the gene from one allele. Moreover, no differences at the RNA level were detected by real-time PCR. A complex rearrangement, a small deletion, or another alteration could exist, but it is difficult to understand how it was detected neither by the genomic nor by the cDNA analyses performed.

Genotype–phenotype correlation

As we previously reported, this NPC series shows a great prevalence of the severe infantile form (around 30%), whereas this clinical presentation represents 20% of cases in a European survey (27).

Genotype–phenotype correlations are limited, due to the large number of private mutations and because most of the patients' samples were found to be heteroallelic. Among these correlations, we would like to introduce several considerations relating to some mutations. The p.I1061T mutation has been suggested to correlate with juvenile clinical presentation (23). Conversely, we describe for the first time one homozygous patient for p.I1061T mutation (NPC62), who presented the severe infantile clinical onset. This last fact is in disagreement with the previous conclusion that one p.I1061T allele is sufficient to exclude the most severe infantile neurological form (20). In this patient, the *NPC1* gene was entirely sequenced and it shared the haplotype [–, –, –, –, –, –] with respect to the six polymorphic markers p.Y129Y, p.H215R, p.M642I, p.I858V, p.N931N and p.R1266Q as we previously reported for all chromosomes bearing the p.I1061T mutation (10). This patient presented neonatal cholestasis but absence of neurological signs until second year of life. At that time, he presented with retarded psychomotor development, followed rapidly by the appearance of other symptoms as ataxia, dystonia and cataplexy. The parents are consanguineous and a brother died at 1 year by hepatopathy of unknown origin.

Macías-Vidal et al.

According to published data, the presence of p.P1007A mutation led to a juvenile or adult clinical onset (10, 18, 21). Patient NPC61, heterozygous compound for this mutation and biochemical variant, presented the neonatal systemic clinical presentation of the disease. This patient presented hepatosplenomegaly and cholestasis at birth. He died from liver failure at 6 months of life before onset of neurological disease.

In conclusion, we have established the mutation profile in a large number of NPC patients, which contributes to a greater knowledge of this uncommon disorder. Moreover, we want to emphasize the need to analyse the cDNA in presence of CHX in those patients with one unidentified allele after performing the mutation screening in the genomic DNA. It is essential to detect splicing defects, which have relevance (20% of the mutated alleles in this cohort) as disease-causing mutations.

Acknowledgements

This research was supported by the Fundación Niemann–Pick de España, by the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (MEC, SAF2006-12276) y Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, SAF2009-11289) and by the Generalitat de Catalunya (SGR2005-00848 and 2009SGR-971). The authors are grateful to them and also to all patients and their families. J. M.-V. is recipient of Juan Girón fellowship from the Spanish Foundation and L. R.-P. was a recipient of a FI fellowship from the Generalitat de Catalunya. We also thank A. Valle and L. Ozaez for their technical assistance. The CIBER of Enfermedades Raras (CIBERER) is an initiative of the ISCIII.

References

- Patterson MC, Vanier MT, Suzuki K et al. Niemann–Pick disease type C: a lipid trafficking disorder. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th edn. New York: McGraw-Hill, 2001: 3611–3633.
- Vanier MT, Suzuki K. Niemann–Pick diseases. In: Moser HW, ed. *Neurodystrophies and neuropiloidoses: handbook of clinical neurology*, Vol. 66. Amsterdam: Elsevier Science, 1996: 133–162.
- Vanier MT, Duthel S, Rodriguez-Lafrasse C et al. Genetic heterogeneity in Niemann–Pick C disease: a study using somatic cell hybridization and linkage analysis. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 118–125.
- Carstea ED, Morris JA, Coleman KG et al. Niemann–Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 1997; 277: 228–231.
- Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H et al. Identification of HE1 as the second gene of Niemann–Pick C disease. *Science* 2000; 290: 2298–2301.
- Zhang M, Sun M, Dwyer NK et al. Differential trafficking of the Niemann–Pick C1 and 2 proteins highlights distinct roles in late endocytic lipid trafficking. *Acta Paediatr Suppl* 2003; 92: 63–73.
- Infante RE, Wang ML, Radhakrishnan A et al. NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 15287–15292.
- Subramanian K, Balch WE. NPC1/NPC2 function as a tag team duo to mobilize cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 15223–15224.
- Storch J, Xu Z. Niemann–Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1791: 671–678.
- Fernández-Valero EM, Ballart A, Iturriaga C et al. Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann–Pick type C patients: genotype–phenotype correlations. *Clin Genet* 2005; 68: 245–254.
- Vanier MT, Rodriguez-Lafrasse C, Rousson R et al. Type C Niemann–Pick disease: spectrum of phenotypic variation in disruption of intracellular LDL-derived cholesterol processing. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1096: 328–337.
- Iturriaga C, Pineda M, Fernández-Valero EM et al. Niemann–Pick C disease in Spain: clinical spectrum and development of a disability scale. *J Neurol Sci* 2006; 249: 1–6.
- Maquat LE. When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells. *RNA* 1995; 1: 453–465.
- Macías-Vidal J, Gort L, Lluch M et al. Nonsense-mediated mRNA decay process in nine alleles of Niemann–Pick type C patients from Spain. *Mol Genet Metab* 2009; 97: 60–64.
- Tarugi P, Ballarini G, Bembi B et al. Niemann–Pick type C disease: mutations of NPC1 gene and evidence of abnormal expression of some mutant alleles in fibroblasts. *J Lipid Res* 2002; 43: 1908–1919.
- Millat G, Chikh K, Naureckiene S et al. Niemann–Pick disease type C: spectrum of HE1 mutations and genotype/phenotype correlations in the NPC2 group. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 1013–1021.
- den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 2000; 15: 7–12.
- Ribeiro I, Marcão A, Amaral O et al. Niemann–Pick type C disease: NPC1 mutations associated with severe and mild cellular cholesterol trafficking alterations. *Hum Genet* 2001; 109: 24–32.
- Greer WL, Dobson MJ, Girouard GS et al. Mutations in NPC1 highlight a conserved NPC1-specific cysteine-rich domain. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 1252–1260.
- Millat G, Baïlo N, Molinero S et al. Niemann–Pick C disease: use of denaturing high performance liquid chromatography for the detection of NPC1 and NPC2 genetic variations and impact on management of patients and families. *Mol Genet Metab* 2005; 86: 220–232.
- Millat G, Marçais C, Tomasetto C et al. Niemann–Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 1373–1385.
- Yamamoto T, Nanba E, Ninomiya H et al. NPC1 gene mutations in Japanese patients with Niemann–Pick disease type C. *Hum Genet* 1999; 105: 10–16.
- Millat G, Marçais C, Rafi MA et al. Niemann–Pick C1 disease: the I1061T substitution is a frequent mutant allele in patients of Western European descent and correlates with a classic juvenile phenotype. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 1321–1329.
- Rodríguez-Pascual L, Coll MJ, Vilageliu L et al. Antisense oligonucleotide treatment for a pseudoexon-generating mutation in the *NPC1* gene causing Niemann–Pick type C disease. *Hum Mutat* 2009; 30: E993–E1001.
- Park WD, O'Brien JF, Lundquist PA et al. Identification of 58 novel mutations in Niemann–Pick disease type C: correlation with biochemical phenotype and importance of PTC1-like domains in NPC1. *Hum Mutat* 2003; 22: 313–325.

26. Garver WS, Jelinek D, Meaney FJ et al. The national Niemann–Pick type C1 disease database: correlation of lipid profiles, mutations, and biochemical phenotypes. *J Lipid Res* 2010; 51: 406–415.
27. Vanier MT, Millat G. Niemann–Pick disease type C. *Clin Genet* 2003; 64: 269–281.
28. Vega AI, Pérez-Cerdá C, Desviat LR et al. Functional analysis of three splicing mutations identified in the PMM2 gene: toward a new therapy for congenital disorder of glycosylation type IA. *Hum Mutat* 2009; 30: 795–803.
29. Imrie J, Dasgupta S, Besley GTN et al. The natural history of Niemann–Pick disease type C in the UK. *J Inher Metab Dis* 2007; 30: 51–59.

Molecular analysis of 30 NPC patients

30. Fancello T, Dardis A, Rosano C et al. Molecular analysis of NPC1 and NPC2 gene in 34 Niemann–Pick C Italian Patients: identification and structural modeling of novel mutations. *Neurogenetics* 2009; 10: 229–239.
31. Inacio A, Silva AL, Pinto J et al. Nonsense mutations in close proximity to the initiation codon fail to trigger full nonsense-mediated mRNA decay. *J Biol Chem* 2004; 279: 32170–32180.
32. Di Leo E, Panico F, Tarugi P et al. A point mutation in the lariat branch point of intron 6 of NPC1 as the cause of abnormal pre-mRNA splicing in Niemann–Pick type C disease. *Hum Mutat* 2004; 24: 440.

RESULTATS ANNEXOS

Després de la publicació d'aquest article, s'han diagnosticat bioquímicament 8 pacients NPC més de diferents orígens, als quals també se'ls hi ha analitzat els gens *NPC1* i *NPC2*. Els resultats d'aquesta cerca mutacional es mostren a la següent taula, conjuntament amb els fenotips clínic i bioquímic.

Taula 5. Fenotip clínic, fenotip bioquímic i genotip dels últims pacients NPC diagnosticats.

Pacient	Origen	Fenotip clínic	Fenotip bioquímic	Canvi de nucleòtid (al·lel 1)	Canvi d'aminoàcid (al·lel 1)	Canvi de nucleòtid (al·lel 2)	Canvi d'aminoàcid (al·lel 2)
<i>NPC66</i>	Espanyol	J	C	c.346C>T	p.R116X	c.3493G>A	p.V1165M
<i>NPC67</i>	Espanyol	EI	C	c.2224G>A	p.E742K	c.2324A>C	p.Q775P
<i>NPC68</i>	Espanyol	A	NG	c.1300C>G	p.P474A	c.3019C>G	p.P1007A
<i>NPC69</i>	Espanyol	A	C	c.2324A>C	p.Q775P	c.3289G>A	p.D1097N
<i>NPC70</i>	Espanyol	LI	C	c.352_353delAG	p.Q119VfsX8	c.530G>A	p.C177Y
<i>NPC71</i>	Espanyol	EI	C	c.3175C>T	p.R1059X	c.3175C>T	p.R1059X
<i>NPC72</i>	Marroquí	N	C	c.3746G>A	p.S1249N	c.3746G>A	p.S1249N
<i>NPC73</i>	Espanyol	?	V	c.1552C>T	p.R518W	c.2974G>T	p.G992W

N: neonatal; EI: infantil precoç; LI: infantil tardà; J: juvenil; A: adult; C: clàssic; V: variant; NG: filipina negativa; ?: informació no disponible.

CAPÍTOL II. LA MALALTIA DE NIEMANN-PICK TIPUS C

Article 3: Anàlisi del mecanisme de *nonsense-mediated mRNA decay* a la malaltia de Niemann-Pick tipus C

Referència: Macías-Vidal J, Gort L, Lluch M, Pineda M, Coll MJ. Nonsense-mediated mRNA decay process in nine alleles of Niemann-Pick type C patients from Spain. *Mol Genet Metab.* 2009; 97(1):60-4.

RESUM

El treball que ocupa aquest article es basa en l'anàlisi de 9 mutacions del gen *NPC1* que generen un codó de terminació prematur (p.R116X, p.Q119VfsX8, p.W260X, p.S425X, p.A558GfsX12, p.Q775X, p.G993EfsX4, p.R1059X i p.I1061NfsX4), amb la finalitat de determinar si els seus mRNAs es veuen afectats pel mecanisme de NMD. Per assolir aquest objectiu, s'han comparat els fibroblasts sense tractar i tractats amb cicloheximida de pacients portadors d'aquests al·lels emprant la PCR convencional i la PCR a temps real.

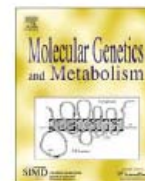
Els resultats obtinguts amb la PCR convencional mostraven, en el cas dels fibroblasts no tractats, una reducció de la quantitat del mRNA de *NPC1* en tots els pacients respecte el control. Després del tractament amb cicloheximida, una recuperació del mRNA va ser detectada però no en tots els al·lels. Tanmateix, quan es va emprar la PCR a temps real, la recuperació va ser observada fins i tot en aquells al·lels que qualitativament no mostraven un increment aparent del nivell de mRNA.

En conclusió, es confirma que el procés de NMD és el responsable de la degradació del mRNA en tots els al·lels de *NPC1* analitzats que codifiquen per mutacions que originen un PTC.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Genetics and Metabolism

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymgme

Nonsense-mediated mRNA decay process in nine alleles of Niemann-Pick type C patients from Spain

Judit Macías-Vidal^{a,c}, Laura Gort^{a,c}, Montse Lluch^{a,c}, Mercè Pineda^{b,c}, Maria Josep Coll^{a,c,*}

^a Institut de Bioquímica Clínica, Hospital Clínic, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, C/Mejía Lequerica s/n, Ed. Helios III Planta baixa, 08028 Barcelona, Spain

^b Departament de Neurologia, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

^c CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 November 2008

Received in revised form 14 January 2009

Accepted 14 January 2009

Available online 14 February 2009

Keywords:

Niemann-Pick type C disease

Lysosomal storage disease

NPC1 gene

Nonsense-mediated mRNA decay, NMD

Real-time PCR

ABSTRACT

Mutations in *NPC1* or *NPC2* genes are responsible of Niemann-Pick type C disease (OMIM #257220), an autosomal recessive neurodegenerative lysosomal storage disorder caused by a non-regulation of intracellular lipid trafficking.

Alterations such as nonsense or frame shift mutations generate a premature termination-codon (PTC). Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) is a natural cellular process that degrades mRNAs that encode a prematurely truncated protein.

In this study we have analyzed 9 *NPC1* mutations which generate a PTC (p.R116X, p.Q119VfsX8, p.W260X, p.S425X, p.A558GfsX12, p.Q775X, p.G993EfsX4, p.R1059X and p.I1061NfsX4), in order to determine if their mRNAs suffer NMD process. To achieve this objective we compared fibroblasts of patients carrying these alleles with and without cycloheximide (CHX) treatment using conventional PCR and real-time PCR.

The results of conventional PCR of untreated fibroblasts showed a reduction of the amount of *NPC1* mRNA compared to control in all patients. After CHX-treatment, a recovery of mRNA was detected but not in all the alleles. However, when real-time PCR was used, the recovery was observed including those alleles that qualitatively showed no apparent increase in mRNA level. In conclusion, we confirmed that NMD process is responsible for the mRNA decay for all the analyzed *NPC1* PTC-encoding mutations.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Mutations in the *NPC1* (RefSeq NM_000271.3) [1] (95%) and *NPC2* (RefSeq NM_006432.3) [1] (5%) genes are responsible for Niemann-Pick type C disease (OMIM #257220) [2], a neurodegenerative autosomal recessive lysosomal disorder. Over 270 different mutations have been described worldwide in *NPC1* gene [3], which is located in 18q11-q12 chromosome [4]. It spans 47 Kb, has 25 exons and encodes a *NPC1* transmembrane protein composed by 1278 amino acids. Although most of the pathogenic described alterations are missense, other types of mutations, which generate a premature termination-codon (PTC) such as nonsense and frame shift, have also been reported. It is known that these kinds of mutations may cause mRNA degradation by a post-transcriptional mechanism called nonsense-mediated mRNA decay (NMD). NMD is used by eukaryotic cells to control the quality of the mRNA in order

to prevent the expansion of truncated polypeptides [5]. It has been described that NMD process takes place when PTC occurs more than 50–55 nucleotides upstream of the 3'-most exon-exon junction [6]. The protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX) is known to suppress NMD [7] and therefore, is used as proof of NMD pathway involvement.

In this study, we wanted to determine whether NMD mechanism affected the stability of *NPC1* mRNAs bearing a PTC. For this purpose, we performed the analysis of 9 selected nonsense or frame shift *NPC1* mutations. We analyzed and compared the results obtained using conventional PCR and real-time PCR.

Materials and methods

Patients and controls

Samples were obtained from 11 unrelated patients. All of them are of Spanish origin except two patients, one Moroccan (NPC41) and one Portuguese (NPC42). Diagnosis of NPC disease was determined by cytochemical demonstration of pathologically enriched cholesterol via filipin staining [8].

* Corresponding author. Address: Institut de Bioquímica Clínica, Hospital Clínic, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, C/Mejía Lequerica s/n, Ed. Helios III Planta baixa, 08028 Barcelona, Spain. Fax: +34 93 2275668.

E-mail address: mjcoll@clinic.ub.es (M.J. Coll).

The control group consisted of four samples from non-related wild-type subjects. To perform the experiments, we prepared a pool of control cDNAs.

Cell culture

Fibroblasts from skin biopsies of control individuals and patients were cultured in monolayer at 37 °C under 5% CO₂ conditions in T75 flasks with MEM medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) containing 12% newborn calf serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), penicillin and streptomycin.

Analysis of NMD

To determine whether any observed reduction of the mutant transcript was due to NMD, cells were subdivided into two cultures. One of these was treated with cycloheximide (CHX) (Sigma, St. Louis, MO, USA) added to the medium at a concentration of 500 µg/ml and the other was untreated. After 6 h of incubation, fibroblasts were harvested after trypsin treatment [9].

RNA extraction and reverse transcription-PCR

Total RNA was extracted from patient and control fibroblasts using suitable kits (Qiagen, Hilden, Germany). Single-stranded cDNA was obtained using oligo-dT primers and M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutant (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol.

Conventional PCR

NPC1 and *Cyclophilin A* cDNA were amplified using 100 ng of cDNA, 20 µM each of the self-designed specific primers and 1 U of Taq DNA Polymerase (Roche, Mannheim, Germany). Primer sequences for the *NPC1* fragment (514 bp) were: *NPC1* forward 5'-CTGCAGTCATCATGTGTGCCACCA-3' and *NPC1* reverse 5'-ACCGACCCCTTAGACACAGTTCAGTCAG-3'. Primers used to amplify the *PPIA* fragment (138 bp) were provided by Pre-Developed TaqMan Assay Reagent for *PPIA* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The PCR conditions were 45 s at 94 °C, 1 min at 64 °C, 1 min at 72 °C for 35 cycles. The amplified products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gel.

Real-time PCR

Quantitative real-time PCR experiments were performed using the StepOnePlus real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All PCR reactions, with a final volume of 10 µl, were run in triplicate and contained 100 ng of cDNA. *NPC1* (target gene) and the endogenous controls *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase), *PPIA* (Cyclophilin A) and *β2M* (β-2-Microglobulin) (housekeeping genes) were run in separate wells. The reagents were TaqMan Gene Expression Master Mix, Human *NPC1* TaqMan Gene Expression Assay (Hs00975249_m1) and Pre-Developed TaqMan Assay Reagents for *GAPDH*, *PPIA* and *β2M* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR conditions were 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, then 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. The runs were monitored via the StepOne Software v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Levels of cDNA were relatively quantified by evaluating C_t values according to the Comparative C_t (ΔΔC_t) method (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Results

Table 1 reports *NPC1* gene mutations of the 11 unrelated patients of the present study. Among the identified changes, there

are 3 novel mutations (p.G535V (c.1604G>T), p.Q775X (c.2323C>T) and p.I1061NfsX4 (c.3181dupA)) and 11 previously described, 6 of which by our group [10].

The suspicion that NMD could degrade the mRNA encoded by these mutations was given by NPC20 patient. In this case, p.I1061T mutation was found in homozygosis in the cDNA, while actually, this mutation was observed in heterozygosis together with p.G993EfsX4 mutation in genomic DNA. The cDNA sequence analysis of CHX-treated fibroblasts confirmed the loss of the p.G993EfsX4-bearing mRNA by the NMD cellular process (data not shown).

In all studied patients, at least one of the alleles carries a mutation which creates a PTC (p.R116X (c.346C>T), p.Q119VfsX8 (c.352_353delAG), p.W260X (c.780G>A), p.S425X (c.1274C>A), p.A558GfsX12 (c.1672dupG), p.Q775X (c.2323C>T), p.G993EfsX4 (c.2978delG), p.R1059X (c.3175C>T) and p.I1061NfsX4 (c.3181dupA)). All of them follow the NMD-rules suggested for this process [17].

To determine whether the transcripts encoded by these mutations were targeted by the NMD process, we analyzed the level of the different PTC-bearing mRNAs by conventional PCR (qualitative) and real-time PCR (quantitative) before and after cycloheximide (CHX) treatment.

Fig. 1A shows the NMD analysis of 11 patients and control individuals by conventional PCR. We observed that there were differences between untreated and CHX-treated control samples, probably due to the rescue of other mRNAs encoded by alternative spliced transcripts of *NPC1* gene [15]. When fibroblasts cultures of homozygous patients (NPC14, NPC17, NPC35, NPC41 and NPC42) were untreated (0 h) a clear decay of the *NPC1* cDNA was observed. The same phenomenon was seen in the case of untreated fibroblasts culture of NPC20 heterozygous compound for p.G993EfsX4 mutation. The rest of heterozygous patients (NPC11, NPC22, NPC26, NPC28 and NPC43) only showed a slight reduction in the intensity of *NPC1* band. After CHX-treatment (6 h), important recoveries in the *NPC1* cDNA levels were observed for the homozygous (NPC14, NPC17, NPC41 and NPC42) and NPC20 heterozygous patients. Only slight recovery was showed for NPC22, while no obvious changes were observed for the rest of the heterozygous patients (NPC11, NPC26, NPC28 and NPC43) and the homozygous NPC35.

In order to confirm the qualitative results, we quantified the differences at the cDNA level of each NPC patient with respect to *PPIA*, *GAPDH* and *β2M* genes by real-time PCR. *GAPDH* and *β2M* genes showed significant differences in C_t values between the control samples tested (data not shown) and they were discarded as endogenous controls.

Fig. 1B shows relative quantification (RQ) of the *NPC1* cDNA normalized to *PPIA* cDNA levels (endogenous control) for the different patients using the Comparative C_t (ΔΔC_t) method. The control samples (untreated and CHX-treated) were set as the reference value (100%). When untreated, samples from homozygous patients showed very low mRNA levels, ranging from 94% (RQ NPC41 = 5.97) to 74% (RQ NPC35 = 26.00) reduction respect to control. With regard to heterozygous patients, in all cases decay of mRNA was also observed, ranging from 61% (RQ NPC20 = 38.66) to 20% (RQ NPC26 = 80.18). After CHX-treatment, the five homozygous patients (NPC14, NPC17, NPC35, NPC41 and NPC42) increased the cDNA levels between 2.4 (NPC14) and 8.2 (NPC41) times compared to untreated samples, but still the cDNA levels were around 50% of those observed in treated control sample. Concerning heterozygous patients, all them presented recoveries between 1.3 (NPC22) and 2.2 (NPC11) times in comparison with untreated samples, reaching similar cDNA levels as treated control. Exceptions were patients NPC20 and NPC26. In the case of NPC20, it showed low percentage of recovery in relation to untreated sample, sur-

Table 1
Clinical phenotype and genotype of the studied NPC patients.

Patient ^a	Clinical phenotype ^b	Nucleotide change ^c (allele 1)	Amino acid change (allele 1)	Nucleotide change ^c (allele 2)	Amino acid change (allele 2)	Reference ^d
NPC11	Late infantile	c.3175C>T	p.R1059X	c.2594C>T	p.S865L	[10]; [10]
NPC14	Severe infantile	c.1672dupG	p.A558GfsX12	c.1672dupG	p.A558GfsX12	[10]
NPC17	Severe infantile	c.2978delG	p.G993EfsX4	c.2978delG	p.G993EfsX4	[10]
NPC20	Late infantile	c.2978delG	p.G993EfsX4	c.3182T>C	p.I1061T	[10]; [11]
NPC22	Late infantile	c.780G>A	p.W260X	c.3182T>C	p.I1061T	[10]; [11]
NPC26	Juvenile	c.1274C>A	p.S425X	c.1421C>T	p.P474L	[10]; [12]
NPC28	Severe infantile	c.346C>T	p.R116X	c.2324A>C	p.Q775P	[13]; [14]
NPC35	Neonatal	c.3175C>T	p.R1059X	c.3175C>T	p.R1059X	[10]
NPC41	Severe infantile	c.3181dupA	p.I1061NfsX4	c.3181dupA	p.I1061NfsX4	Novel mutation
NPC42	Unknown	c.352_353delAG	p.Q119VfsX8	c.352_353delAG	p.Q119VfsX8	[15]
NPC43	Severe infantile	c.2323C>T	p.Q775X	c.1604G>T	p.G535V	Novel mutations

^a Patients NPC11 to NPC35 were previously reported in Fernández-Valero et al. 2005 [10].

^b Clinical phenotype attending to the first neurological symptoms.

^c Nomenclature according to den Dunnen and Antonarakis 2000 [16]. The A of the ATG of the initiator Met codon in cDNA is denoted nucleotide +1.

^d For described mutations only the first citations are given.

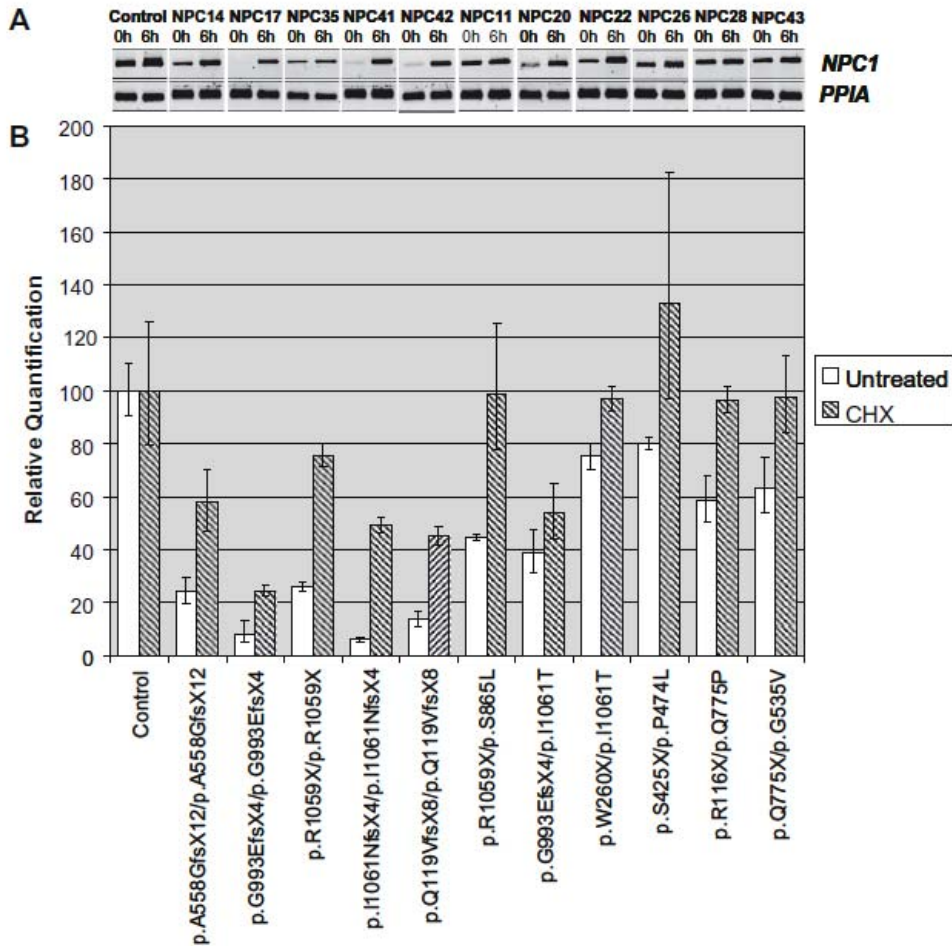


Fig. 1. NMD analysis in fibroblasts from NPC disease patients. (A) Conventional PCR: Fibroblasts from the different patients untreated (0 h) or treated with CHX (6 h) were processed. NPC1 and PPIA cDNA PCR products (514 bp and 138 bp, respectively), were separated on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. NPC patients are arranged first according to their genotypes (homozygous and heterozygous compounds) and second according to their numeration. (B) Real-time PCR: Relative Quantification of the NPC1 cDNA using the comparative C_t method. Relative NPC1 cDNA levels were normalized to PPIA cDNA levels (endogenous control). Pool of control cDNAs (n = 4) showed an untreated control range = [0.524–1.504] and a CHX-treated control range = [0.428–1.853]. Error bars represent standard deviations (patients n = 3 and control n = 6).

prisingly in disagreement with the qualitative observation. Patient NPC26 showed analogous recovery as the other heterozygous pa-

tients, but in this case, final cDNA level of treated fibroblasts was higher than those of control (133%).

Discussion

In mammals, the process of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) is a quality-control mechanism to degrade mRNA harboring a premature termination-codon to prevent the synthesis of truncated proteins [5].

Here, we have presented 11 unrelated NPC patients, all of them bearing at least one PTC-encoding mutation in their *NPC1* gene.

From the series presented, we have described 3 novel mutations, two generating PTC (p.Q775X and p.I1061NfsX4) and one novel missense change (p.G535V). This last mutation is probably a pathogenic mutation due to the fact that it was not observed in 100 normal control alleles; after sequencing all genomic DNA no other mutations have been detected; the affected amino acid residue is conserved throughout species, and functional effect prediction programs as PolyPhen [18] or Panther [19] confirmed the possible pathogenesis of this novel change. Moreover, NPC43 patient's fibroblasts with p.G535V mutation associated with a nonsense mutation (p.Q775X) was studied by western blot, using a polyclonal NPC1 antibody raised against 19 amino acid residues (1256–1274) peptide located in the C-terminus of the human NPC1 protein [14]. No detectable protein was found in this patient in contrast to control fibroblasts (data not shown).

In this study, we were able to detect *NPC1* mRNA decay and its recovery after CHX-treatment of most of the studied alleles by conventional PCR (Fig. 1A). But it was essential to quantify mRNA by real-time PCR to observe recovery in all the alleles, including those that first qualitatively showed no apparent differences (p.R116X, p.S425X, p.Q775X and p.R1059X mutations) (Fig. 1B). We confirmed that NMD process is responsible for the mRNA decay for all here analyzed *NPC1* PTC-encoding mutations, in spite that only partial recoveries after CHX-treatment were detected for p.Q119VfsX8, p.A558GfsX12, p.G993EfsX4, p.R1059X and p.I1061NfsX4 alleles. CHX-treatment is presumed to stop the NMD process, so it makes possible to detect those mRNAs that this cellular mechanism degrades and otherwise would be undetectable.

The fact that after CHX-treatment no notable increase of the mRNA level was detected in patient NPC20 may be due to different factors: It has been suggested mechanistic basis for alternative NMD pathways [20]; the proximity of nonsense mutations to the natural initiation codon may cause the reinitiation phenomenon that may evade the NMD process [21]; this mRNA surveillance system has been reported to be an inherent character of cells and may vary among cells and tissues [22]; Isken and Maquat [23] suggested a delicate balance of metabolic events that can be influenced by different factors; and same authors gave more evidences that UPF and SMG proteins, which were originally discovered to function in NMD, also have roles in other pathways, including specialized pathways of mRNA decay, DNA synthesis and cell-cycle progression, and the maintenance of telomeres. Furthermore, several studies indicate that the post-transcriptional control of gene expression is much more complicated than expected with mRNA metabolism being subject to diverse regulatory mechanisms [24]. All these factors could explain the different recovery rate after CHX-treatment in different PTC mutations that fulfill the NMD-rules.

Our results give further evidence of the important role of the NMD process in the regulation of the cell transcripts, especially in the case of the disease-causing mutations.

Acknowledgements

This research was supported by a Grant from the Fundación Niemann-Pick de España. The authors are grateful to them and also

to all the patients and their families. J. Macías-Vidal is recipient of Juan Girón fellowship from the Spanish Foundation.

We thank all the physicians who referred patients for the study: Dr. Ruiz del Portal (Hospital Virgen del Rocío), Dr. Verdú (Hospital Virgen de la Salud), Dr. Jara (Hospital Universitario La Paz), Dr. Casas (Hospital Virgen de la Arrixaca), Dr. Sánchez Valverde (Hospital Virgen del Camino), Dr. Merino (Hospital Infantil San Rafael) and Dr. García Peñas (Hospital Infantil Universitario Niño Jesús).

We would like to thank Dr. Vanier and Dr. Millat for kindly providing us the polyclonal NPC1 antibody.

We thank also A. Valle and L. Ozaez for their technical assistance.

The CIBER of Enfermedades Raras (CIBERER) is an initiative of the ISCIII.

References

- Genbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>.
- OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM>.
- HGMD (Human Gene Mutation Database), <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.
- E.D. Carstén, J.A. Morris, K.G. Coleman, S.K. Loftus, D. Zhang, C. Cummings, J. Gu, M.A. Rosenfeld, W.J. Pavan, D.B. Krizman, J. Nagle, M.H. Polymeropoulos, S.L. Sturley, Y.A. Ioannou, M.E. Higgins, M. Comly, A. Cooney, A. Brown, C.R. Kaneski, E.J. Blanchette-Mackie, N.K. Dwyer, E.B. Neufeld, T.Y. Chang, L. Liscum, J.F. Strauss 3rd, K. Ohno, M. Zeigler, R. Carmi, J. Sokol, D. Markie, R.R. O'Neill, O.P. van Diggelen, M. Elleder, M.C. Patterson, R.O. Brady, M.T. Vanier, P.G. Pentchev, D.A. Tagle, Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis, *Science* 277 (1997) 228–231.
- L.E. Maquat, When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells, *RNA* 1 (1995) 453–465.
- E. Nagy, L.E. Maquat, A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance, *Trends Biochem. Sci.* 23 (1998) 198–199.
- M.S. Carter, J. Doskow, P. Morris, S. Li, R.P. Nhim, S. Sandstedt, M.F. Wilkinson, A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 28995–29003.
- M.T. Vanier, C. Rodriguez-Lafresse, R. Rousson, N. Gazzah, M.C. Juge, P.G. Pentchev, A. Revol, P. Louisot, Type C Niemann-Pick disease: spectrum of phenotypic variation in disruption of intracellular LDL-derived cholesterol processing, *Biochim. Biophys. Acta.* 1096 (1991) 328–337.
- L. Gort, J. Duque, J.M. Fabeiro, A. Zulaica, M.J. Coll, A. Chabás, Molecular analysis in two β -mannosidosis patients: description of a new adult case, *Mol. Genet. Metab.* 89 (2006) 398–400.
- E.M. Fernández-Valero, A. Ballart, C. Iturriaga, M. Lluch, J. Macías, M.T. Vanier, M. Pineda, M.J. Coll, Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: genotype-phenotype correlations, *Clin. Genet.* 68 (2005) 245–254.
- G. Millat, C. Marçais, M.A. Rafi, T. Yamamoto, J.A. Morris, P.G. Pentchev, K. Ohno, D.A. Wenger, M.T. Vanier, Niemann-Pick C1 disease: the I1061T substitution is a frequent mutant allele in patients of Western European descent and correlates with a classic juvenile phenotype, *Am. J. Hum. Genet.* 65 (1999) 1321–1329.
- P. Tarugi, G. Ballarini, B. Bembì, C. Battisti, S. Palmeri, F. Panzani, E. Di Leo, C. Martini, A. Federico, S. Calandra, Niemann-Pick type C disease: mutations of NPC1 gene and evidence of abnormal expression of some mutant alleles in fibroblasts, *J. Lipid Res.* 43 (2002) 1908–1919.
- W.E. Kaminski, H.H. Klünemann, B. Ibach, C. Aslanidis, H.E. Klein, G. Schmitz, Identification of novel mutations in the NPC1 gene in German patients with Niemann-Pick C disease, *J. Inher. Metab. Dis.* 25 (2002) 385–389.
- G. Millat, C. Marçais, C. Tomasetto, K. Chikh, A.H. Fensom, K. Harzer, D.A. Wenger, K. Ohno, M.T. Vanier, Niemann-Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop, *Am. J. Hum. Genet.* 68 (2001) 1373–1385.
- T. Yamamoto, E. Namba, H. Ninomiya, K. Higaki, M. Taniguchi, H. Zhang, S. Akaboshi, Y. Watanabe, T. Takeshima, K. Inui, S. Okada, A. Tanaka, N. Sakuragawa, G. Millat, M.T. Vanier, J.A. Morris, P.G. Pentchev, K. Ohno, NPC1 gene mutations in Japanese patients with Niemann-Pick disease type C, *Hum. Genet.* 105 (1999) 10–16.
- J.T. den Dunnen, S.E. Antonarakis, Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion, *Hum. Mutat.* 15 (2000) 7–12.
- L.E. Maquat, Nonsense-mediated mRNA decay, *Curr. Biol.* 12 (2002) 196–197.
- PolyPhen: prediction of functional effect of human nsSNPs, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>.
- PANTHER classification system, <http://www.pantherdb.org/>.

- [20] P.V. Ivanov, N.H. Gehring, J.B. Kunz, M.W. Hentze, A.E. Kulozik, Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways, *EMBO J.* 27 (2008) 736–747.
- [21] A. Inacio, A.L. Silva, J. Pinto, X.J. Ji, A. Morgado, F. Almeida, P. Faustino, J. Lavinha, S.A. Liebhaber, L. Romao, Nonsense mutations in close proximity to the initiation codon fail to trigger full nonsense-mediated mRNA decay, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 32170–32180.
- [22] L. Linde, S. Boelz, G. Neu-Yilik, A.E. Kulozik, B. Kerem, The efficiency of nonsense-mediated mRNA decay is an inherent character and varies among different cells, *Eur. J. Hum. Genet.* 15 (2007) 1156–1162.
- [23] O. Isken, L.E. Maquat, The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation, *Nat. rev. genet.* 9 (2008) 699–712.
- [24] M.J. Moore, From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs, *Science* 309 (2005) 1514–1518.

CAPÍTOL II. LA MALALTIA DE NIEMANN-PICK TIPUS C

Article 4: Anàlisi del mecanisme de degradació proteasòmica a la malaltia de Niemann-Pick tipus C

Referència: Macías-Vidal J, Girós M, Bachs O, Coll MJ. Proteasomal degradation role in missense mutations causing Niemann-Pick type C disease. [Article en preparació].

RESUM

En aquest treball, es descriuen sis línies cel·lulars de NPC que presenten mutacions de canvi de sentit al gen *NPC1* en homozigosi (p.C177Y, p.Q775P, p.A1035V, p.I1061T, p.L1106P i p.R1186H), que mostren nivells disminuïts de la proteïna NPC1. Hem demostrat que en la majoria dels casos, això és conseqüència d'una important reducció de la seva vida mitja.

També mostrem que el tractament de les cèl·lules amb inhibidors del proteasoma (ALLN o MG132) reverteix parcialment la pèrdua de la proteïna NPC1, indicant que la degradació de NPC1 per via proteasòmica és la principal causa dels nivells reduïts de proteïna observats en alguns dels fibroblasts NPC.

Un fet interessant que descrivim aquí, és que l' elevat nivell de colesterol observat en moltes línies cel·lulars de NPC, es redueix substancialment després de tractar les cèl·lules amb inhibidors del proteasoma. Aquests resultats suggereixen que incrementant l'estabilitat de la proteïna NPC1, mitjançant l'ús d'inhibidors del proteasoma, es reestableix la seva funcionalitat, fet que podria representar una aproximació terapèutica per a futurs tractaments de la malaltia de NPC causada per mutacions de canvi de sentit específiques.

Proteasomal degradation role in missense mutations causing Niemann-Pick type C disease

Judit Macías-Vidal^{a,b,c}, Marisa Girós^{a,b,c}, Oriol Bachs^{c,d} and Maria Josep Coll^{a,b,c}

^aSecció d'Errors Congènits del Metabolisme (IBC), Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

^bCIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain

^cIDIBAPS, Barcelona, Spain

^dDepartament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Corresponding author:

Maria Josep Coll

Secció d'Errors Congènits del Metabolisme (IBC),

Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic

C/Mejía Lequerica s/n, Edifici Helios III Planta baixa

08028 Barcelona, Spain

Phone: +34932279341

Fax: +34932275668

e-mail: mjcoll@clinic.ub.es

Abstract

Niemann-Pick disease type C (NPC) is a complex lysosomal storage disorder caused in 95% of cases by mutations in the *NPC1* gene. NPC is characterized, at the cellular level, by the storage of multiple lipids, defective lysosomal calcium homeostasis and trafficking defects. Most of the pathogenic NPC1 mutations are missense changes. It is known that this type of mutations may cause reduced NPC1 protein levels. However, not much information about the effect of these mutations on the function and the stability of NPC1 protein has been reported. An exception is the evidence that NPC1 protein harbouring the p.I1061T mutation is degraded via ubiquitin-proteasome due to protein misfolding. In this study, we report that six NPC cell lines harbouring missense homozygous NPC1 mutations (p.C177Y, p.Q775P, p.A1035V, p.I1061T, p.L1106P and p.R1186H) showed decreased levels of the NPC1 protein. We have demonstrated that in most of the cases this is a consequence of significant reduction of its half life. We also report that treatment of the cells with proteasome inhibitors (ALLN or MG132) partially reverses the NPC1 decrease, indicating that degradation of NPC1 via proteasome is the main cause of the reduced NPC1 levels observed in NPC fibroblasts. Interestingly, we report here that the high increase of cholesterol levels, observed in most of the NPC cells, is substantially reduced after the treatment of cells with proteasome inhibitors. These results suggest that enhancing the NPC1 protein stability by using proteasome inhibitors restores its functionality and might represent a therapeutical approach for future treatments of NPC disease caused by specific missense mutations.

Keywords

Niemann-Pick type C disease; NPC1 protein; Proteasome inhibitors

Abbreviations

ALLN: N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal

CHX: cycloheximide

ER: endoplasmic reticulum

ERAD: endoplasmic reticulum-associated degradation

LDL: low-density lipoprotein

LPDS: lipoprotein deficient serum

MG132: carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal

NPC: Niemann-Pick disease type C

$t_{1/2}$: half-life

WB: western blot

1. Introduction

Niemann-Pick disease type C (NPC) (OMIM #257220) [1] is an autosomal recessive lipid storage disorder. The clinical manifestations are characterized by the presence of hepatosplenomegaly and severe progressive neurological dysfunction with varying age at onset and later course [2].

The *NPC1* gene (MIM 607623), mutated in 95% of NPC families, is located in 18q11-q12 chromosome and encodes a transmembrane protein of the endocytic pathway that mainly localizes in the late endosomal compartment [3]. The NPC1 protein is a key participant in intracellular sterol trafficking. Cells harbouring inactivating mutations in NPC1 exhibit marked impairment of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol esterification and mobilization of newly hydrolyzed LDL cholesterol to the plasma membrane [4].

Over 300 different disease-causing mutations have been reported worldwide in *NPC1* gene [5]. Previous studies have shown that some cells harbouring missense NPC1 mutations exhibit lower levels of NPC1 protein as compared with wild type cells [6, 7]. Moreover, a recent observation shows that NPC1 p.I1061T mutant encodes a functional protein which is targeted for proteasomal degradation due to protein misfolding [8].

In this report, we examine the stability of different NPC1 mutant proteins and provide evidence that some of these mutants are degraded via proteasome. In some cases the proteasome inhibitors ALLN and MG132 partially reverse NPC1 loss. We also observed that these restored mutant proteins are able to significantly reduce soluble cholesterol levels, thus recovering part of their functionality.

2. Patients and methods

2.1. Patients

Samples were obtained from 18 unrelated patients. All of them are of Spanish origin except one Cost Rican (NPC45), one Ecuadorian (NPC47) and two Moroccan patients (NPC64 and NPC65). Diagnosis of NPC disease was determined by cytochemical demonstration of pathologically enriched cholesterol via filipin staining as described [9]. The patients' molecular analysis and clinical phenotype had been previously reported by our group (Supplemental Table S1) [10, 11].

2.2. Cell culture

Fibroblasts from skin biopsies of control individuals and patients were cultured in monolayer at 37°C under 5% CO₂ conditions in MEM medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with 12% LPDS for 5 days and after supplemented with 10% newborn calf serum for 16 h (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

2.3. Reagents

Cycloheximide (CHX) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used at 100 µg/ml final concentration. The proteasome inhibitors were used at 100 µM for ALLN (Calbiochem, Merck Chemicals LTD, Nottingham, UK) and 50 µM for MG132 (Calbiochem, Merck Chemicals LTD, Nottingham, UK).

2.4. Quantification of human NPC1 gene expression

Total RNA was extracted from patients and control fibroblasts using suitable kits (Qiagen, Hilden, Germany). Single-stranded cDNA was obtained using oligo-dT primers and M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutant (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol.

The control group consisted of four samples from non-related wild type subjects. To perform the experiments, we prepared a pool of control cDNAs.

Quantitative real-time PCR experiments were performed as previously described [12]. Levels of cDNA were relatively quantified by evaluating C_t values according to the Comparative C_t ($\Delta\Delta C_t$) method (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.5. Western blotting

Western blot (WB) analysis was performed as previously described [7], using a NPC1 rabbit antibody raised against a peptide corresponding to a 19 amino acid residues (1256-1274) peptide in the C-terminus of human NPC1 [6] and a mouse anti-human actin antibody (MP Biomedicals, Solon, OH,

USA) with the corresponding HRP conjugated secondary antibody (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Secondary antibodies were detected with chemiluminiscent reagent ECL (Biological Industries, Beit Haemek, Israel). NPC1 signal was determined by densitometry using ImageJ software (McMaster Biophotonics Facility, Hamilton, ON, USA) and normalized to actin levels in CHX-treated samples.

2.6. Cholesterol quantification

Cell fractions were obtained from sonicated cell homogenate after ultracentrifugation at 80000 g for 1 h, which assure separation of cholesterol associated with cellular membranes to the soluble cholesterol (cholesterol arise from organelle inside). For cholesterol analysis, the two fractions were subjected to alkaline extraction and analyzed by capillary gas-liquid chromatography in a 7890 Agilent gas chromatograph provided with a FID detector. Sterols were detected as trimethyl-silyl derivatives (BSTFA 1% / TMCS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in pyridine for 30 min at 60°C) and isolated in a semi polar capillary column, DB1701 column (S&W Scientific, CA, USA), using epicoprostanol as internal standard. Identity and quantification of cholesterol signal was verified with the appropriate standard (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Helium was used as carrier gas and the temperature gradient was 250°C for 1 min, 250 to 280°C at 3°C/min and 280°C for 20 min. Temperature detector 280°C and injector 250°C split mode.

2.7. Mutation nomenclature

All mutations were described according to the recommended nomenclature [13]. Gene nucleotide numbering was according to the Genbank [14] sequence NM_000271.3, with +1 as A of the start codon. The ATG codon represents +1 for the amino acid numbering according to NPC1 protein sequence NP_000262.1.

3. Results

3.1. *NPC1* expression in fibroblasts from NPC patients

The expression of NPC1 protein was determined by WB in fibroblasts from eighteen NPC patients harbouring missense mutations in homozygosis or associated with a frame shifting mutation. As shown in Fig. 1A and B, seven samples from NPC patients wearing: p.G535V (c.1604G>T), p.Q775P (c.2324A>C), p.Y871C (c.2612A>G), p.D944N (c.2830G>A), p.T1066N (c.3197C>A), p.F1079S (c.3236T>C) or p.L1106P (c.3317T>C) mutations did not show any detectable NPC1 signal. Furthermore, eight mutant cell lines harbouring: p.C177Y (c.530G>A), p.K576R (c.1727A>G), p.G992W (c.2974G>T), p.P1007A (c.3019C>G), p.A1035V (c.3104C>T), p.I1061T (c.3182C>T), p.R1186H (c.3557G>A) or p.F1224L (c.3672C>G) mutations presented decreased amounts of the protein, whereas three samples with: p.P474L (c.1421C>T), p.S734I (c.2201G>T) or p.S865L (c.2594C>T) mutations showed NPC1 levels similar to those observed in control fibroblasts.

To determine whether the decreased levels of NPC1 protein correlated with a reduction in the levels of their mRNAs, we analyzed, by quantitative PCR, the levels of *NPC1* mRNA in seven of the eighteen samples of fibroblasts from the NPC patients mentioned above. As it can be observed in Fig. 2, in only one case (p.T1066N) the sample showed levels of *NPC1* mRNA significantly lower than control. This is because this patient harbours a whole *NPC1* gene deletion in one allele. In contrast, in all the other cases the mRNA levels were similar (fold-change 0.9 for p.C177Y) or higher (fold-change between 1.3 and 2.3, in the remaining samples) than control fibroblasts. These results suggested that in most of the cases the decreased levels of NPC1 protein in these fibroblasts could be due to alterations in translation or in protein stability.

3.2. *The stability of the NPC1 protein is impaired in NPC patients harbouring missense mutations*

We aimed to analyze whether the observed decrease of NPC1 protein in the fibroblasts from different NPC patients was due to an increased degradation of the protein. Thus, we measured the NPC1 protein levels at different times after treatment with the protein synthesis inhibitor, CHX. Specifically, a time

course analysis over 16 h was performed in control and six different fibroblast samples from NPC patients.

Results revealed that wild type NPC1 protein is highly stable with a half-life ($t_{1/2}$) higher than 16 h. In contrast, the $t_{1/2}$ of NPC1 from four of the mutant cell lines was significantly decreased. Specifically, the $t_{1/2}$ values were: <2h for p.Q775P (Fig. 3C); <6h for p.A1035V (Fig. 3D); <8h for p.T1066N (Fig. 3F); and <16h for p.I1061T (Fig. 3E). All these cell lines display no NPC1 signal or decreased amounts of this protein (as observed by WB in Fig. 1). Fibroblasts harbouring the p.S734I mutation that did not show a decrease in the NPC1 levels have a $t_{1/2}$ similar to control cells (Fig. 3B). Finally, we observed that p.C177Y cells showed reduced levels of NPC1 protein (Fig. 1A) whereas in contrast the NPC1 $t_{1/2}$ was similar to that of the wild type protein (Fig. 3A). This result suggests that in this case, the decreased levels of NPC1 protein could be due to alterations in translation, a possibility that still remains to be explored.

3.3. The NPC1 missense mutant proteins are degraded via proteasome

We next analyzed whether NPC1 degradation in fibroblasts from NPC patients was carried out via proteasome. Thus, we studied this possibility by trying to block or to minimize NPC1 degradation by treating cells with proteasome inhibitors. Specifically, fibroblasts from control and from different NPC patients were treated for 16 h with ALLN (100 μ M) or MG132 (50 μ M). Then, samples were collected and the amount of NPC1 was determined by WB in both, treated and untreated cells. Results revealed that in most of the cases both drugs suppressed NPC1 degradation, although at different degrees. As shown in Fig. 4A, in the presence of ALLN or MG132, control cells significantly increased the levels of NPC1 protein. Results also indicate that five of the mutant cell lines significantly increased NPC1 levels after treatment with both proteasome inhibitors. These cells lines are: p.C177Y, p.Q775P, p.A1035V, p.I1061T and p.L1106P (Fig. 4B). In contrast, we observed that the treatment with proteasome inhibitors had almost no effect on the NPC1 protein levels in two NPC cell lines, p.T1066N and p.R1186H, that display significant reductions of this protein (Fig. 4C). Finally, the mutant cell line p.S734I that shows NPC1 protein levels similar to control cells also responds to proteasome inhibitors

by increasing the amount of this protein similarly to control cells (Fig. 4C). All these results indicate that in most of the cases, the decreased levels of NPC1 observed in fibroblasts from NPC patients are produced by increased degradation via proteasome, although in other cases, alternative mechanisms are probably involved.

3.4. Treatment of cells with proteasome inhibitors reduces the accumulation of cholesterol observed in NPC fibroblasts

We next aimed to study whether the increase of NPC1 protein induced by the treatment of fibroblasts with proteasome inhibitors could have as a consequence a reduction in the amount of cholesterol. Thus, soluble cholesterol and cholesterol associated with cellular membranes were measured in control and patients' fibroblasts as described in the material and methods section. As it can be seen in Fig. 5A, the soluble cholesterol levels are significantly increased in all mutant cell lines (p.Q775P, p.A1035V, p.I1061T, p.T1066N, p.L1106P and p.R1186H) as compared with control cells. Specifically, the higher amounts were found in p.Q775P fibroblasts (fold-change 5.5). The mutant cell lines p.A1035V, p.I1061T, p.T1066N and p.L1106P showed intermediate increases (fold-change between 1.9 and 3.3) whereas the lower increase (fold-change 1.5) corresponded to the p.R1186H mutant cell line.

Fig. 5A also shows that after the treatment of cells with proteasome inhibitors, a reduction of soluble cholesterol was observed in all the different NPC cell lines analyzed. We also observed that MG132 was more effective than ALLN in inducing this general reduction of soluble cholesterol (Fig. 5A). Interestingly, in three mutant cell lines (p.A1035V, p.I1061T and p.T1066N), MG132 treatment induced soluble cholesterol reductions ranging from 85% to 65%. In these three cases the cholesterol levels were returned to approximately control values. In other two mutant cell lines, p.Q775P and p.L1106P, the cholesterol reduction promoted by MG132 was more moderated (42% and 50%, respectively). Finally, in the cell line p.R1186H the inhibitor MG132 did not substantially modify the levels of soluble cholesterol whereas ALLN induced a 50% reduction leaving the levels similar to control cells (Fig. 5A). Interestingly, both proteasome inhibitors induced a 35% decrease of soluble cholesterol in control cells.

The measurements of the membrane-associated cholesterol in the NPC fibroblasts revealed that all the mutant cell lines have elevated this type of cholesterol, being the fold-change between 4.6 (p.Q775P) and 1.3 (p.I1061T) (Fig. 5B). The treatment of cells with proteasome inhibitors induced a moderated reduction of the membrane-associated cholesterol (between 10% and 40%). Differently to that observed with soluble cholesterol, in almost all the cases both proteasome inhibitors produced similar effects.

4. Discussion

Since *NPC1* identification in 1997, more than 300 mutations in this gene have been identified being most of them (60%) missense changes [5]. Different studies have been shown that this type of mutations when present in the cells, in homozygosis or in combination with a frame shifting mutation, may cause the absence or reduction of NPC1 protein [6, 7].

Here, we have analyzed the NPC1 protein levels in fibroblasts from seven homozygous NPC patients harbouring different missense mutations (p.C177Y, p.S734I, p.Q775P, p.A1035V, p.I1061T, p.L1106P and p.R1186H) (Fig. 1A) and also in fibroblasts from eleven compound heterozygous NPC patients with a frame shifting mutation (p.P474L, p.G535V, p.K576R, p.S865L, p.Y871C, p.D944N, p.G992W, p.P1007A, p.T1066N, p.F1079S and p.F1224L) (Fig. 1B). Results revealed that in most of the cases (fifteen of eighteen) a total absence or a significant reduction of NPC1 protein was produced.

These results confirm previous data showing the same effect in p.C177Y, p.Q775P, p.A1035V and p.I1061T mutant cell lines [6, 7] and additionally expand this observation to other fibroblast lines from patients harbouring other different mutations. It is worth mentioning, that similarly to the important NPC1 reduction observed in the p.G992W cells, the mutation of the same codon, p.G992R, resulted also in a strong decrease in the NPC1 levels [7]. In agreement with other authors [6, 15], our results show a correlation between the absence of NPC1 protein and the severe clinical phenotypes. All patients in those the absence of NPC1 protein was observed (mutations p.G535V, p.Q775P, p.Y871C, p.D944N, p.T1066N, p.F1079S and p.L1106P), presented the neonatal or the severe infantile clinical forms.

The lack of correlation between the levels of NPC1 protein and their corresponding amounts of mRNA (Fig. 2) suggested that the reduction of NPC1 protein in the mutant fibroblasts could be produced by alterations at the translational level or changes in the stability of the protein. We report here that in most of the cases the reduction of NPC1 protein in mutant fibroblasts is produced by a significant reduction of the half-life of the protein (Fig. 3).

A possible interpretation of these results comes from the evidence that some mutations make protein folding or assembly impossible. Protein misfolding, caused by missense mutations, has been implicated in the pathogenesis of different human diseases [16] such as for instance Gaucher disease [17]. In this disease, mutant proteins resulted in a loss of function. Proteins recognized as misfolded by quality control are degraded through the ubiquitin-proteasome pathway [18]. This process known as endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation (ERAD) ensures that only correctly folded proteins will move out from ER [19]. Interestingly, it has been previously reported that in NPC fibroblasts harbouring the p.I1061T, the NPC1 mutant protein is recognized as misfolded by the ER quality control machinery and degraded by proteasome [8].

Our work supports that misfolded or damaged NPC1 protein is degraded via the ubiquitin-proteasome pathway. Specifically, we provide here evidence that the treatment of mutant cell lines with the proteasome inhibitors ALLN or MG132 partially restored the levels of a number of mutant NPC1 proteins (Fig. 4). Although these data support a role for the proteasome pathway in mutant NPC1 degradation, they do not exclude the possibility that other proteases may also participate in this process, either independent of or cooperatively with the proteasome. Because in several mutants, showing reduced levels of NPC1 protein, the proteasome inhibitors are not able to restore the amount of this protein, it has to be also considered the possibility that missense mutations could also cause alterations in the mechanisms leading to the mRNA translation.

It is well establish that in NPC cells (harbouring NPC1 or NPC2 mutations) cholesterol accumulates within late endosome-lysosome compartment. Due to this accumulation cholesteryl ester formation is retarded and cholesterol homeostasis is disrupted [9]. Sharing this point of view, recent results [20] showed that in the post nuclear fraction isolated from NPC cells, a fraction that contains virtually all

cellular membranes, the level of free cholesterol was also much higher than in control cells. In agreement with this observation, we report here that the levels of cell membrane-associated cholesterol in a number of fibroblast lines from different NPC patients, are significantly increased (Fig. 5B). Additionally, we also report here that soluble cholesterol is also increased in all the cell lines from NPC patients that we have analyzed (Fig. 5A). Moreover, we observed that cholesterol accumulation is more relevant in infantile clinical forms (homozygous patients for p.Q775P and p.A1035V) than in juvenile phenotype (homozygous patient for p.I1061T).

The partial reversion of NPC1 protein levels by treatment with proteasome inhibitors opened the question of whether these “recovered” NPC1 proteins could perform properly their functions. More specifically, the question was whether the restored levels of NPC1 proteins after the treatment with proteasome inhibitors could as a consequence decrease the levels of cholesterol in the cells. We demonstrate here that this is the case and in most of the cell lines the restored amount of NPC1 protein decreased the soluble cholesterol levels to values very close to the normal amount of cholesterol. In conclusion our results provide evidence that proteasomal degradation is a mechanism implicated in NPC pathogenesis and that preventing degradation, by treating the cells with proteasome inhibitors, it is possible to restore the normal levels of soluble cholesterol in the cells. It is worth noting that proteasome inhibitors are rapidly emerging as important new treatment options in cancer [21]. Our findings provide support for a future use of proteasome inhibitors as approaches to treat NPC disease caused by determined missense mutations.

Acknowledgements

This research was financially supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (PI10/0936).

J. Macías-Vidal is recipient of Juan Girón fellowship from the Fundación Niemann-Pick de España.

The authors are grateful to them, all patients and their families.

We thank all the physicians who referred patients for the study: M.R. Cazorla (Hospital de Fuenlabrada, Madrid); J. Dalmau (Hospital Universitari La Fe, Valencia); M. Gil Campos (Hospital Universitario

Reina Sofía, Córdoba); M.S. Pérez Poyato and M. Pineda (Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona); P. Quijada Fraile, E. Martín and M.T. García Silva (Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid); C. Rodríguez Barrionuevo (Complejo Hospitalario Carlos Haya, Málaga); L. Ruiz del Portal (Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla); T. Vallmaña Cucurull (Hospital Arnau de Vilanova, Lleida).

We would like to thank Dr Vanier and Dr Millat for kindly providing us the NPC1 antibody.

The CIBER of Enfermedades Raras (CIBERER) is an initiative of the ISCIII.

References

- [1] OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM>.
- [2] M.T. Vanier, K. Suzuki, Niemann-Pick diseases, in: H.W. Moser (Eds.), *Neurodystrophies and Neurolipidoses: Handbook of Clinical Neurology*, Elsevier Science, Amsterdam, 1996, pp. 133-162.
- [3] M.E. Higgins, J.P. Davies, F.W. Chen, Y.A. Ioannou, Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network, *Mol. Genet. Metab.* 68 (1999) 1-13.
- [4] K.M. Wojtanik, L. Liscum, The transport of low density lipoprotein-derived cholesterol to the plasma membrane is defective in NPC1 cells, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 14850-14856.
- [5] HGMD: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.
- [6] G. Millat, C. Marçais, C. Tomasetto, K. Chikh, A.H. Fensom, K. Harzer, D.A. Wenger, K. Ohno, M.T. Vanier, Niemann-Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop, *Am. J. Hum. Genet.* 68 (2001) 1373-1385.
- [7] I. Ribeiro, A. Marcão, O. Amaral, M.C. Sá Miranda, M.T. Vanier, G. Millat, Niemann-Pick type C disease: NPC1 mutations associated with severe and mild cellular cholesterol trafficking alterations, *Hum. Genet.* 109 (2001) 24-32.
- [8] M.E. Gelsthorpe, N. Baumann, E. Millard, S.E. Gale, S.J. Langmade, J.E. Schaffer, D.S. Ory, Niemann-Pick type C1 I1061T mutant encodes a functional protein that is selected for endoplasmic reticulum-associated degradation due to protein misfolding, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 8229-8236.

- [9] M.T. Vanier, C. Rodriguez-Lafrasse, R. Rousson, N. Gazzah, M.C. Juge, P.G. Pentchev, A. Revol, P. Louisot, Type C Niemann-Pick disease: spectrum of phenotypic variation in disruption of intracellular LDL-derived cholesterol processing, *Biochim. Biophys. Acta.* 1096 (1991) 328-337.
- [10] E.M. Fernández-Valero, A. Ballart, C. Iturriaga, M. Lluch, J. Macias, M.T. Vanier, M. Pineda, M.J. Coll, Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: genotype-phenotype correlations, *Clin. Genet.* 68 (2005) 245-254.
- [11] J. Macías-Vidal, L. Rodríguez-Pascau, G. Sánchez-Ollé, M. Lluch, L. Vilageliu, D. Grinberg, M.J. Coll; Spanish NPC Working Group, Molecular analysis of 30 Niemann-Pick type C patients from Spain, *Clin. Genet.* 80 (2011) 39-49.
- [12] J. Macías-Vidal, L. Gort, M. Lluch, M. Pineda, M.J. Coll, Nonsense-mediated mRNA decay process in nine alleles of Niemann-Pick type C patients from Spain, *Mol. Genet. Metab.* 97 (2009) 60-64.
- [13] J.T. den Dunnen, S.E. Antonarakis, Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion, *Hum. Mutat.* 15 (2000) 7-12 (the updates found at the web page: <http://www.HGVS.org/mutnomen/>).
- [14] Genbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>.
- [15] T. Yamamoto, H. Ninomiya, M. Matsumoto, Y. Ohta, E. Nanba, Y. Tsutsumi, K. Yamakawa, G. Millat, M.T. Vanier, P.G. Pentchev, K. Ohno, Genotype-phenotype relationship of Niemann-Pick disease type C: a possible correlation between clinical onsets and levels of NPC1 protein in isolated skin fibroblasts, *J. Med. Genet.* 37 (2000) 707-711.
- [16] M. Aridor, L.A. Hannan, Traffic jams II: an update of diseases of intracellular transport, *Traffic.* 3 (2002) 781-790.
- [17] P. Alfonso, S. Pampín, J. Estrada, J.C. Rodríguez-Rey, P. Giraldo, J. Sancho, M. Pocoví, Miglustat (NB-DNJ) works as a chaperone for mutated acid beta-glucosidase in cells transfected with several Gaucher disease mutations, *Blood Cells Mol. Dis.* 35 (2005) 268-276.
- [18] R. Sitia, I. Braakman, Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory, *Nature.* 426 (2003) 891-894.

- [19] Z. Kostova, D.H. Wolf, For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection, *EMBO J.* 22 (2003) 2309-2317.
- [20] M.E. Sztolsztener, A. Strzelecka-Kiliszek, S. Pikula, A. Tylki-Szymanska, J. Bandorowicz-Pikula, Cholesterol as a factor regulating intracellular localization of annexin A6 in Niemann-Pick type C human skin fibroblasts, *Arch. Biochem. Biophys.* 493 (2010) 221-233.
- [21] B.S. Moore, A.S. Eustáquio, R.P. McGlinchey, Advances in and applications of proteasome inhibitors, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12 (2008) 434-440.

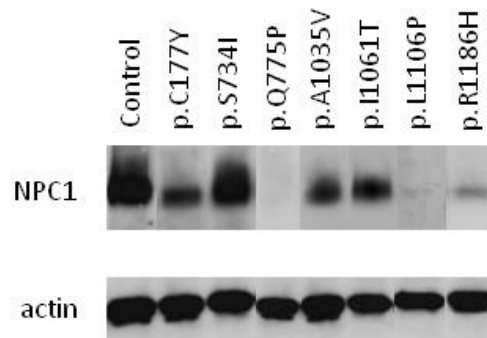
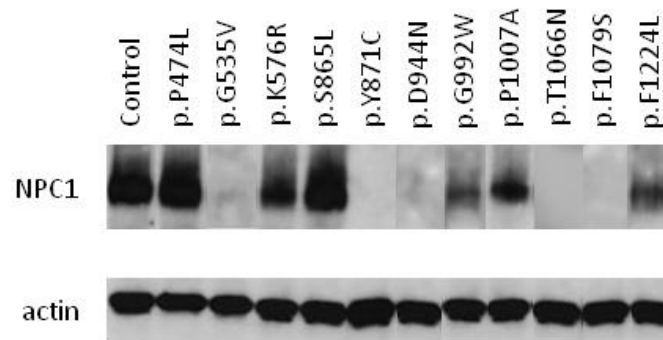
A**B**

Fig. 1. Levels of NPC1 protein in fibroblasts from NPC patients. (A) Western blot analysis of NPC1 in fibroblasts from patients harbouring different homozygous missense mutations. (B) Western blot analysis of NPC1 in fibroblasts from patients harbouring a heterozygous missense mutation and a frame shifting mutation. Western blotting was performed using a NPC1 C-terminal affinity-purified polyclonal antibody that not recognizes the truncated forms of the protein. WB with anti-actin was used as a loading control. Each lane contained 10 μ g of total protein extract.

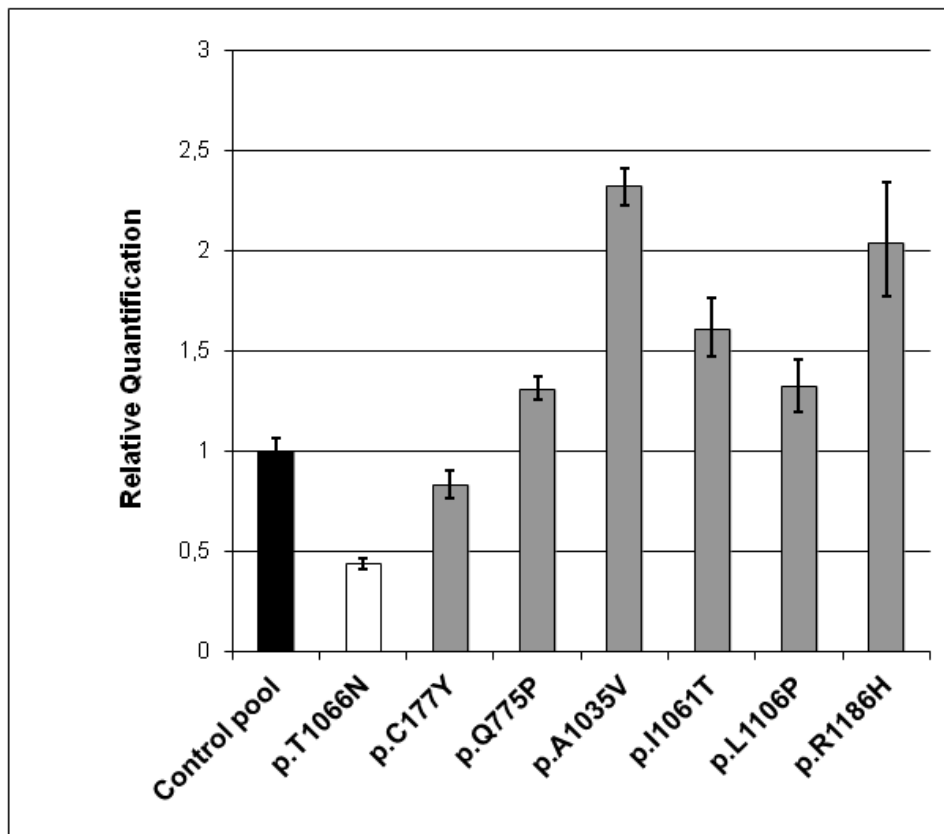


Fig. 2. Expression of *NPC1* mRNA in fibroblasts from NPC patients homozygous for missense mutations. Relative Quantification of the *NPC1* cDNA levels in control pool (black bar), patient with whole *NPC1* gene deletion in one allele (white bar) and *NPC1* homozygous patients (grey bars) using the comparative C_t method. Relative *NPC1* cDNA levels were normalized to *PPIA* cDNA levels (endogenous control). Error bars represent standard deviations (n=3).

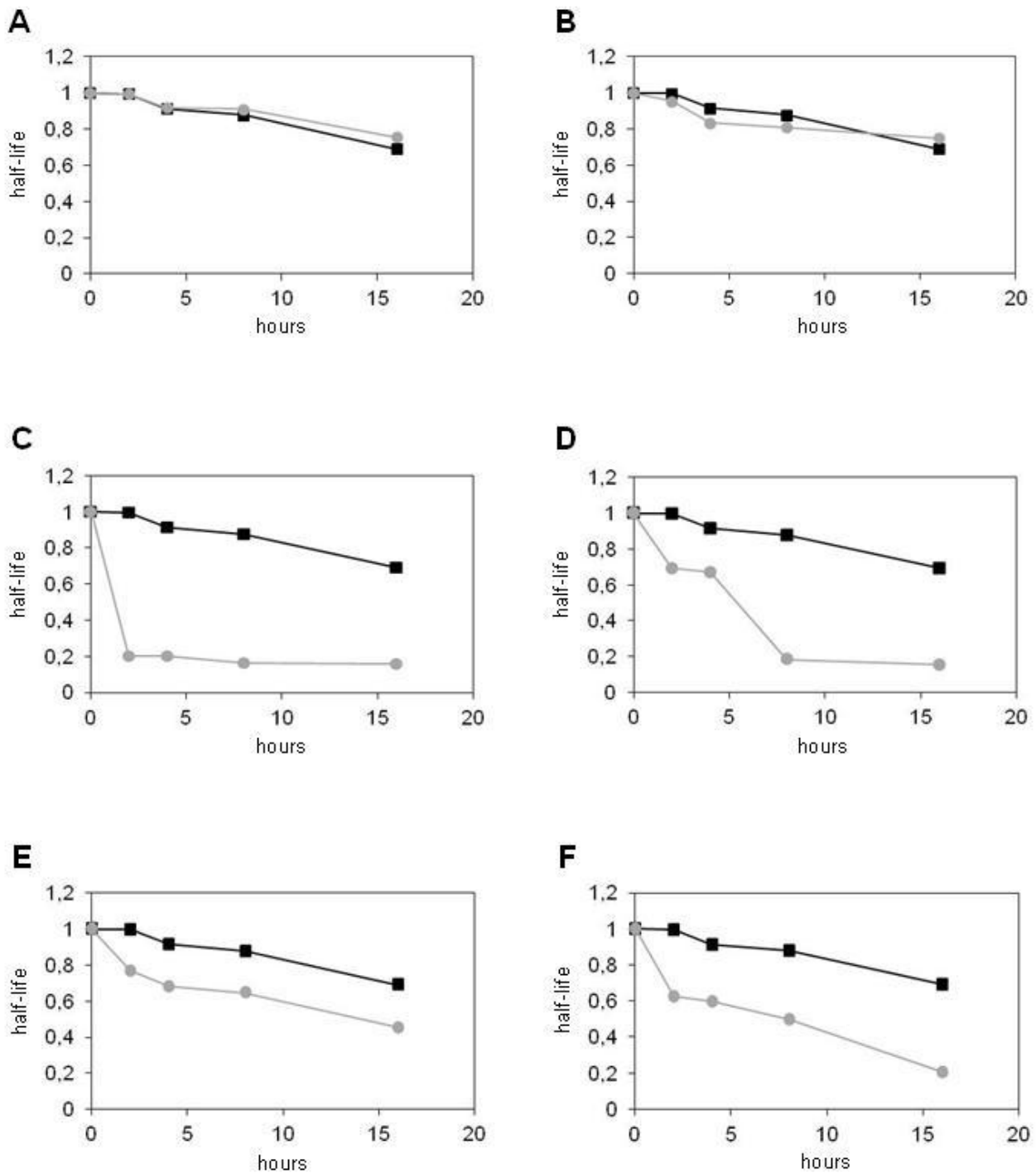


Fig. 3. Time course analysis of NPC1 stability after CHX treatment. NPC1 mutant fibroblasts were treated with CHX during 0, 2, 4, 8 and 16 h and NPC1 protein levels were analyzed by western blot. WB with anti-actin was used as a loading control. Each lane contained 30 μ g of total protein extract. The results have been represented by graph plots densitometric values for NPC1 versus time from wild type (black line) and mutants (grey line): (A) p.C177Y, (B) p.S734I, (C) p.Q775P, (D) p.A1035V, (E) p.I1061T and (F) p.T1066N.

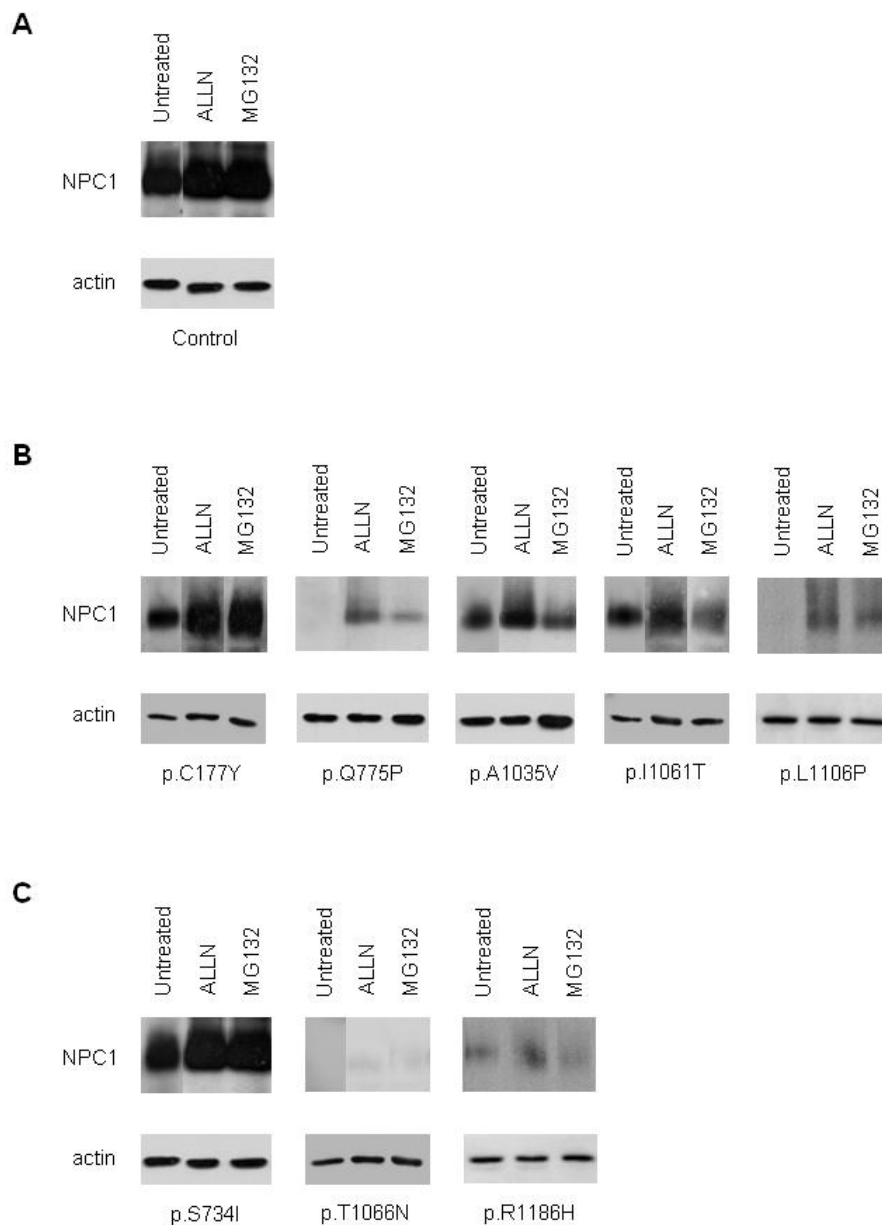


Fig. 4. Effect of proteasome inhibitors on NPC1 stability. (A) Western blot analysis of NPC1 in untreated control fibroblasts or treated with proteasome inhibitors (ALLN or MG132). (B) Western blot analysis of NPC1 in treated and untreated fibroblasts from NPC patients showing a significant recovery of NPC1 protein after the treatment with proteasome inhibitors (ALLN or MG132). (C) Western blot analysis of NPC1 in treated and untreated fibroblasts from NPC patients that did not show decreased levels of NPC1 (p.S734I) or that did not show a significant recovery of NPC1 protein after the treatment with proteasome inhibitors (ALLN or MG132) (p.T1066N and p.R1186H). WB with anti-actin was used as a loading control. Each lane contained 10 μ g of total protein extract.

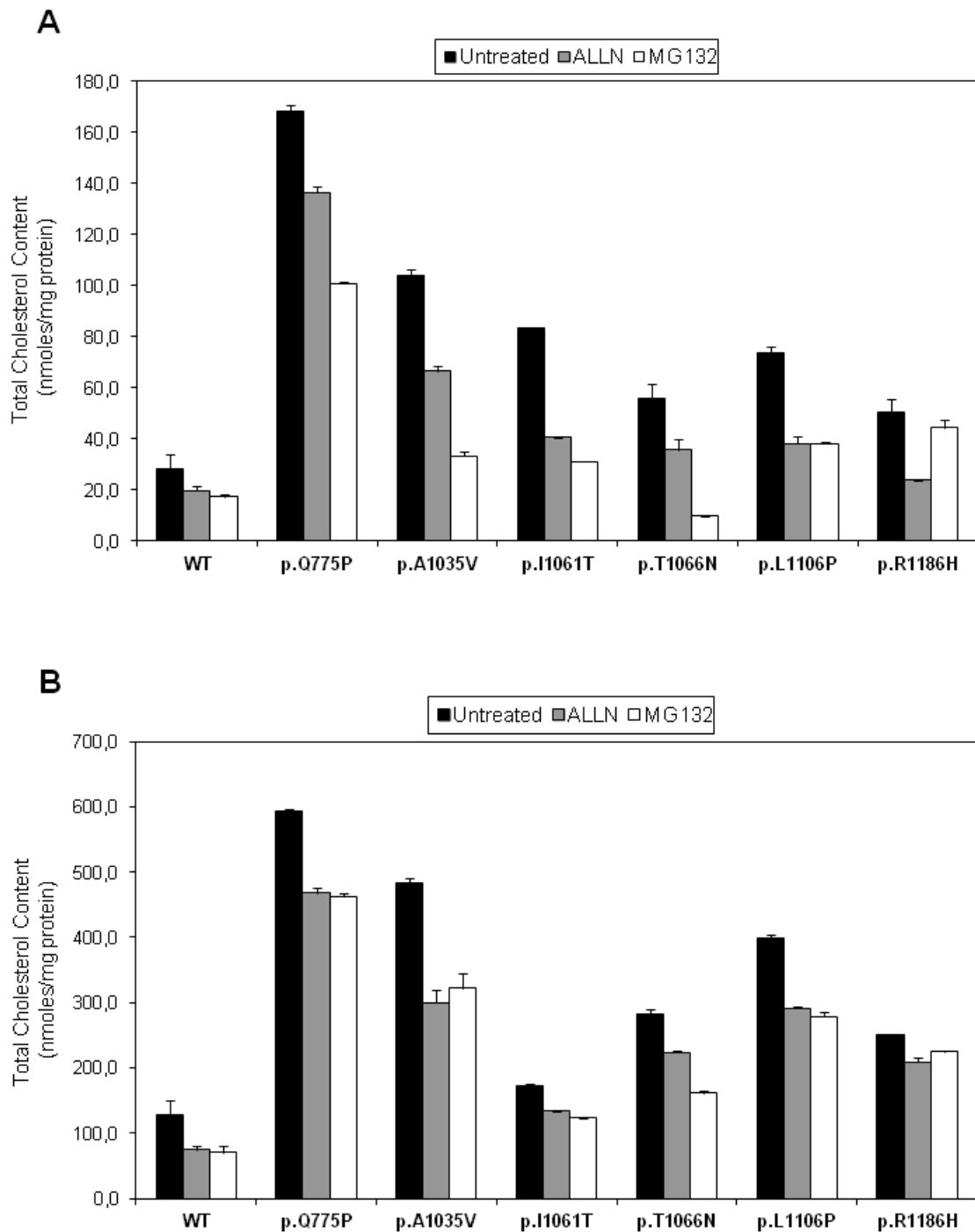


Fig. 5. Reversion of cholesterol levels after the treatment of fibroblasts from NPC patients with proteasome inhibitors. (A) Quantification of total cholesterol content in soluble fraction from patients' fibroblasts untreated or treated with ALLN or MG132 using capillary gas-liquid chromatography. (B) Quantification of membrane-associated cholesterol in patients' fibroblasts untreated or treated with ALLN or MG132 using capillary gas-liquid chromatography. Error bars represent standard deviations (n=3).

Supplemental Table S1. Clinical phenotype and genotype of the studied NPC patients.

Patient	Clinical phenotype ^d	Nucleotide change ^e (allele 1)	Amino acid change (allele 1)	Nucleotide change ^e (allele 2)	Amino acid change (allele 2)
<i>NPC6^a</i>	Juvenile	c.3182T>C	p.I1061T	c.3182T>C	p.I1061T
<i>NPC9^a</i>	Severe infantile	c.2324A>C	p.Q775P	c.2324A>C	p.Q775P
<i>NPC10^a</i>	Severe infantile	c.3104C>T	p.A1035V	c.3104C>T	p.A1035V
<i>NPC45^b</i>	Late infantile	c.2201G>T	p.S734I	c.2201G>T	p.S734I
<i>NPC47^b</i>	Severe infantile	c.530G>A	p.C177Y	c.530G>A	p.C177Y
<i>NPC64^b</i>	Severe infantile	c.3317T>C	p.L1106P	c.3317T>C	p.L1106P
<i>NPC65^b</i>	Severe infantile	c.3557G>A	p.R1186H	c.3557G>A	p.R1186H
<i>NPC7^a</i>	Severe infantile	c.2612A>G	p.Y871C	c.894dupT	p.V299CfsX9
<i>NPC11^a</i>	Late infantile	c.2594C>T	p.S865L	c.3175C>T	p.R1059X
<i>NPC23^a</i>	Juvenile	c.3019C>G	p.P1007A	c.3175C>T	p.R1059X
<i>NPC26^a</i>	Juvenile	c.1421C>T	p.P474L	c.1274C>A	p.S425X
<i>NPC37^a</i>	Adult	c.1727A>G	p.K576R	c.3662delT	p.F1221SfsX21
<i>NPC40^a</i>	Severe infantile	c.3236T>C	p.F1079S	c.1935T>A	p.C645X
<i>NPC43^c</i>	Severe infantile	c.1604G>T	p.G535V	c.2323C>T	p.Q775X
<i>NPC53^b</i>	Severe infantile	c.2830G>A	p.D944N	c.352_353delAG	p.Q119VfsX8
<i>NPC54^b</i>	Late infantile	c.2974G>T	p.G992W	c.352_353delAG	p.Q119VfsX8
<i>NPC56^b</i>	Adult	c.3672C>G	p.F1224L	c.3349dupC	p.L1117PfsX4
<i>NPC57^b</i>	Severe infantile	c.3197C>A	p.T1066N	Whole <i>NPC1</i> gene deletion	---

^a Patient previously reported in [10].

^b Patient previously reported in [11].

^c Patient previously reported in [12].

^d Classification of clinical phenotypes by age at onset of neurological symptoms, except for the neonatal fatal systemic form which include those patients who died from liver failure in the first months of life.

^e Nomenclature according to [13]. The A of the ATG of the initiator Met codon in cDNA is denoted nucleotide +1.

DISCUSSIÓ

1 IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE MUTACIONS

Perquè cercar les mutacions? A tota patologia hereditària, com són la cistinosi i la malaltia de NPC, la identificació de les mutacions del cas índex d'una família facilita el diagnòstic molecular de portadors i el diagnòstic prenatal, que permeten realitzar consell genètic a les famílies afectades. Cal tenir present que en ambdues malalties, l'anàlisi molecular és l'única tècnica diagnòstica fiable per poder realitzar un diagnòstic prenatal a aquelles famílies afectades que ho desitgin. També cal destacar que a la malaltia de NPC, l'anàlisi mutacional és a més una eina de diagnòstic imprescindible en alguns casos, com aquells amb fenotip bioquímic variant en què la filipina no acaba de ser concloent, o aquells altres en què tot i presentar una filipina negativa, la clínica és molt suggestiva.

A part de la vessant diagnòstica, el coneixement del conjunt de mutacions d'una població causants d'una malaltia ens pot aportar informació valuosa. En algunes malalties, el grau de severitat i la progressió poden ser predits per la mutació. És a dir, es poden establir correlacions genotip-fenotip que poden ser útils a nivell pronòstic. No obstant això, cal destacar que hi ha moltes malalties, com ara les dues que ens ocupen, en què predominen les mutacions privades i els pacients heterozigots compostos, i per tant, establir aquest tipus de correlacions és dificultós.

A més, la caracterització de les mutacions mitjançant estudis funcionals permet profunditzar en el coneixement dels mecanismes implicats en la patologia.

Per acabar, cada vegada sembla més evident que el tractament de les malalties genètiques acabarà sent mutació-depenent, és a dir, segons la mutació que presenti cada pacient, l'estratègia terapèutica a seguir serà diferent. Per aquest motiu, en un futur serà de vital importància conèixer el genotip dels pacients abans de decidir sobre el millor tractament a aplicar en cada cas.

1.1 LA CISTINOSI

L'anàlisi molecular realitzat a 32 pacients no relacionats afectats de cistinosi (27 espanyols i 5 marroquins) va permetre la identificació de 14 mutacions diferents, 6 de les quals no havien estat descrites prèviament. Les noves mutacions identificades comprenen: 3 mutacions de canvi de sentit (p.M1T, p.S270F i p.G309V), 2 mutacions que alteren la pauta de lectura (p.V991fsX14 i p.N107RfsX10) i 1 mutació que afecta al mecanisme de *splicing* (c.682-1G>T). En 4 dels pacients, després de seqüenciar els exons codificants (exons del 3 al 12) i les seves zones intròniques flanquejants, a més del promotor, només es va identificar una mutació en heterozigosi. Aquest últim fet podria ser degut a què el canvi no detectat es trobés localitzat als dos primers exons, els quals no són codificants, o bé, que es tractés d'una mutació intrònica profunda, la qual no seria detectada a través de l'estudi del

DNA genòmic. En aquests casos seria recomanable realitzar l'anàlisi del cDNA, però no s'ha pogut portar a terme per falta de disponibilitat d'aquest tipus de mostra dels pacients.

S'assumeix que les noves mutacions de canvi de sentit són les causants de la malaltia perquè: cap d'elles s'ha trobat en 100 al·lels control, la seqüenciació del gen *CTNS* no ha revelat la presència de cap altra mutació i els residus aminoacídics afectats estan conservats al llarg de les espècies. A més, els programes informàtics de predicció de l'efecte de les mutacions sobre l'estructura proteica, com Polyphen i Panther, confirmen la possible patogènesi d'aquests nous canvis. La mutació p.M1T aboleix la metionina del codó d'inici i això pot provocar que s'utilitzi el següent codó AUG de la seqüència per iniciar la traducció, el que rep el nom de procés de reiniciació (Peabody & Berg, 1986), que originaria una proteïna amb una pauta de lectura diferent. Existeixen dos mutacions ja descrites que afecten aquest codó, p.M1L i p.M1I (Kalatzis et al., 2002). En el cas de la p.M1I es van realitzar estudis d'expressió i els resultats varen indicar que la proteïna no s'arribava a traduir (Kalatzis et al., 2004). Respecte les mutacions p.S270F i p.G309V, ambdues estan localitzades en un domini transmembrana de la cistinosina, TM5 i TM6, respectivament, fet que possiblement afecti de forma severa a l'estructura de la proteïna (Fig. 22).

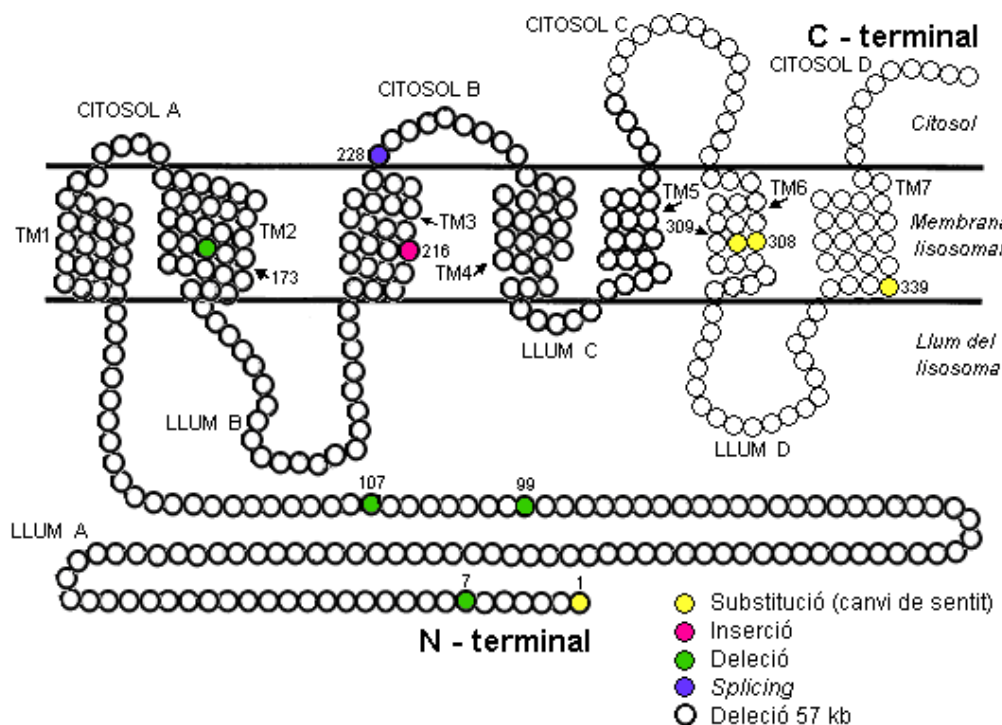


Figura 22. Estructura de la cistinosina amb la localització d'algunes de les mutacions identificades en pacients espanyols. Modificat d'Attard et al., 1999.

Les noves delecions que alteren la pauta de lectura, p.V99IfsX14 i p.N107RfsX10, són mutacions patogèniques ja que originen un PTC i compleixen les condicions necessàries per a què actuï el mecanisme de NMD (veure apartat III.2.1 de la introducció).

Finalment, l'anàlisi de la nova mutació de *splicing*, c.682-1G>T, mitjançant la utilització de programes de predicció de llocs de *splicing*, com BDGP i HSF, indica que aquesta altera el lloc acceptor de *splicing* canònic, fet que podria donar lloc a un *splicing* aberrant (veure apartat III.1.4 de la introducció).

Si s'hagués disposat de fibroblasts dels pacients que presenten les delecions o el canvi de *splicing* anteriorment nombrats, aquests s'haurien pogut cultivar amb CHX i a través de l'estudi del cDNA, caracteritzar l'efecte d'aquestes mutacions.

També es van analitzar 6 polimorfismes (c.329+22C>G, c.461+49A>G, c.461+52G>A, c.461+54G>A, c.504A>G i c.779C>T) del gen *CTNS*, tant a la població control com als pacients, excepte als homozigots per la delecio de 57kb. A continuació, es va realitzar l'anàlisi d'haplotips, el qual no va revelar un desequilibri de lligament entre els polimorfismes estudiats i les mutacions identificades en els pacients espanyols.

Posteriorment a la publicació de l'article 1, s'ha pogut realitzar l'anàlisi mutacional a 9 pacients més d'origen espanyol afectes de cistinosis. Els resultats es mostren a la Taula 4 (resultats annexos a l'article 1). En el cas del pacient CY93, després de realitzar la seqüenciació dels diferents exons del gen *CTNS* amplificats a partir del DNA genòmic, no es va identificar cap canvi, amb l'excepció de la impossibilitat d'amplificar l'exó 3, fet que ens va fer sospitar la presència d'una delecio. En aquest pacient s'ha realitzat l'anàlisi del cDNA, ja que s'ha pogut disposar dels fibroblasts que han estat tractats amb CHX i això ha permès identificar la delecio de la totalitat de l'exó 3 (c.1-19_61del) en homozigosi. Amb la pèrdua de l'exó 3 també es perd el codó d'inici de la traducció, que es troba localitzat en aquest exó. Aquest fet fa que desconeixem l'efecte que aquesta mutació provoca a nivell de la proteïna, ja que dóna lloc a diferents possibilitats: es pot reiniciar la traducció en un codó AUG posterior de la seqüència o pot ser que la proteïna ni tan sols s'arribi a traduir. Aquesta delecio no ha estat publicada fins al moment, a diferència de la resta de mutacions esmentades en aquesta taula que ja havien estat descrites i també identificades en altres pacients de la població espanyola.

Tenint en compte la totalitat dels al·lels analitzats (82 al·lels), els que corresponen als pacients que es troben descrits a la publicació i els últims esmentats a la Taula 4 (resultats annexos a l'article 1), la mutació més prevalent a Espanya és una delecio de 57kb (38% dels al·lels mutats),

encara que aquesta té una prevalença menor que en altres poblacions estudiades anteriorment, com a Holanda on representa un 59% (Heil et al., 2001), Suïssa i Alemanya on està present en el 65% dels al·lels (Kiehnopf et al., 2002). Contràriament, la freqüència espanyola és major que la de la població italiana, on aquesta mutació només s'ha detectat al 12% dels al·lels estudiats (Mason et al., 2003). A més, aquesta deleció conjuntament amb unes altres 5 mutacions: p.M1T, p.T7FfsX7, c.61+5G>A, p.T216NfsX12 i p.G308R, representen el 73% dels al·lels estudiats a Espanya.

El 95% dels pacients d'aquesta cohort presenta el fenotip nefropàtic infantil, coincidint així amb la resta de poblacions estudiades. Pel que fa a les correlacions genotip-fenotip, tal i com s'havia descrit anteriorment (Attard et al., 1999), tots els pacients amb fenotip clínic infantil d'aquest estudi tenen a ambdós al·lels mutacions que trunquen o bé que afecten aminoàcids conservats de les regions transmembrana de la proteïna. Els dos únics pacients amb fenotip clínic juvenil d'aquesta sèrie són compostos heterozigots per una mutació que trunca la proteïna i pel canvi p.S139F. Aquest últim està localitzat al primer domini transmembrana, on cap mutació de canvi de sentit associada al fenotip infantil s'ha trobat mai (Attard et al., 1999). Aquest fet suggereix que aquesta regió de la cistinosina podria ser menys rellevant a nivell funcional, i per aquest motiu, la mutació p.S139F podria ser la que determinés el fenotip juvenil, atenuant l'efecte sever de la mutació present a l'altre al·lel (deleció de 57kb o p.T7FfsX7).

Aquest treball és el primer anàlisi molecular realitzat a pacients espanyols afectats de cistinosi. La cohort estudiada recull un nombre considerable d'individus, 41 pacients, tot i que el nombre de pacients diagnosticats bioquímicament de cistinosi a Espanya és major. Cal tenir en compte que en aquesta malaltia l'anàlisi molecular és útil per confirmar el diagnòstic del cas índex però no és imprescindible, fet que a vegades dificulta l'obtenció de mostra d'alguns pacients.

1.2 LA MALALTIA DE NIEMANN-PICK TIPUS C

La seqüenciació dels gens *NPC1* i *NPC2* en mostres procedents de 30 pacients no relacionats amb la malaltia de NPC (23 espanyols, 4 marroquins, 1 costa-riqueny, 1 equatorià i 1 alemany) va donar lloc a la identificació de 43 mutacions diferents al gen *NPC1*, 12 de les quals no havien estat descrites prèviament. Aquestes engloben 4 mutacions de canvi de sentit (p.F995L, p.F1079S, p.L1106P i p.G1209E), 1 mutació sense sentit (p.E1089X), 1 inserció (p.L1117PfsX4), 1 deleció en pauta (p.N916del), 4 canvis intrònics (c.58-3280C>G, c.882-28A>T, c.2604+5G>A i c.3591+5G>A) que afecten al mecanisme de *splicing* i la primera deleció que inclou el gen *NPC1* complet. L'anàlisi molecular realitzat va permetre completar el genotip de tots els pacients excepte un d'ells, ja que després d'estudiar tant el cDNA com el DNA genòmic, un dels al·lels va continuar sense ser identificat.

Pel que fa a les mutacions de canvi de sentit noves (p.F995L, p.F1079S, p.L1106P i p.G1209E), es considera que aquestes són patogèniques pels mateixos motius que en el cas de la cistinosi. Per acabar de confirmar-ho seria necessari la realització d'estudis d'expressió, els quals no s'han pogut portar a terme degut a la dificultat que suposa que la proteïna NPC1, a diferència dels enzims lisosòmics, no tingui una activitat quantificable.

Entre els canvis nous hi ha la mutació p.N916del, que encara que es tracta d'una deleció en pauta, afecta a un residu rellevant per a la proteïna NPC1 ja que es tracta d'un lloc de N-glicosilació. També s'han identificat les mutacions p.E1089X i p.L1117PfsX4, que són indubtablement causants de malaltia, ja que mitjançant l'anàlisi del cDNA en presència de CHX, s'ha comprovat que desencadenen la degradació del mRNA pel mecanisme de NMD.

Cal destacar que s'ha descrit la primera gran deleció causant de la malaltia de NPC, que inclou el gen *NPC1* sencer i part d'altres gens flanquejants. La caracterització detallada d'aquesta deleció juntament amb una altra d'origen grec es recull en un treball de col·laboració (article 8 de l'annex). Aquest tipus de mutació s'hauria de considerar en els casos de pacients que presenten mutacions en homozigosi i en els quals no es pot confirmar l'estat de portadors dels pares.

Aquest treball emfatitza la necessitat d'analitzar el cDNA en presència de CHX en aquells pacients que tenen un al·lel pendent de tipificar després d'haver realitzat l'anàlisi mutacional al DNA genòmic. Aquest és el cas de 8 dels pacients presentats a l'article 5 de l'annex, en els quals ara s'ha pogut completar el genotip. Els estudis a nivell de RNA, alhora que permeten la caracterització de l'efecte de les mutacions de *splicing* que afecten als llocs canònics, són útils per identificar mutacions intròniques profundes (per exemple, c.58-3280C>G i c.1554-1009G>A) i detectar canvis que podrien ser classificats erròniament com a mutacions de canvi de sentit (per exemple, c.3754G>C) o com a canvis sinònims (per exemple, c.2292G>A) (veure apartat 2.1 de la discussió). A més, permeten detectar els transcrits erronis que contenen un PTC i que serien degradats pel mecanisme de NMD, gràcies a la inhibició d'aquest procés que realitza la CHX (veure apartat 2.2 de la discussió).

Després de la publicació de l'article 2, s'han diagnosticat bioquímicament 8 pacients NPC més de diferents orígens, als que també se'ls hi ha analitzat els gens *NPC1* i *NPC2*. Els resultats d'aquesta cerca mutacional es mostren a la Taula 5 (resultats annexos a l'article 2), conjuntament amb els fenotips clínic i bioquímic. Les mutacions identificades en aquests pacients han estat publicades amb anterioritat per altres grups i algunes d'elles ja detectades a la cohort espanyola (p.R116X, p.Q119VfsX8, p.C177Y, p.Q775P, p.G992W, p.P1007A i p.R1059X), exceptuant els canvis p.P474A i p.S1249N que són nous. En ambdós casos, hi ha descrita una mutació que afecta al mateix residu però

dóna lloc a un canvi d'aminoàcid diferent, p.P474L (c.1301C>T) (Tarugi et al., 2002) i p.S1249G (c.3745A>G) (Park et al., 2003). Cal tenir en consideració el cas NPC68, que es tracta d'un pacient adult en el que el test de la filipina va donar negatiu, però degut a unes dades clíniques molt suggestives es va decidir portar a terme l'estudi molecular, aconseguint d'aquesta manera el diagnòstic definitiu.

La malaltia de NPC és una de les malalties lisosòmiques més freqüentment diagnosticada a Espanya, amb 2-6 casos nous cada any. Aquest fet fa que en aquests moments la nostra cohort de NPC ascendeixi a 73 casos índex, els quals han estat recollits al llarg de 3 publicacions (article 2, article 3 i article 5 de l'annex) i els més recents encara no publicats (Taula 5, resultats annexos a l'article 2).

Els resultats conjunts mostren un ampli espectre mutacional al gen *NPC1*, amb 74 mutacions diferents identificades, degut a què existeix una elevada heterogeneïtat al·lèlica. A més, en la majoria dels casos es tracta de mutacions privades, és a dir, pròpies de cada família. Esmentar que a diferència d'altres poblacions (Millat et al., 2001b; Park et al., 2003; Fancello et al., 2009), no s'ha trobat cap pacient amb mutacions al gen *NPC2*.

La mutació p.I1061T és la més prevalent a la població mundial (Millat et al., 1999) i també a l'espanyola, on representa un 8% dels al·lels mutats. Aquesta freqüència és menor a la descrita al Regne Unit (Imrie et al., 2007), però similar a la de Portugal (Ribeiro et al., 2001) i Itàlia (Fancello et al., 2009). La mutació p.P1007A, amb una freqüència del 4'5%, és el segon canvi més freqüent a la nostra població, coincidint amb el publicat en estudis previs (Millat et al., 2005).

Com es pot observar a la Fig. 23, principalment s'han detectat al·lels amb mutacions de canvi de sentit (64%), no obstant, cal destacar la rellevància dels defectes de *splicing* (12%). La distribució dels diferents tipus de mutacions a la cohort espanyola (Fig. 23a) es correspon amb la de la població general afectada per la malaltia de NPC (Fig. 23b), exceptuant una petita proporció major de mutacions de *splicing* en detriment d'un percentatge menor de delecions. Existeix la possibilitat que aquesta diferència en el percentatge de les mutacions de *splicing*, sigui conseqüència de la nostra major taxa de detecció d'aquest tipus de canvis, assolida gràcies a l'anàlisi del cDNA. De la totalitat de mutacions de *splicing* publicades a la base de dades HGMD, el 32% han estat identificades en pacients espanyols. L'única població on s'han trobat mutacions activadores de llocs críptics de *splicing* a les zones intròniques profundes (c.58-3280C>G i c.1554-1009G>A) és la nostra, ja que a la resta de cohorts només s'han identificat canvis que afecten a les seqüències canòniques.

En general les mutacions es distribueixen al llarg de tota la seqüència proteica, havent una concentració considerable de canvis a la zona del *cysteine-rich luminal loop*, coherent amb el que s'ha observat en altres estudis anteriors (Greer et al., 1999; Millat et al., 2001a; Park et al., 2003).

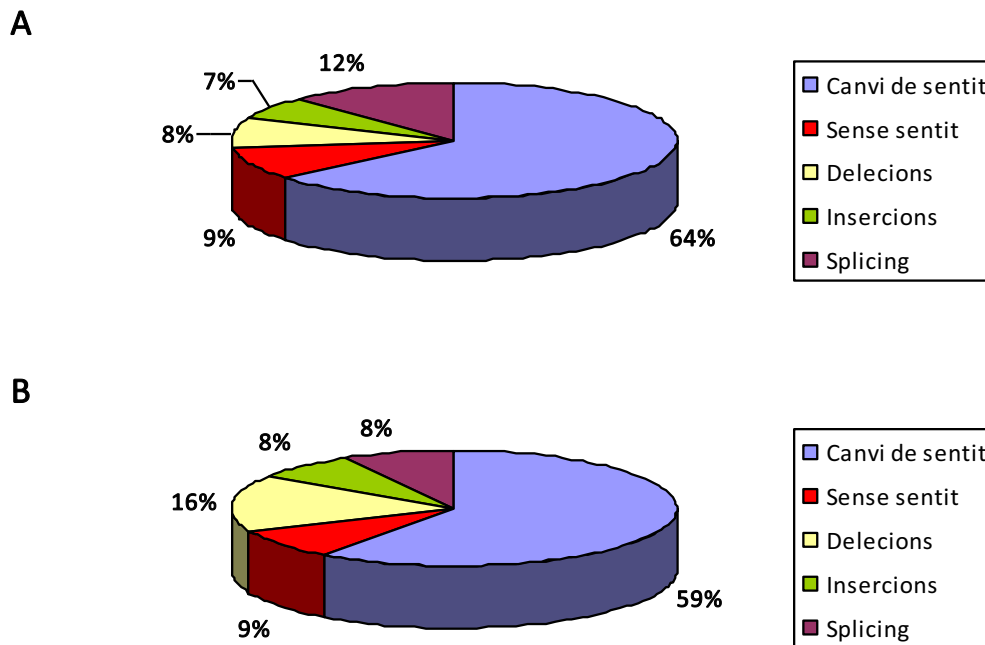


Figura 23. Tipus de mutacions identificades al gen *NPC1*. A) Als pacients de la cohort espanyola; B) A la població general de pacients NPC (segons les dades de *Human Gene Mutation Database*).

La nostra sèrie de pacients NPC presenta una gran prevalença de la forma clínica infantil precoç, al voltant del 30%, mentre que aquest fenotip representa el 20% de casos d'un estudi europeu (Vanier & Millat, 2003).

Com s'ha esmentat anteriorment, les correlacions genotip-fenotip són limitades a causa de què es disposa de pocs pacients homozigots per a la mateixa mutació, com a conseqüència del gran nombre de mutacions privades i que la majoria de pacients són heterozigots compostos. Tot i això, existeixen algunes associacions. A la nostra cohort, la presència de les mutacions p.C177Y, p.Q775P i p.A1035V dóna lloc a un fenotip bioquímic clàssic i totes tres en homozigosi originen un fenotip clínic infantil, però en heterozigosi composta amb una altra mutació, és aquesta última segons la seva severitat la que determina la forma clínica. Els nostres estudis han permès introduir algunes consideracions controvertides pel que fa a algunes correlacions establertes a la bibliografia. Per primera vegada es presenta un pacient homozigot per a la mutació p.I1061T amb fenotip bioquímic clàssic, el qual mostra la forma clínica infantil precoç, contràriament al descrit fins al moment, ja que aquesta mutació sempre s'havia associat a la presentació juvenil (Millat et al., 1999; Millat et al., 2005). De la mateixa manera, es descriu un pacient amb fenotip bioquímic variant i heterozigot compost per a la mutació p.P1007A, el qual presenta el fenotip neonatal, a diferència de la presentació juvenil o adulta que caldria esperar segons el publicat per altres autors (Millat et al., 2001a; Ribeiro et al., 2001).

2 MECANISMES MOLECULARS IMPLICATS EN LA PATOLOGIA DE NIEMANN-PICK TIPUS C

Es coneix que una mutació a nivell de DNA acostuma a tenir un efecte a nivell de proteïna, veient aquesta afectada la seva expressió o bé la seva conformació, però en ambdós casos el desenllaç serà el mateix, l'alteració de la funcionalitat de la proteïna en qüestió (Fig. 24).

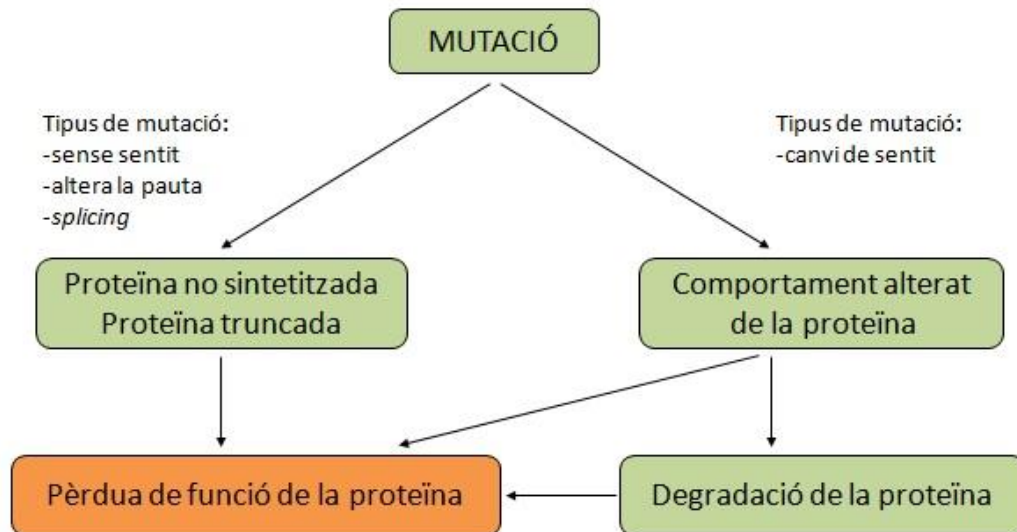


Figura 24. Efecte dels diferents tipus de mutacions sobre la proteïna.

Segons el tipus de mutació present, l'efecte sobre la proteïna variarà. En el cas de les mutacions que introdueixen un PTC, com les sense sentit i les que alteren la pauta de lectura, la proteïna pot estar troncada i per tant ser més curta que la nadiua, o fins i tot no arribar a ser sintetitzada a causa de la degradació dels transcrits de mRNA erronis pel procés de NMD. Pel que fa a les mutacions que afecten al *splicing*, les conseqüències poden ser les mateixes, ja sigui per pèrdua de material exònic (per exemple, *exon skipping*) o bé per incorporació de material intrònic (per exemple, pseudoexó). Si la pèrdua o la incorporació del material genètic manté la pauta de lectura, el resultat pot ser una proteïna de seqüència diferent a l'original que segurament no serà funcional. Respecte les mutacions de canvi de sentit, poden modificar el comportament de la proteïna, ja sigui alterant el seu plegament, alguna modificació post-traducciona o les interaccions amb altres proteïnes. Això pot provocar que aquesta perdi funcionalitat o bé que sigui reconeguda per la cèl·lula com una proteïna anòmala i enviada a degradar.

El fet d'identificar diferents tipus de mutacions en els pacients NPC, totes elles causants de la patologia però relacionades amb processos cel·lulars diferents, ens va portar a analitzar la possible implicació d'aquests mecanismes en la malaltia.

2.1 *SPLICING* - MUTACIONS DE *SPLICING*

La majoria dels al·lels identificats a la població NPC espanyola presenten mutacions de canvi de sentit, però cal destacar la presència dels defectes de *splicing*, ja que aquests representen més d'un 10% dels al·lels mutats de la nostra cohort. Fins al moment s'havien identificat poques mutacions intròniques en pacients NPC (Millat et al., 2001a; Ribeiro et al., 2001; Sun et al., 2001; Park et al., 2003; Di Leo et al., 2004; Fernandez-Valero et al., 2005) i en molts casos no s'havia confirmat l'efecte a nivell del mRNA. La prevalença real de les mutacions de *splicing* probablement està subestimada, degut a què les zones intròniques profundes no acostumen a ser seqüenciades i a què els transcrits erronis (amb un canvi de pauta i un PTC) normalment són degradats pel mecanisme de NMD (Vega et al., 2009).

L'efecte d'aquests canvis en el procés de *splicing* és diferent segons la localització de les seqüències mutades (veure apartat III.1.4 de la introducció). La majoria d'aquestes mutacions afecten a les seqüències canòniques de *splicing* (veure apartat III.1.1 de la introducció) i provoquen: l'*exon skipping* (c.882-28A>T, c.2604+5G>A i c.3754G>C), la pèrdua de material exònic (c.2292G>A) o bé ambdues coses (c.3591+5G>A). Per altra banda hi ha els canvis que activen llocs crítics de *splicing* (donadors o acceptors) que estan situats a regions intròniques profundes (c.58-3280G>A i c.1554-1009G>A) i donen lloc a la inserció de pseudoexons. D'aquest últim tipus de mutacions recentment se n'han descrit a altres malalties metabòliques, com les acidèmies orgàniques (Rincón et al., 2007) i els trastorns congènits de la glicosilació (Vega et al., 2009). S'ha estimat que la freqüència d'aquests canvis en algunes malalties és del 2 al 7% del total dels al·lels (Gurvich et al., 2008; Pros et al., 2009), encara que probablement la freqüència real és major a l'estimada degut a la seva detecció més complexa.

La mutació intrònica c.1554-1009G>A, el primer d'aquest tipus identificat al gen *NPC1*, és relativament freqüent a la població espanyola, representa un 2,7% dels al·lels mutats. Aquest canvi provoca la inserció de 194 pb de l'intró 9 com un nou exó, donant com a resultat l'aparició d'un PTC i la degradació del mRNA pel mecanisme de NMD. La caracterització d'aquesta mutació i l'ús d'oligonucleòtids antisentit tipus morfolino com a estratègia terapèutica van ser analitzats amb detall amb anterioritat (Rodríguez-Pascau et al., 2009).

El nou canvi intrònic profund c.58-3280C>G promou la inserció d'un pseudoexó, que es correspon amb 374 pb de l'intró 1, el qual origina un transcrit erroni que conté un PTC, però aquest no és degradat pel procés de NMD. L'explicació a perquè aquest mRNA escapa de l'acció del NMD, tot i complir les condicions necessàries per a què aquest actuï (veure apartat III.2.1 de la introducció), pot recolzar-se en què prèviament s'havien descrit altres excepcions (Inácio et al., 2004). El fet que transcrits on el PTC està pròxim al codó d'inici de la traducció siguin resistents al NMD, pot ser degut a l'acció de la proteïna d'unió a la cua poliA (PABPC1), que és supressora del NMD. Està descrit que durant la traducció es forma una estructura circular on la PABPC1 estaria propera a la regió 5' del mRNA on està situat el PTC, i d'aquesta manera podria bloquejar el NMD, tot i la presència dels EJs (Silva et al., 2008). A més, el ribosoma podria reiniciar la traducció en el següent codó AUG posterior al PTC i així retirar els EJs del mRNA, fet que eliminaria uns potents promotors del mecanisme de NMD (Nicholson et al., 2010).

Aquestes mutacions que creen nous llocs críptics de *splicing* i, com a conseqüència, donen lloc a la incorporació d'un pseudoexó al mRNA madur, són candidates a la correcció mitjançant l'ús d'oligonucleòtids antisentit (Wood et al., 2007). En aquest cas els llocs de *splicing* canònics no estan alterats i, per tant, es pot potenciar el seu ús en detriment dels llocs críptics. El bloqueig d'aquests llocs críptics evita que siguin reconeguts per la maquinària de *splicing*, restaurant d'aquesta manera el *splicing* correcte i la funcionalitat de la proteïna. Tal com s'ha esmentat anteriorment, aquesta aproximació terapèutica ha estat assajada a la malaltia de NPC (Rodríguez-Pascau et al., 2009) i també a altres malalties (Vetrini et al., 2006; Du et al., 2007; Davis et al., 2009; Pérez et al., 2009; David et al., 2010) obtenint resultats positius.

2.2 NMD - MUTACIONS SENSE SENTIT I MUTACIONS QUE ALTEREN LA PAUTA DE LECTURA

L'existència, a la nostra cohort de pacients NPC, de forces mutacions sense sentit o que alteren la pauta de lectura al gen *NPC1* (p.R116X, p.Q119VfsX8, p.W260X, p.S425X, p.A558GfsX12, p.Q775X, p.G993EfsX4, p.R1059X i p.I1061NfsX4), va despertar el nostre interès pel mecanisme de NMD.

Per realitzar l'abordatge d'aquest estudi es van analitzar, per PCR convencional i PCR a temps real, els fibroblasts de pacients portadors de les mutacions esmentades no tractats i tractats amb CHX. És conegut que la CHX és un inhibidor de la traducció, que en ser inhibida, de retruc inhibeix el procés de degradació del mRNA pel mecanisme del NMD.

Es va poder comprovar que el NMD és el responsable de la degradació del mRNA en tots els al·lels que s'han analitzat en aquest treball i que codifiquen per un PTC al gen *NPC1*. En aquest sentit, el fet que apareguin bandes o la intensitat d'aquestes augmenti al tractar les cèl·lules amb CHX, és senyal de què els mRNAs corresponents a aquestes bandes normalment són presents a la cèl·lula, però són degradats ràpidament pel procés de NMD a causa de la presència de PTCs.

Tanmateix, en alguns dels al·lels estudiats (p.Q119VfsX8, p.A558GfsX12, p.G993EfsX4, p.R1059X i p.I1061NfsX4) la recuperació detectada després del tractament amb CHX va ser parcial, tot i complir les condicions necessàries per a què actuï el NMD (veure apartat III.2.1 de la introducció). El fet que la quantitat de mRNA en aquests casos no arribi a ser igual que la del control, pot ser degut a diferents factors: s'ha suggerit l'existència de mecanismes de degradació alternatius al NMD (Ivanov et al., 2008), alhora que s'ha descrit que el sistema de vigilància del mRNA pot variar entre cèl·lules i teixits diferents (Linde et al., 2007). A més, la regulació post-transcripcional de l'expressió gènica és molt complexa, ja que aquesta està subjecta a diversos mecanismes reguladors (Moore, 2005).

Podem concloure que el NMD és un procés que té un paper important en la regulació dels transcrits de la cèl·lula, especialment en el cas dels que són erronis, ja que aquest procés els elimina per evitar la presència de múltiples proteïnes truncades que podrien tenir efectes nocius per a la cèl·lula. Alhora el NMD serveix per regular processos com el *splicing* alternatiu o l'existència de *splicings* incorrectes que també alteren la pauta de lectura. És evident que existeix un lligam entre el NMD i el *splicing*, l'un depèn de l'altre, ja que les unions exó-exó que es formen després del *splicing* són les que serveixen d'ancoratge als EJC, on s'acabaran unint les proteïnes que indueixen el NMD.

Existeixen fàrmacs, com la gentamicina (Yoshizawa et al., 1998) i el PTC124 (Welch et al., 2007), que promouen el PTC *readthrough*, és a dir, que són capaços d'introduir un aminoàcid al lloc del PTC i així permeten que la traducció pugui continuar (Kaufman, 1999). Tot i que s'introdueix una mutació de canvi de sentit, hi ha la possibilitat que aquest canvi mantingui certa funcionalitat de la proteïna (Sánchez-Alcudia et al., 2012). Es tracta d'una teràpia potencial pels pacients que presenten mutacions sense sentit, però els assajos clínics iniciats indiquen que aquests fàrmacs encara s'han de millorar abans de ser emprats en clínica.

2.3 DEGRADACIÓ PROTEICA PROTEASÒMICA - MUTACIONS DE CANVI DE SENTIT

En el cas de les mutacions de canvi de sentit, treballs anteriors van mostrar que en alguns casos aquest tipus de mutacions poden causar una disminució de la proteïna NPC1 (Yamamoto et al., 2000; Millat et al., 2001a; Ribeiro et al., 2001). Per aquest motiu es va decidir analitzar, mitjançant

western blot, els nivells de proteïna NPC1 en els fibroblasts de 7 pacients homozigots per diferents mutacions de canvi de sentit (p.C177Y, p.S734I, p.Q775P, p.A1035V, p.I1061T, p.L1106P i p.R1186H) i també en els fibroblasts d'11 pacients heterozigots compostos per una mutació de canvi de sentit (p.P474L, p.G535V, p.K576R, p.S865L, p.Y871C, p.D944N, p.G992W, p.P1007A, p.T1066N, p.F1079S i p.F1224L) i una mutació que trunca la proteïna. En el cas d'aquests últims 11 pacients, assumim que la senyal detectada per western blot correspon únicament a l'al·lel que presenta la mutació de canvi de sentit, ja que l'anticòs utilitzat reconeix l'extrem carboxi terminal de la proteïna, el qual no estarà present a la proteïna truncada que generi l'al·lel portador de la mutació que provoca un PTC.

En 15 de les 18 mostres analitzades hi ha absència o reducció significativa de la proteïna NPC1. A la Fig. 25 hi ha una representació de l'estructura de la proteïna NPC1 on s'han situat les mutacions estudiades i es diferencia entre les que donen lloc a una pèrdua total de la proteïna i les que no. Es pot observar que les mutacions que provoquen l'absència de la proteïna estan localitzades a un domini transmembrana (p.Q775P i p.L1106P) o bé al *cysteine-rich luminal loop* (p.Y871C, p.D944N, p.T1066N i p.F1079S).

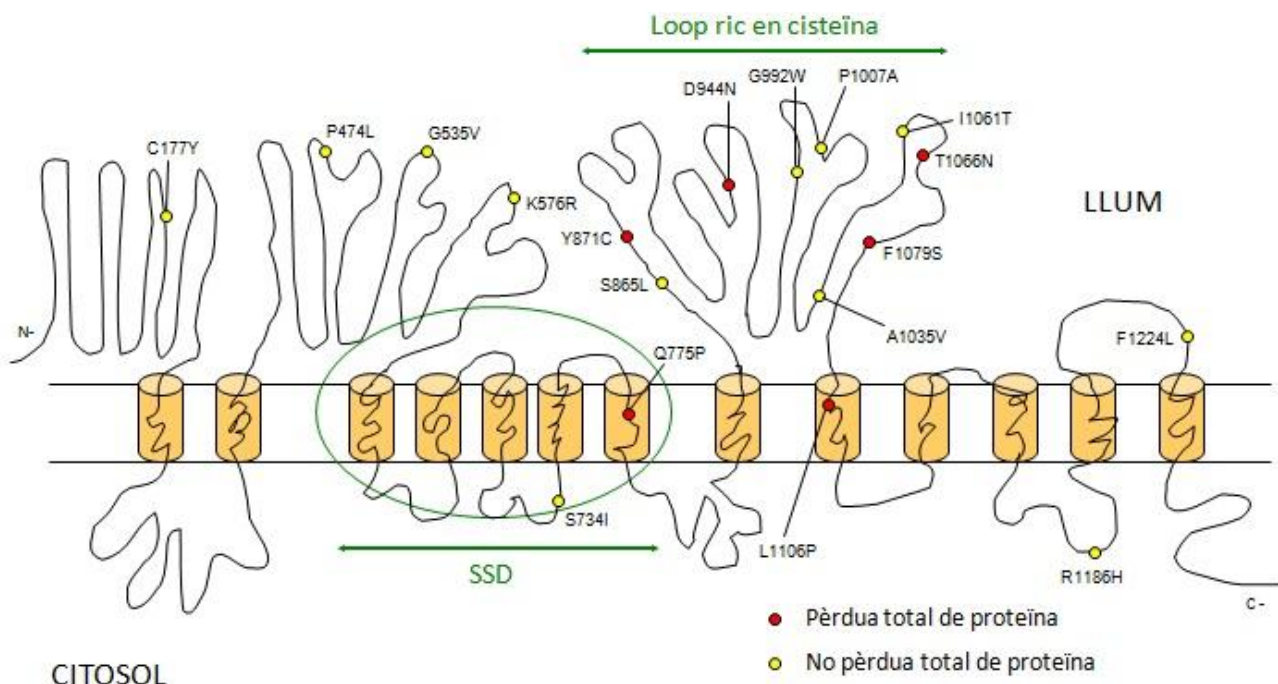


Figura 25. Mutacions analitzades a nivell de l'expressió de la proteïna NPC1. Estructura de la proteïna NPC1 segons el model de Davies & Ioannou, 2000.

Aquests resultats confirmen les dades prèvies que mostraven el mateix efecte de les mutacions p.C177Y, p.Q775P, p.A1035V i p.I1061T (Millat et al., 2001a; Ribeiro et al., 2001; Gelsthorpe

et al., 2008) i a més amplien el nombre de mutacions de canvi de sentit que afecten als nivells d'expressió proteica de NPC1. En concordança amb altres autors (Yamamoto et al., 2000; Millat et al., 2001a), es mostra una correlació entre l'absència de la proteïna NPC1 i els fenotips clínics més severes de la malaltia. Tots els pacients en els que s'ha observat la pèrdua total de la proteïna (mutacions p.G535V, p.Q775P, p.Y871C, p.D944N, p.T1066N, p.F1079S i p.L1106P) presenten la forma clínica neonatal o infantil precoç.

Pel que fa a les mutacions de canvi de sentit que no alteren els nivells de la proteïna NPC1, com és el cas dels canvis p.P474L, p.S734I i p.S865L, existeix la possibilitat que la causa de la patologia a nivell cel·lular sigui la deslocalització de la proteïna NPC1 mutada, és a dir, que aquesta no arribi al lisosoma perquè queda retinguda en algun dels orgànuls de la via endocítica. Això és el que succeeix amb la mutació p.C113R, ja que la major part de la proteïna mutada es localitza al RE, als endosomes primerencs i a la membrana plasmàtica enlloc dels endosomes tardans i lisosomes (Blom et al., 2003).

Per esbrinar si la pèrdua de les proteïnes NPC1 mutades era deguda a alteracions en la transcripció, es va quantificar el mRNA de les diferents línies cel·lulars mutants mitjançant una PCR a temps real. Hi ha una manca de correlació entre els nivells de proteïna i la quantitat de mRNA, ja que a les mostres dels 6 pacients homozigots analitzats el mRNA no es troba disminuït respecte una mostra control. Aquest fet suggereix que la reducció de la proteïna NPC1 podria ser produïda per alteracions en la traducció o canvis en l'estabilitat proteica. Experiments de *time course* després del tractament amb CHX van permetre descobrir que en la majoria dels casos, aquesta reducció és deguda a una disminució significativa de la vida mitja de les proteïnes mutades.

Es coneix que algunes mutacions impossibiliten el plegament o l'ensamblatge correcte de les proteïnes i que aquest plegament incorrecte està implicat en la patogènesi de diverses malalties (Aridor & Hannan, 2002). Les proteïnes mal plegades són reconegudes pel mecanisme de control de qualitat ERAD, que s'assegura que només surtin del RE les proteïnes plegades correctament (Kostova & Wolf, 2003), i aquest plegament anòmal fa que siguin degradades per la via de la ubiquitina-proteasoma (Sitia & Braakman, 2003). Aquestes evidències ofereixen una possible interpretació a la reducció observada dels nivells de la proteïna NPC1 en els fibroblasts dels nostres pacients. A més, va reforçar les nostres sospites que es publicués que el mutant p.I1061T de NPC1 és reconegut al RE com una proteïna mal plegada i degradat pel proteasoma (Gelsthorpe et al., 2008). Per tot això, vam decidir tractar els fibroblasts dels pacients homozigots per les mutacions p.C177Y, p.S734I, p.Q775P, p.A1035V, p.I1061T, p.L1106P i p.R1186H, i l'hemizigot per la mutació p.T1066N amb inhibidors del proteasoma, com són l'ALLN i el MG132. Ambdós inhibidors actuen als llocs actius *chymotrypsin-like*

del 20S del proteasoma, on inhibeixen les cisteïna i serina proteases. Els resultats donen suport a què la proteïna NPC1 mutada és degradada per la via de la ubiquitina-proteasoma, ja que el tractament amb l'ALLN o el MG132 restableix considerablement els nivells de proteïna NPC1 dels fibroblasts de pacients que presenten les mutacions p.C177Y, p.Q775P, p.A1035V, p.I1061T i p.L1106P. Recentment, s'ha publicat que el tractament amb MG132 de les línies cel·lulars NPC portadores de les mutacions p.Y1019C, p.V1023G, p.I1061T, p.N1156S, p.V1165M, p.L1191F i p.T1205K, deriva en un increment significatiu dels nivells de la proteïna NPC1 mutada (Zampieri et al., 2011).

Els nostres resultats indiquen que l'eficiència dels inhibidors proteasòmics no és del 100%, ja que la quantitat de proteïna NPC1 recuperada no arriba als nivells del control. Una possible explicació podria ser, tal i com s'ha descrit, que es requereix la inhibició de múltiples llocs actius del proteasoma per tal de reduir la degradació proteica de forma considerable (Kisselev et al., 2006). Això planteja que alhora que s'utilitzen l'ALLN i el MG132, que actuen als llocs actius *chymotrypsin-like*, potser es podrien emprar inhibidors que actuïn als llocs *caspase-like* i *trypsin-like*. De tota manera, encara que les nostres dades reforcen el paper de la via proteasòmica en la degradació de NPC1, no exclou la possibilitat que altres proteases puguin també participar en aquest procés, ja sigui de manera independent o cooperant amb el proteasoma. En alguns dels mutants, p.T1066N i p.R1186H, que mostraven reducció de la proteïna NPC1, els inhibidors del proteasoma no són capaços de recuperar la proteïna de manera significativa, per aquest motiu cal considerar l'opció que algunes mutacions de canvi de sentit puguin causar alteracions en altres vies de degradació proteica, com són la lisosòmica o la de les caspases (Sirois et al., 2012).

Està ben documentat que les cèl·lules NPC, tant les que presenten mutacions al gen *NPC1* com al *NPC2*, acumulen colesterol lliure a l'interior dels endosomes tardans i els lisosomes, i com a conseqüència, la formació d'ésters de colesterol i l'homeòstasi d'aquest metabòlit es veuen afectades (Vanier et al., 1991). En la mateixa direcció, resultats recents han mostrat que a la fracció post-nuclear aïllada de cèl·lules NPC, una fracció que conté pràcticament totes les membranes cel·lulars, el nivell de colesterol lliure és molt més elevat que en les cèl·lules control (Sztolsztener et al., 2010). D'acord amb aquesta observació, després de separar la fracció del colesterol associat a les membranes cel·lulars de la soluble per ultracentrifugació i de quantificar el colesterol mitjançant cromatografia de gasos, es va observar que el colesterol estava incrementat en ambdues fraccions aïllades dels fibroblasts de tots els pacients NPC analitzats. Per altra banda, es va apreciar que l'acumulació de colesterol és més rellevant a les formes clíniques infantils (pacients homozigots per les mutacions p.Q775P i p.A1035V) que a la juvenil (pacient homozigot per la mutació p.I1061T).

3 VALORACIÓ DE L'ÚS D'INHIBIDORS DEL PROTEASOMA COM A APROXIMACIÓ TERAPÈUTICA PER A LA MALALTIA DE NIEMANN-PICK TIPUS C

La recuperació parcial dels nivells de la proteïna NPC1 mitjançant el tractament amb inhibidors del proteasoma, obliga a plantejar una pregunta: aquestes proteïnes NPC1 mutades, que ara no són degradades, són funcionals? Per respondre aquest interrogant, es va decidir quantificar el colesterol dels fibroblasts dels pacients NPC després del tractament amb els inhibidors proteasòmics ALLN o MG132. Els resultats van mostrar que la quantitat recuperada de la proteïna NPC1 mutada és capaç de disminuir els nivells de colesterol a totes les línies cel·lulars NPC estudiades (p.Q775P, p.A1035V, p.I1061T, p.T1066N, p.L1106P i p.R1186H). Això obre pas a noves preguntes: les proteïnes NPC1 recuperades com poden realitzar la seva funció, si tot i no ser degradades continuen estant mutades? La resposta rau en què una proteïna estigui mutada no implica que sigui 0% funcional, és possible que aquesta sigui degradada al no passar el control de qualitat del RE, però si s'evita la seva degradació, aquesta pugui ser parcialment funcional; i aquestes proteïnes NPC1 mutades com poden arribar fins al compartiment E/L on han de portar a terme la seva funció? Encara que tota la proteïna NPC1 sintetitzada en un pacient NPC homozigot estigui mutada, només un percentatge d'aquesta serà degradada, ja que la resta es podrà plegar correctament gràcies a l'acció del mecanisme UPR i podrà sortir del RE. Aquesta resposta cel·lular es desencadena per l'acumulació de proteïnes mal plegades (Alberts et al., 2007). Per aquest motiu, quan es bloqueja la degradació proteica, la proteïna mal plegada s'acumula i a continuació la UPR s'activa addicionalment, augmentant així el percentatge de proteïna ben plegada, que ara sí pot ser transportada als compartiments post-RE (Mu et al., 2008).

Les nostres dades estan en consonància amb els resultats obtinguts per Gelsthorpe i col·laboradors, els quals sobreexpressant el mutant per la mutació p.I1061T en cèl·lules deficientes per NPC1 van aconseguir que la proteïna mutada es localitzés als endosomes tardans i es revertís el fenotip NPC mutant. Fet que implica, que probablement una petita proporció de la proteïna mutada és capaç de plegar-se correctament i escapar dels punts de control del RE (Gelsthorpe et al., 2008). En la mateixa línia, Zampieri i col·laboradors van observar, mitjançant el test de la filipina, una reducció del colesterol lliure als fibroblasts NPC que presentaven també la mutació p.I1061T o bé els canvis p.N1156S, p.V1165M i p.L1191F, després de tractar amb MG132. Alhora que van corroborar per immunofluorescència, que aquesta disminució en l'acumulació de colesterol anava associada a la localització correcta de la proteïna NPC1 mutada al compartiment E/L (Zampieri et al., 2011).

Es proporcionen evidències que la degradació proteasòmica és un mecanisme que està implicat en la patogènesi de la malaltia de NPC, i que prevenint aquesta degradació mitjançant l'ús d'inhibidors del proteasoma, és possible restablir els nivells normals de colesterol soluble en algunes línies cel·lulars de NPC. Destacar que està demostrat que l'ALLN i el MG132, a més d'inhibir l'acció del proteasoma, també augmenten els nivells de mRNA de les xaperones del RE, com BiP, Grp94 i ERp72 (Bush et al., 1997). Per tant, desconeixem si l'efecte observat als fibroblasts NPC és conseqüència d'una inhibició directa de la degradació proteasòmica de la proteïna NPC1 o bé d'una inducció de les xaperones endògenes que estabilitzarien a la proteïna protegint-la de la degradació.

Aquests resultats podrien obrir la porta a l'ús dels inhibidors del proteasoma com a futur tractament per la malaltia de NPC causada per determinades mutacions de canvi de sentit. Evidentment, no totes les mutacions de canvi de sentit respondran al tractament, per aquest motiu es tractaria d'una teràpia mutació-depenent. També s'ha de tenir en compte que el fet de disminuir el colesterol possiblement no implicarà la curació de la malaltia, però potser podria rebaixar la severitat dels símptomes i amb això millorar la qualitat de vida dels pacients. A més, igual que en el cas dels inhibidors de les deacetilases d'histones (HDAC) (Pipalia et al., 2011), l'ús terapèutic dels inhibidors del proteasoma planteja controvèrsia: què succeirà amb aquelles proteïnes, que no són la NPC1, que eren eliminades per la cèl·lula i ara no seran degradades? Està clar que a l'arribar a aquest punt, és difícil fer una valoració de la relació risc-benefici. Tot i això, els inhibidors del proteasoma, com el bortezomib (Velcade®), estan emergent com una nova opció de tractament pel càncer (Moore et al., 2008).

CONCLUSIONS

LA CISTINOSI:

- S'han identificat 15 mutacions diferents, 7 de les quals no havien estat descrites: tres mutacions de canvi de sentit, tres delecions i una mutació de *splicing*.
- La delecio de 57 kb és la mutació més freqüent a Espanya (38% dels al·lells) i conjuntament amb altres 5 mutacions representen el 73% dels al·lells estudiats.
- S'ha establert que els pacients amb fenotip clínic infantil tenen a ambdós al·lells mutacions que trunquen o que afecten aminoàcids conservats de les regions transmembrana de la proteïna. En canvi, la mutació p.S139F s'ha associat a la forma juvenil.

LA MALALTIA DE NIEMANN-PICK TIPUS C:

- S'han identificat 74 mutacions diferents, 17 de les quals no havien estat descrites: set mutacions de canvi de sentit, dos mutacions sense sentit, dues insercions, una delecio en pauta, quatre mutacions de *splicing* i la primera gran delecio que afecta al gen *NPC1* i gens flanquejants.
- S'han establert correlacions genotip-fenotip per a un conjunt de mutacions.
- S'han identificat mutacions intròniques profundes i s'ha caracteritzat el seu efecte en el mRNA, conjuntament amb el de les mutacions de *splicing* que afecten als llocs canònics.
- El mecanisme de NMD és el responsable de la degradació del mRNA en tots els al·lells analitzats que codifiquen per un PTC al gen *NPC1*.
- La majoria de mutacions de canvi de sentit analitzades condueixen a una reduccio significativa o a l'absència de la proteïna NPC1, degut a que la proteïna NPC1 mutada és degradada per la via de la ubiquitina-proteasoma.

- La proteïna NPC1 mutada recuperada, després del tractament amb els inhibidors del proteasoma (ALLN i MG132), és capaç de disminuir els nivells de colesterol a totes les línies cel·lulars NPC estudiades. Aquesta observació podria obrir la porta a l'ús d'aquests fàrmacs com a futur tractament per a la malaltia de NPC causada per determinades mutacions de canvi de sentit.

BIBLIOGRAFIA

- Abi-Mosleh, L., Infante, R. E., Radhakrishnan, A., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. (2009). Cyclodextrin overcomes deficient lysosome-to-endoplasmic reticulum transport of cholesterol in Niemann-Pick type C cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(46), 19316-21.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2007). *Molecular biology of the cell*, 5th edn. Garland Science, New York.
- Alcántara-Ortigoza, M. A., Belmont-Martínez, L., Vela-Amieva, M. & González-Del Angel, A. (2008). Analysis of the CTNS gene in nephropathic cystinosis Mexican patients: report of four novel mutations and identification of a false positive 57-kb deletion genotype with LDM-2/exon 4 multiplex PCR assay. *Genetic testing*, *12*(3), 409-14.
- Alfonso, P., Pampín, S., Estrada, J., Rodríguez-Rey, J. C., Giraldo, P., Sancho, J. & Pocoví, M. (2005). Miglustat (NB-DNJ) works as a chaperone for mutated acid beta-glucosidase in cells transfected with several Gaucher disease mutations. *Blood cells, molecules & diseases*, *35*(2), 268-76.
- Alvarez, A. R., Klein, A., Castro, J., Cancino, G. I., Amigo, J., Mosqueira, M., Vargas, L. M., et al. (2008). Imatinib therapy blocks cerebellar apoptosis and improves neurological symptoms in a mouse model of Niemann-Pick type C disease. *FASEB journal*, *22*(10), 3617-27.
- Anikster, Y., Lucero, C., Touchman, J. W., Huizing, M., McDowell, G., Shotelersuk, V., Green, E. D., et al. (1999). Identification and detection of the common 65-kb deletion breakpoint in the nephropathic cystinosis gene (CTNS). *Molecular genetics and metabolism*, *66*(2), 111-6.
- Anikster, Y., Lucero, C., Guo, J., Huizing, M., Shotelersuk, V., Bernardini, I., McDowell, G., et al. (2000). Ocular nonnephropathic cystinosis: clinical, biochemical, and molecular correlations. *Pediatric research*, *47*(1), 17-23.
- Aridor, M. & Hannan, L. A. (2002). Traffic jams II: an update of diseases of intracellular transport. *Traffic*, *3*(11), 781-90.
- Attard, M., Jean, G., Forestier, L., Cherqui, S., van't Hoff, W., Broyer, M., Antignac, C., et al. (1999). Severity of phenotype in cystinosis varies with mutations in the CTNS gene: predicted effect on the model of cystinosin. *Human molecular genetics*, *8*(13), 2507-14.
- Ausseil, J., Desmaris, N., Bigou, S., Attali, R., Corbineau, S., Vitry, S., Parent, M., et al. (2008). Early neurodegeneration progresses independently of microglial activation by heparan sulfate in the brain of mucopolysaccharidosis III B mice. *PLoS one*, *3*(5), e2296.
- Bellettato, C. M. & Scarpa, M. (2010). Pathophysiology of neuropathic lysosomal storage disorders. *Journal of inherited metabolic disease*, *33*(4), 347-62.
- Blom, T. S., Linder, M. D., Snow, K., Pihko, H., Hess, M. W., Jokitalo, E., Veckman, V., et al. (2003). Defective endocytic trafficking of NPC1 and NPC2 underlying infantile Niemann-Pick type C disease. *Human molecular genetics*, *12*(3), 257-72.

- Bourgeois, C. F., Lejeune, F. & Stévenin, J. (2004). Broad specificity of SR (serine/arginine) proteins in the regulation of alternative splicing of pre-messenger RNA. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 78, 37-88.
- Brady, R. O., Kanfer, J. N., Mock, M. B. & Fredrickson, D. S. (1966). The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 55(2), 366-9.
- Braulke, T. & Bonifacino, J. S. (2009). Sorting of lysosomal proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1793(4), 605-14.
- Briese, M., Esmaeili, B. & Sattelle, D. B. (2005). Is spinal muscular atrophy the result of defects in motor neuron processes? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 27(9), 946-57.
- Broyer, M., Guillot, M., Gubler, M. C. & Habib, R. (1981). Infantile cystinosis: a reappraisal of early and late symptoms. *Advances in nephrology from the Necker Hospital*, 10, 137-66.
- Bush, K. T., Goldberg, A. L. & Nigam, S. K. (1997). Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *The Journal of biological chemistry*, 272(14), 9086-92.
- Carstea, E. D., Morris, J. A., Coleman, K. G., Loftus, S. K., Zhang, D., Cummings, C., Gu, J., et al. (1997). Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science*, 277(5323), 228-31.
- Cartegni, L., Chew, S. L. & Krainer, A. R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature reviews. Genetics*, 3(4), 285-98.
- Carter, M. S., Doskow, J., Morris, P., Li, S., Nhim, R. P., Sandstedt, S. & Wilkinson, M. F. (1995). A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 270(48), 28995-9003.
- Carter, M. S., Li, S. & Wilkinson, M. F. (1996). A splicing-dependent regulatory mechanism that detects translation signals. *The EMBO journal*, 15(21), 5965-75.
- Chabli, A., Aupetit, J., Raehm, M., Ricquier, D. & Chadeaux-Vekemans, B. (2007). Measurement of cystine in granulocytes using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical biochemistry*, 40(9-10), 692-8.
- Charrow, J. (2004). Ashkenazi Jewish genetic disorders. *Familial cancer*, 3(3-4), 201-6.
- Cherqui, S., Kalatzis, V., Trugnan, G. & Antignac, C. (2001). The targeting of cystinosis to the lysosomal membrane requires a tyrosine-based signal and a novel sorting motif. *The Journal of biological chemistry*, 276(16), 13314-21.

- Chikh, K., Rodriguez, C., Vey, S., Vanier, M. T. & Millat, G. (2005). Niemann-Pick type C disease: subcellular location and functional characterization of NPC2 proteins with naturally occurring missense mutations. *Human mutation*, 26(1), 20-8.
- Ciechanover, A. (2006). Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Experimental biology and medicine*, 231(7), 1197-211.
- Coleman, M. (2005). Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nature reviews. Neuroscience*, 6(11), 889-98.
- Crocker, A. C. (1961). The cerebral defect in Tay-Sachs disease and Niemann-Pick disease. *Journal of neurochemistry*, 7, 69-80.
- Cruz, J. C. & Chang, T. Y. (2000). Fate of endogenously synthesized cholesterol in Niemann-Pick type C1 cells. *The Journal of biological chemistry*, 275(52), 41309-16.
- David, A., Srirangalingam, U., Metherell, L. A., Khoo, B. & Clark, A. J. L. (2010). Repair of aberrant splicing in growth hormone receptor by antisense oligonucleotides targeting the splice sites of a pseudoexon. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 95(7), 3542-6.
- Davidson, C. D., Ali, N. F., Micsenyi, M. C., Stephney, G., Renault, S., Dobrenis, K., Ory, D. S., et al. (2009). Chronic cyclodextrin treatment of murine Niemann-Pick C disease ameliorates neuronal cholesterol and glycosphingolipid storage and disease progression. *PloS one*, 4(9), e6951.
- Davies, J. P. & Ioannou, Y. A. (2000). Topological analysis of Niemann-Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activating. *The Journal of biological chemistry*, 275(32), 24367-74.
- Davis, R. L., Homer, V. M., George, P. M. & Brennan, S. O. (2009). A deep intronic mutation in FGB creates a consensus exonic splicing enhancer motif that results in afibrinogenemia caused by aberrant mRNA splicing, which can be corrected in vitro with antisense oligonucleotide treatment. *Human mutation*, 30(2), 221-7.
- de Graaf-Hess, A., Trijbels, F. & Blom, H. (1999). New method for determining cystine in leukocytes and fibroblasts. *Clinical chemistry*, 45(12), 2224-8.
- Deffieu, M. S. & Pfeffer, S. R. (2011). Niemann-Pick type C 1 function requires luminal domain residues that mediate cholesterol-dependent NPC2 binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(47), 18932-6.
- Desnick, R. J., Thorpe, S. R. & Fiddler, M. B. (1976). Toward enzyme therapy for lysosomal storage diseases. *Physiological reviews*, 56(1), 57-99.
- Di Leo, E., Panico, F., Tarugi, P., Battisti, C., Federico, A. & Calandra, S. (2004). A point mutation in the lariat branch point of intron 6 of NPC1 as the cause of abnormal pre-mRNA splicing in Niemann-Pick type C disease. *Human mutation*, 24(5), 440.

- Du, L., Pollard, J. M. & Gatti, R. A. (2007). Correction of prototypic ATM splicing mutations and aberrant ATM function with antisense morpholino oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(14), 6007-12.
- Du, X., Kumar, J., Ferguson, C., Schulz, T. A., Ong, Y. S., Hong, W., Prinz, W. A., et al. (2011). A role for oxysterol-binding protein-related protein 5 in endosomal cholesterol trafficking. *The Journal of cell biology*, 192(1), 121-35.
- Fanello, T., Dardis, A., Rosano, C., Tarugi, P., Tappino, B., Zampieri, S., Pinotti, E., et al. (2009). Molecular analysis of NPC1 and NPC2 gene in 34 Niemann-Pick C Italian patients: identification and structural modeling of novel mutations. *Neurogenetics*, 10(3), 229-39.
- Fernandez-Valero, E. M., Ballart, A., Iturriaga, C., Lluch, M., Macias, J., Vanier, M. T., Pineda, M., et al. (2005). Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: genotype-phenotype correlations. *Clinical genetics*, 68(3), 245-54.
- Forestier, L., Jean, G., Attard, M., Cherqui, S., Lewis, C., van't Hoff, W., Broyer, M., et al. (1999). Molecular characterization of CTNS deletions in nephropathic cystinosis: development of a PCR-based detection assay. *American journal of human genetics*, 65(2), 353-9.
- Futerman, A. H. & van Meer, G. (2004). The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(7), 554-65.
- Gahl, W. A., Tietze, F., Butler, J. D. & Schulman, J. D. (1985). Cysteamine depletes cystinotic leucocyte granular fractions of cystine by the mechanism of disulphide interchange. *The Biochemical journal*, 228(3), 545-50.
- Gahl, W. A., Thoene, J. G. & Schneider, J. A. (2001). Cystinosis: a disorder of lysosomal membrane transport. In: Scriver, C. J., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D. eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, 5085-5108.
- Gahl, W. A., Thoene, J. G. & Schneider, J. A. (2002). Cystinosis. *The New England journal of medicine*, 347(2), 111-21.
- Gahl, W. A., Balog, J. Z. & Kleta, R. (2007). Nephropathic cystinosis in adults: natural history and effects of oral cysteamine therapy. *Annals of internal medicine*, 147(4), 242-50.
- Gartner, J. C., Bergman, I., Malatack, J. J., Zitelli, B. J., Jaffe, R., Watkins, J. B., Shaw, B. W., et al. (1986). Progression of neurovisceral storage disease with supranuclear ophthalmoplegia following orthotopic liver transplantation. *Pediatrics*, 77(1), 104-6.
- Garver, W. S., Jelinek, D., Meaney, F. J., Flynn, J., Pettit, K. M., Shepherd, G., Heidenreich, R. A., et al. (2010). The National Niemann-Pick Type C1 Disease Database: correlation of lipid profiles, mutations, and biochemical phenotypes. *Journal of lipid research*, 51(2), 406-15.

- Gelsthorpe, M. E., Baumann, N., Millard, E., Gale, S. E., Langmade, S. J., Schaffer, J. E. & Ory, D. S. (2008). Niemann-Pick type C1 I1061T mutant encodes a functional protein that is selected for endoplasmic reticulum-associated degradation due to protein misfolding. *The Journal of biological chemistry*, 283(13), 8229-36.
- Goldberg, A. L. (2007). Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochemical Society transactions*, 35(1), 12-7.
- Gort, L., Duque, J., Fabeiro, J. M., Zulaica, A., Coll, M. J. & Chabás, A. (2006). Molecular analysis in two beta-mannosidosis patients: description of a new adult case. *Molecular genetics and metabolism*, 89(4), 398-400.
- Graveley, B. R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA*, 6(9), 1197-211.
- Greer, W. L., Riddell, D. C., Gillan, T. L., Girouard, G. S., Sparrow, S. M., Byers, D. M., Dobson, M. J., et al. (1998). The Nova Scotia (type D) form of Niemann-Pick disease is caused by a G3097-->T transversion in NPC1. *American journal of human genetics*, 63(1), 52-4.
- Greer, W. L., Dobson, M. J., Girouard, G. S., Byers, D. M., Riddell, D. C. & Neumann, P. E. (1999). Mutations in NPC1 highlight a conserved NPC1-specific cysteine-rich domain. *American journal of human genetics*, 65(5), 1252-60.
- Gruenberg, J. & Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(4), 317-23.
- Gurvich, O. L., Tuohy, T. M., Howard, M. T., Finkel, R. S., Medne, L., Anderson, C. B., Weiss, R. B., et al. (2008). DMD pseudoexon mutations: splicing efficiency, phenotype, and potential therapy. *Annals of neurology*, 63(1), 81-9.
- Hastings, M. L. & Krainer, A. R. (2001). Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Current opinion in cell biology*, 13(3), 302-9.
- Heil, S. G., Levtchenko, E., Monnens, L. A., Trijbels, F. J., Van der Put, N. M. & Blom, H. J. (2001). The molecular basis of Dutch infantile nephropathic cystinosis. *Nephron*, 89(1), 50-5.
- Hers, H.G. & Van Hoof, F. (1973). Lysosomes and storage diseases. Academic Press, New York.
- Higgins, M. E., Davies, J. P., Chen, F. W. & Ioannou, Y. A. (1999). Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network. *Molecular genetics and metabolism*, 68(1), 1-13.
- Holbrook, J. A., Neu-Yilik, G., Hentze, M. W. & Kulozik, A. E. (2004). Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nature genetics*, 36(8), 801-8.
- Hollak, C. E., van Weely, S., van Oers, M. H. & Aerts, J. M. (1994). Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *The Journal of clinical investigation*, 93(3), 1288-92.

- Hsu, Y. S., Hwu, W. L., Huang, S. F., Lu, M. Y., Chen, R. L., Lin, D. T., Peng, S. S., et al. (1999). Niemann-Pick disease type C (a cellular cholesterol lipidosis) treated by bone marrow transplantation. *Bone marrow transplantation*, 24(1), 103-7.
- Hunziker, W. & Geuze, H. J. (1996). Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 18(5), 379-89.
- Imrie, J., Dasgupta, S., Besley, G. T. N., Harris, C., Heptinstall, L., Knight, S., Vanier, M. T., et al. (2007). The natural history of Niemann-Pick disease type C in the UK. *Journal of inherited metabolic disease*, 30(1), 51-9.
- Inácio, A., Silva, A. L., Pinto, J., Ji, X., Morgado, A., Almeida, F., Faustino, P., et al. (2004). Nonsense mutations in close proximity to the initiation codon fail to trigger full nonsense-mediated mRNA decay. *The Journal of biological chemistry*, 279(31), 32170-80.
- Infante, R. E., Radhakrishnan, A., Abi-Mosleh, L., Kinch, L. N., Wang, M. L., Grishin, N. V., Goldstein, J. L., et al. (2008). Purified NPC1 protein: II. Localization of sterol binding to a 240-amino acid soluble luminal loop. *The Journal of biological chemistry*, 283(2), 1064-75.
- Isken, O. & Maquat, L. E. (2007). Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes & development*, 21(15), 1833-56.
- Isken, O. & Maquat, L. E. (2008). The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation. *Nature reviews. Genetics*, 9(9), 699-712.
- Iturriaga, C., Pineda, M., Fernández-Valero, E. M., Vanier, M. T. & Coll, M. J. (2006). Niemann-Pick C disease in Spain: clinical spectrum and development of a disability scale. *Journal of the neurological sciences*, 249(1), 1-6.
- Ivanov, P. V., Gehring, N. H., Kunz, J. B., Hentze, M. W. & Kulozik, A. E. (2008). Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *The EMBO journal*, 27(5), 736-47.
- Jiang, X., Sidhu, R., Porter, F. D., Yanjanin, N. M., Speak, A. O., te Vruchte, D. T., Platt, F. M., et al. (2011). A sensitive and specific LC-MS/MS method for rapid diagnosis of Niemann-Pick C1 disease from human plasma. *The Journal of Lipid Research*, 52(7), 1435-1445.
- Kågedal, K., Zhao, M., Svensson, I. & Brunk, U. T. (2001). Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *The Biochemical journal*, 359(2), 335-43.
- Kalatzis, V., Cherqui, S., Antignac, C. & Gasnier, B. (2001). Cystinosis, the protein defective in cystinosis, is a H(+)-driven lysosomal cystine transporter. *The EMBO journal*, 20(21), 5940-9.
- Kalatzis, V. & Antignac, C. (2002). Cystinosis: from gene to disease. *Nephrology, dialysis, transplantation*, 17(11), 1883-6.

- Kalatzis, V., Cohen-Solal, L., Cordier, B., Frishberg, Y., Kemper, M., Nuutinen, E. M., Legrand, E., et al. (2002). Identification of 14 novel CTNS mutations and characterization of seven splice site mutations associated with cystinosis. *Human mutation*, 20(6), 439-46.
- Kalatzis, V., Nevo, N., Cherqui, S., Gasnier, B. & Antignac, C. (2004). Molecular pathogenesis of cystinosis: effect of CTNS mutations on the transport activity and subcellular localization of cystinosin. *Human molecular genetics*, 13(13), 1361-71.
- Kaminski, W. E., Klünemann, H. H., Ibach, B., Aslanidis, C., Klein, H. E. & Schmitz, G. (2002). Identification of novel mutations in the NPC1 gene in German patients with Niemann-Pick C disease. *Journal of inherited metabolic disease*, 25(5), 385-9.
- Kaufman, R. J. (1999). Correction of genetic disease by making sense from nonsense. *The Journal of clinical investigation*, 104(4), 367-8.
- Kelly, D. A., Portmann, B., Mowat, A. P., Sherlock, S. & Lake, B. D. (1993). Niemann-Pick disease type C: diagnosis and outcome in children, with particular reference to liver disease. *The Journal of pediatrics*, 123(2), 242-7.
- Keren, H., Lev-Maor, G. & Ast, G. (2010). Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nature reviews. Genetics*, 11(5), 345-55.
- Kiehntopf, M., Schickel, J., Gönne, B. von der, Koch, H. G., Superti-Furga, A., Steinmann, B., Deufel, T., et al. (2002). Analysis of the CTNS gene in patients of German and Swiss origin with nephropathic cystinosis. *Human mutation*, 20(3), 237.
- Kisselev, A. F., Callard, A. & Goldberg, A. L. (2006). Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *The Journal of biological chemistry*, 281(13), 8582-90.
- Ko, D. C., Binkley, J., Sidow, A. & Scott, M. P. (2003). The integrity of a cholesterol-binding pocket in Niemann-Pick C2 protein is necessary to control lysosome cholesterol levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2518-25.
- Kostova, Z. & Wolf, D. H. (2003). For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *The EMBO journal*, 22(10), 2309-17.
- Krawczak, M., Reiss, J. & Cooper, D. N. (1992). The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Human genetics*, 90(1-2), 41-54.
- Kwon, H. J., Abi-Mosleh, L., Wang, M. L., Deisenhofer, J., Goldstein, J. L., Brown, M. S. & Infante, R. E. (2009). Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell*, 137(7), 1213-24.
- Lejeune, F., Li, X. & Maquat, L. E. (2003). Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Molecular cell*, 12(3), 675-87.

- Lin, M. T. & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, *443*(7113), 787-95.
- Linde, L., Boelz, S., Neu-Yilik, G., Kulozik, A. E. & Kerem, B. (2007). The efficiency of nonsense-mediated mRNA decay is an inherent character and varies among different cells. *European journal of human genetics*, *15*(11), 1156-62.
- Lloyd-Evans, E., Morgan, A. J., He, X., Smith, D. A., Elliot-Smith, E., Sillence, D. J., Churchill, G. C., et al. (2008). Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nature medicine*, *14*(11), 1247-55.
- Lloyd-Evans, E. & Platt, F. M. (2010). Lipids on trial: the search for the offending metabolite in Niemann-Pick type C disease. *Traffic*, *11*(4), 419-28.
- Lopez, A. J. (1998). Alternative splicing of pre-mRNA: Developmental Consequences and Mechanisms of Regulation. *Annual Review of Genetics*, *32*(1), 279-305.
- López-Bigas, N., Audit, B., Ouzounis, C., Parra, G. & Guigó, R. (2005). Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? *FEBS letters*, *579*(9), 1900-3.
- Maquat, L. E. (1995). When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells. *RNA*, *1*(5), 453-65.
- Maquat, L. E. & Li, X. (2001). Mammalian heat shock p70 and histone H4 transcripts, which derive from naturally intronless genes, are immune to nonsense-mediated decay. *RNA*, *7*(3), 445-56.
- Maquat, L. E. (2002). Nonsense-mediated mRNA decay. *Current biology*, *12*(6), R196-7.
- Maquat, L. E. (2004). Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *5*(2), 89-99.
- Martin, S. & Parton, R. G. (2006). Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *7*(5), 373-8.
- Mason, S., Pepe, G., Dall'Amico, R., Tartaglia, S., Casciani, S., Greco, M., Bencivenga, P., et al. (2003). Mutational spectrum of the CTNS gene in Italy. *European journal of human genetics*, *11*(7), 503-8.
- Mattson, M. P. (2007). Calcium and neurodegeneration. *Aging cell*, *6*(3), 337-50.
- Mellon, S. H., Gong, W. & Schonemann, M. D. (2008). Endogenous and synthetic neurosteroids in treatment of Niemann-Pick Type C disease. *Brain research reviews*, *57*(2), 410-20.
- Mesmin, B. & Maxfield, F. R. (2009). Intracellular sterol dynamics. *Biochimica et biophysica acta*, *1791*(7), 636-45.

- Millat, G., Marçais, C., Rafi, M. A., Yamamoto, T., Morris, J. A., Pentchev, P. G., Ohno, K., et al. (1999). Niemann-Pick C1 disease: the I1061T substitution is a frequent mutant allele in patients of Western European descent and correlates with a classic juvenile phenotype. *American journal of human genetics*, 65(5), 1321-9.
- Millat, G., Marçais, C., Tomasetto, C., Chikh, K., Fensom, A. H., Harzer, K., Wenger, D. A., et al. (2001a). Niemann-Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop. *American journal of human genetics*, 68(6), 1373-85.
- Millat, G., Chikh, K., Naureckiene, S., Sleat, D. E., Fensom, A. H., Higaki, K., Elleder, M., et al. (2001b). Niemann-Pick disease type C: spectrum of HE1 mutations and genotype/phenotype correlations in the NPC2 group. *American journal of human genetics*, 69(5), 1013-21.
- Millat, G., Bailo, N., Molinero, S., Rodriguez, C., Chikh, K. & Vanier, M. T. (2005). Niemann-Pick C disease: use of denaturing high performance liquid chromatography for the detection of NPC1 and NPC2 genetic variations and impact on management of patients and families. *Molecular genetics and metabolism*, 86(1-2), 220-32.
- Moore, B. S., Eustáquio, A. S. & McGlinchey, R. P. (2008). Advances in and applications of proteasome inhibitors. *Current opinion in chemical biology*, 12(4), 434-40.
- Moore, M. J. (2005). From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science*, 309(5740), 1514-8.
- Mu, T. W., Ong, D. S. T., Wang, Y.J., Balch, W. E., Yates, J. R., Segatori, L. & Kelly, J. W. (2008). Chemical and biological approaches synergize to ameliorate protein-folding diseases. *Cell*, 134(5), 769-81.
- Mullins, C. & Bonifacino, J. S. (2001). The molecular machinery for lysosome biogenesis. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 23(4), 333-43.
- Nagy, E. & Maquat, L. E. (1998). A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends in biochemical sciences*, 23(6), 198-9.
- Narita, K., Choudhury, A., Dobrenis, K., Sharma, D. K., Holicky, E. L., Marks, D. L., Walkley, S. U., et al. (2005). Protein transduction of Rab9 in Niemann-Pick C cells reduces cholesterol storage. *FASEB journal*, 19(11), 1558-60.
- Naureckiene, S., Sleat, D. E., Lackland, H., Fensom, A., Vanier, M. T., Wattiaux, R., Jadot, M., et al. (2000). Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science*, 290(5500), 2298-301.
- Neufeld, E. B., Wastney, M., Patel, S., Suresh, S., Cooney, A. M., Dwyer, N. K., Roff, C. F., et al. (1999). The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. *The Journal of biological chemistry*, 274(14), 9627-35.

- Nicholson, P., Yepiskoposyan, H., Metze, S., Zamudio Orozco, R., Kleinschmidt, N. & Mühlemann, O. (2010). Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. *Cellular and molecular life sciences*, 67(5), 677-700.
- Oshima, R. G., Willis, R. C., Furlong, C. E. & Schneider, J. A. (1974). Binding assays for amino acids. The utilization of a cystine binding protein from *Escherichia coli* for the determination of acid-soluble cystine in small physiological samples. *The Journal of biological chemistry*, 249(19), 6033-9.
- Pagani, F. & Baralle, F. E. (2004). Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nature reviews. Genetics*, 5(5), 389-96.
- Park, W. D., O'Brien, J. F., Lundquist, P. A., Kraft, D. L., Vockley, C. W., Karnes, P. S., Patterson, M. C., et al. (2003). Identification of 58 novel mutations in Niemann-Pick disease type C: correlation with biochemical phenotype and importance of PTC1-like domains in NPC1. *Human mutation*, 22(4), 313-25.
- Patterson, M. C., Di Bisceglie, A. M., Higgins, J. J., Abel, R. B., Schiffmann, R., Parker, C. C., Argoff, C. E., et al. (1993). The effect of cholesterol-lowering agents on hepatic and plasma cholesterol in Niemann-Pick disease type C. *Neurology*, 43(1), 61-4.
- Patterson, M. C., Vanier, M. T., Suzuki, K., Morris, J. A., Carstea, E., Neufeld, E. B., Blanchette-Mackie, J. E. & Pentchev, P. (2001). Niemann-Pick disease type C: a lipid trafficking disorder. In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D. eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, 3611–3634.
- Patterson, M. C., Vecchio, D., Prady, H., Abel, L. & Wraith, J. E. (2007). Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. *Lancet neurology*, 6(9), 765-72.
- Patterson, M. C., Hendriksz, C. J., Walterfang, M., Sedel, F., Vanier, M. T. & Wijburg, F. (2012). Recommendations for the diagnosis and management of Niemann–Pick disease type C: An update. *Molecular Genetics and Metabolism*. doi:10.1016/j.ymgme. 2012.03.012.
- Peabody, D. S. & Berg, P. (1986). Termination-reinitiation occurs in the translation of mammalian cell mRNAs. *Molecular and cellular biology*, 6(7), 2695-703.
- Pentchev, P. G., Boothe, A. D., Kruth, H. S., Weintraub, H., Stivers, J. & Brady, R. O. (1984). A genetic storage disorder in BALB/C mice with a metabolic block in esterification of exogenous cholesterol. *The Journal of biological chemistry*, 259(9), 5784-91.
- Pérez, B., Rincón, A., Jorge-Finnigan, A., Richard, E., Merinero, B., Ugarte, M. & Desviat, L. R. (2009). Pseudoexon exclusion by antisense therapy in methylmalonic aciduria (MMAuria). *Human mutation*, 30(12), 1676-82.
- Pérez-Poyato, M. S. & Pineda, M. (2011). New agents and approaches to treatment in Niemann-Pick type C disease. *Current pharmaceutical biotechnology*, 12(6), 897-901.

- Periyasamy-Thandavan, S., Jiang, M., Schoenlein, P. & Dong, Z. (2009). Autophagy: molecular machinery, regulation, and implications for renal pathophysiology. *American journal of physiology. Renal physiology*, 297(2), F244-56.
- Phornphutkul, C., Anikster, Y., Huizing, M., Braun, P., Brodie, C., Chou, J. Y. & Gahl, W. A. (2001). The promoter of a lysosomal membrane transporter gene, CTNS, binds Sp-1, shares sequences with the promoter of an adjacent gene, CARKL, and causes cystinosis if mutated in a critical region. *American journal of human genetics*, 69(4), 712-21.
- Pineda, M., Wraith, J. E., Mengel, E., Sedel, F., Hwu, W.-L., Rohrbach, M., Bembi, B., et al. (2009). Miglustat in patients with Niemann-Pick disease Type C (NP-C): a multicenter observational retrospective cohort study. *Molecular genetics and metabolism*, 98(3), 243-9.
- Pineda, M., Perez-Poyato, M. S., O'Callaghan, M., Vilaseca, M. A., Pocovi, M., Domingo, R., Portal, L. R., et al. (2010). Clinical experience with miglustat therapy in pediatric patients with Niemann-Pick disease type C: a case series. *Molecular genetics and metabolism*, 99(4), 358-66.
- Pintos, G. (2003). Cystinosis: from cystine crystals to the cystinosin. *Nefrología : publicación oficial de la Sociedad Española Nefrología*, 23 Suppl 1, 60-70.
- Pipalia, N. H., Cosner, C. C., Huang, A., Chatterjee, A., Bourbon, P., Farley, N., Helquist, P., et al. (2011). Histone deacetylase inhibitor treatment dramatically reduces cholesterol accumulation in Niemann-Pick type C1 mutant human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(14), 5620-5.
- Platt, F.M. & Walkley, S.U. (2004). Lysosomal defects and storage. In: Platt, F.M., Walkley, S.U. eds. *Lysosomal Disorders of the Brain: Recent Advances in Molecular and Cellular Pathogenesis and Treatment*, 1st edn. Oxford University Press, New York, 32-49.
- Porter, F. D., Scherrer, D. E., Lanier, M. H., Langmade, S. J., Molugu, V., Gale, S. E., Olzeski, D., et al. (2010). Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease. *Science translational medicine*, 2(56), 56ra81.
- Pros, E., Fernández-Rodríguez, J., Canet, B., Benito, L., Sánchez, A., Benavides, A., Ramos, F. J., et al. (2009). Antisense therapeutics for neurofibromatosis type 1 caused by deep intronic mutations. *Human mutation*, 30(3), 454-62.
- Ranum, L. P. W. & Cooper, T. A. (2006). RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annual review of neuroscience*, 29, 259-77.
- Reed, R. (1996). Initial splice-site recognition and pairing during pre-mRNA splicing. *Current opinion in genetics & development*, 6(2), 215-20.
- Ribeiro, I., Marcão, A., Amaral, O., Sá Miranda, M. C., Vanier, M. T. & Millat, G. (2001). Niemann-Pick type C disease: NPC1 mutations associated with severe and mild cellular cholesterol trafficking alterations. *Human genetics*, 109(1), 24-32.

- Ries, M., Schaefer, E., Lührs, T., Mani, L., Kuhn, J., Vanier, M. T., Krummenauer, F., et al. (2006). Critical assessment of chitotriosidase analysis in the rational laboratory diagnosis of children with Gaucher disease and Niemann-Pick disease type A/B and C. *Journal of inherited metabolic disease*, *29*(5), 647-52.
- Rincón, A., Aguado, C., Desviat, L. R., Sánchez-Alcudia, R., Ugarte, M. & Pérez, B. (2007). Propionic and methylmalonic acidemia: antisense therapeutics for intronic variations causing aberrantly spliced messenger RNA. *American journal of human genetics*, *81*(6), 1262-70.
- Rodríguez-Pascau, L., Coll, M. J., Vilageliu, L. & Grinberg, D. (2009). Antisense oligonucleotide treatment for a pseudoexon-generating mutation in the NPC1 gene causing Niemann-Pick type C disease. *Human mutation*, *30*(11), E993-E1001.
- Rubinsztein, D. C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, *443*(7113), 780-6.
- Saftig, P. & Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *10*(9), 623-35.
- Sánchez-Alcudia, R., Pérez, B., Ugarte, M. & Desviat, L. R. (2012). Feasibility of nonsense mutation readthrough as a novel therapeutical approach in propionic acidemia. *Human mutation*, *33*(6), 973-80.
- Sandhoff, K. & Kolter, T. (1996). Topology of glycosphingolipid degradation. *Trends in cell biology*, *6*(3), 98-103.
- Sanford, J. R., Longman, D. & Cáceres, J. F. (2003). Multiple roles of the SR protein family in splicing regulation. *Progress in molecular and subcellular biology*, *31*, 33-58.
- Schiffmann, R. (1996). Niemann-Pick disease type C. From bench to bedside. *The journal of the American Medical Association*, *276*(7), 561-4.
- Settembre, C., Fraldi, A., Rubinsztein, D. C. & Ballabio, A. (2008). Lysosomal storage diseases as disorders of autophagy. *Autophagy*, *4*(1), 113-4.
- Sévin, M., Lesca, G., Baumann, N., Millat, G., Lyon-Caen, O., Vanier, M. T. & Sedel, F. (2007). The adult form of Niemann-Pick disease type C. *Brain*, *130*(1), 120-33.
- Shotelersuk, V., Larson, D., Anikster, Y., McDowell, G., Lemons, R., Bernardini, I., Guo, J., et al. (1998). CTNS mutations in an American-based population of cystinosis patients. *American journal of human genetics*, *63*(5), 1352-62.
- Silva, A. L., Ribeiro, P., Inácio, A., Liebhaber, S. A. & Romão, L. (2008). Proximity of the poly(A)-binding protein to a premature termination codon inhibits mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *RNA*, *14*(3), 563-76.
- Sirois, I., Groleau, J., Pallet, N., Brassard, N., Hamelin, K., Londono, I., Pshezhetsky, A. V., et al. (2012). Caspase activation regulates the extracellular export of autophagic vacuoles. *Autophagy*, *8*(6).

- Sitia, R. & Braakman, I. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature*, *426*(6968), 891-4.
- Smith, C. W. & Valcárcel, J. (2000). Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends in biochemical sciences*, *25*(8), 381-8.
- Smith, D., Wallom, K. L., Williams, I. M., Jeyakumar, M. & Platt, F. M. (2009). Beneficial effects of anti-inflammatory therapy in a mouse model of Niemann-Pick disease type C1. *Neurobiology of disease*, *36*(2), 242-51.
- Smolin, L. A., Clark, K. F. & Schneider, J. A. (1987). An improved method for heterozygote detection of cystinosis, using polymorphonuclear leukocytes. *American journal of human genetics*, *41*(2), 266-75.
- Solomon, D., Winkelman, A. C., Zee, D. S., Gray, L. & Büttner-Ennever, J. (2005). Niemann-Pick type C disease in two affected sisters: ocular motor recordings and brain-stem neuropathology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1039*, 436-45.
- Storch, J. & Xu, Z. (2009). Niemann-Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking. *Biochimica et biophysica acta*, *1791*(7), 671-8.
- Subramanian, K. & Balch, W. E. (2008). NPC1/NPC2 function as a tag team duo to mobilize cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(40), 15223-4.
- Sun, X., Marks, D. L., Park, W. D., Wheatley, C. L., Puri, V., O'Brien, J. F., Kraft, D. L., et al. (2001). Niemann-Pick C variant detection by altered sphingolipid trafficking and correlation with mutations within a specific domain of NPC1. *American journal of human genetics*, *68*(6), 1361-72.
- Sztolsztener, M. E., Strzelecka-Kiliszek, A., Pikula, S., Tyłki-Szymanska, A. & Bandorowicz-Pikula, J. (2010). Cholesterol as a factor regulating intracellular localization of annexin A6 in Niemann-Pick type C human skin fibroblasts. *Archives of biochemistry and biophysics*, *493*(2), 221-33.
- Taranta, A., Petrini, S., Palma, A., Mannucci, L., Wilmer, M. J., De Luca, V., Diomedi-Camassei, F., et al. (2008). Identification and subcellular localization of a new cystinosis isoform. *American journal of physiology. Renal physiology*, *294*(5), F1101-8.
- Tarugi, P., Ballarini, G., Bembi, B., Battisti, C., Palmeri, S., Panzani, F., Di Leo, E., et al. (2002). Niemann-Pick type C disease: mutations of NPC1 gene and evidence of abnormal expression of some mutant alleles in fibroblasts. *Journal of lipid research*, *43*(11), 1908-19.
- te Vrugte, D., Lloyd-Evans, E., Veldman, R. J., Neville, D. C. A., Dwek, R. A., Platt, F. M., van Blitterswijk, W. J., et al. (2004). Accumulation of glycosphingolipids in Niemann-Pick C disease disrupts endosomal transport. *The Journal of biological chemistry*, *279*(25), 26167-75.

- Thoene, J., Lemons, R., Anikster, Y., Mullet, J., Paelicke, K., Lucero, C., Gahl, W., et al. (1999). Mutations of CTNS causing intermediate cystinosis. *Molecular genetics and metabolism*, 67(4), 283-93.
- Touchman, J. W., Anikster, Y., Dietrich, N. L., Maduro, V. V., McDowell, G., Shotelersuk, V., Bouffard, G. G., et al. (2000). The genomic region encompassing the nephropathic cystinosis gene (CTNS): complete sequencing of a 200-kb segment and discovery of a novel gene within the common cystinosis-causing deletion. *Genome research*, 10(2), 165-73.
- Town, M., Jean, G., Cherqui, S., Attard, M., Forestier, L., Whitmore, S. A., Callen, D. F., et al. (1998). A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nature genetics*, 18(4), 319-24.
- Trushina, E., Singh, R. D., Dyer, R. B., Cao, S., Shah, V. H., Parton, R. G., Pagano, R. E., et al. (2006). Mutant huntingtin inhibits clathrin-independent endocytosis and causes accumulation of cholesterol in vitro and in vivo. *Human molecular genetics*, 15(24), 3578-91.
- van der Spoel, A. C., Mott, R. & Platt, F. M. (2008). Differential sensitivity of mouse strains to an N-alkylated imino sugar: glycosphingolipid metabolism and acrosome formation. *Pharmacogenomics*, 9(6), 717-31.
- Vanier, M. T., Wenger, D. A., Comly, M. E., Rousson, R., Brady, R. O. & Pentchev, P. G. (1988). Niemann-Pick disease group C: clinical variability and diagnosis based on defective cholesterol esterification. A collaborative study on 70 patients. *Clinical genetics*, 33(5), 331-48.
- Vanier, M. T., Rodriguez-Lafrasse, C., Rousson, R., Gazzah, N., Juge, M. C., Pentchev, P. G., Revol, A., et al. (1991). Type C Niemann-Pick disease: spectrum of phenotypic variation in disruption of intracellular LDL-derived cholesterol processing. *Biochimica et biophysica acta*, 1096(4), 328-37.
- Vanier, M. T. & Suzuki, K. (1996). Niemann-Pick diseases. In: Moser, H. W. ed. Neurodystrophies and neuropilidoses: handbook of clinical neurology, Vol.66. Elsevier Science, Amsterdam, 133-162.
- Vanier, M. T. & Millat, G. (2003). Niemann-Pick disease type C. *Clinical genetics*, 64(4), 269-81.
- Vanier, M. T. & Millat, G. (2004). Structure and function of the NPC2 protein. *Biochimica et biophysica acta*, 1685(1-3), 14-21.
- Vanier, M. T. (2010). Niemann-Pick disease type C. *Orphanet journal of rare diseases*, 5, 16.
- Vega, A. I., Pérez-Cerdá, C., Desviat, L. R., Matthijs, G., Ugarte, M. & Pérez, B. (2009). Functional analysis of three splicing mutations identified in the PMM2 gene: toward a new therapy for congenital disorder of glycosylation type Ia. *Human mutation*, 30(5), 795-803.
- Vellodi, A. (2005). Lysosomal storage disorders. *British journal of haematology*, 128(4), 413-31.
- Verot, L., Chikh, K., Freydière, E., Honoré, R., Vanier, M. T. & Millat, G. (2007). Niemann-Pick C disease: functional characterization of three NPC2 mutations and clinical and molecular update on patients with NPC2. *Clinical genetics*, 71(4), 320-30.

- Vetrini, F., Tammaro, R., Bondanza, S., Surace, E. M., Auricchio, A., De Luca, M., Ballabio, A., et al. (2006). Aberrant splicing in the ocular albinism type 1 gene (OA1/GPR143) is corrected in vitro by morpholino antisense oligonucleotides. *Human mutation*, 27(5), 420-6.
- Vilaseca, M. A., Camacho, J. A., Briones, P., Farré, C. & Mas, A. (1995). Biochemical follow-up in late-treated nephropathic cystinosis. *Journal of inherited metabolic disease*, 18(2), 147-50.
- Walkley, S. U. (2007). Pathogenic mechanisms in lysosomal disease: a reappraisal of the role of the lysosome. *Acta paediatrica. Supplement*, 96(455), 26-32.
- Walkley, S. U. & Vanier, M. T. (2009). Secondary lipid accumulation in lysosomal disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1793(4), 726-36.
- Walter, M., Chen, F. W., Tamari, F., Wang, R. & Ioannou, Y. A. (2009). Endosomal lipid accumulation in NPC1 leads to inhibition of PKC, hypophosphorylation of vimentin and Rab9 entrapment. *Biology of the cell*, 101(3), 141-52.
- Wamelink, M. M. C., Struys, E. A., Jansen, E. E. W., Levtchenko, E. N., Zijlstra, F. S. M., Engelke, U., Blom, H. J., et al. (2008). Sedoheptulokinase deficiency due to a 57-kb deletion in cystinosis patients causes urinary accumulation of sedoheptulose: elucidation of the CARKL gene. *Human mutation*, 29(4), 532-6.
- Wang, G. S. & Cooper, T. A. (2007). Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nature reviews. Genetics*, 8(10), 749-61.
- Wang, M. L., Motamed, M., Infante, R. E., Abi-Mosleh, L., Kwon, H. J., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. (2010). Identification of surface residues on Niemann-Pick C2 essential for hydrophobic handoff of cholesterol to NPC1 in lysosomes. *Cell metabolism*, 12(2), 166-73.
- Wang, Y., Babánková, D., Huang, J., Swain, G. M. & Wang, D. H. (2008). Deletion of transient receptor potential vanilloid type 1 receptors exaggerates renal damage in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Hypertension*, 52(2), 264-70.
- Ward, S., O'Donnell, P., Fernandez, S. & Vite, C. H. (2010). 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin raises hearing threshold in normal cats and in cats with Niemann-Pick type C disease. *Pediatric research*, 68(1), 52-6.
- Welch, E. M., Barton, E. R., Zhuo, J., Tomizawa, Y., Friesen, W. J., Trifillis, P., Paushkin, S., et al. (2007). PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*, 447(7140), 87-91.
- White, N. M., Corey, D. A. & Kelley, T. J. (2004). Mechanistic similarities between cultured cell models of cystic fibrosis and niemann-pick type C. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 31(5), 538-43.
- Wilmer, M. J., Emma, F. & Levtchenko, E. N. (2010). The pathogenesis of cystinosis: mechanisms beyond cystine accumulation. *American journal of physiology. Renal physiology*, 299(5), F905-16.

- Wojtanik, K. M. & Liscum, L. (2003). The transport of low density lipoprotein-derived cholesterol to the plasma membrane is defective in NPC1 cells. *The Journal of biological chemistry*, 278(17), 14850-6.
- Wood, M., Yin, H. & McClorey, G. (2007). Modulating the expression of disease genes with RNA-based therapy. *PLoS genetics*, 3(6), e109.
- Wraith, J E. (2002). Lysosomal disorders. *Seminars in neonatology*, 7(1), 75-83.
- Wraith, J. E., Baumgartner, M. R., Bembi, B., Covanis, A., Levade, T., Mengel, E., Pineda, M., et al. (2009). Recommendations on the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C. *Molecular genetics and metabolism*, 98(1-2), 152-65.
- Yamamoto, T., Nanba, E., Ninomiya, H., Higaki, K., Taniguchi, M., Zhang, H., Akaboshi, S., et al. (1999). NPC1 gene mutations in Japanese patients with Niemann-Pick disease type C. *Human genetics*, 105(1-2), 10-6.
- Yamamoto, T., Ninomiya, H., Matsumoto, M., Ohta, Y., Nanba, E., Tsutsumi, Y., Yamakawa, K., et al. (2000). Genotype-phenotype relationship of Niemann-Pick disease type C: a possible correlation between clinical onset and levels of NPC1 protein in isolated skin fibroblasts. *Journal of medical genetics*, 37(9), 707-12.
- Yoshizawa, S., Fourmy, D. & Puglisi, J. D. (1998). Structural origins of gentamicin antibiotic action. *The EMBO journal*, 17(22), 6437-48.
- Zampieri, S., Bembi, B., Rosso, N., Filocamo, M. & Dardis, A. (2011). Treatment of human fibroblasts carrying NPC1 missense mutations with MG132 leads to an improvement of intracellular cholesterol trafficking. *JIMD Reports*. doi:10.1007/8904_2011_49.
- Zervas, M., Dobrenis, K. & Walkley, S. U. (2001). Neurons in Niemann-Pick disease type C accumulate gangliosides as well as unesterified cholesterol and undergo dendritic and axonal alterations. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 60(1), 49-64.
- Zhang, M., Sun, M., Dwyer, N. K., Comly, M. E., Patel, S. C., Sundaram, R., Hanover, J. A., et al. (2003). Differential trafficking of the Niemann-Pick C1 and 2 proteins highlights distinct roles in late endocytic lipid trafficking. *Acta paediatrica*, 92(443), 63-73.

RECURSOS A INTERNET

Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP): http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html

Database of Genomic Variants (DGV): <http://projects.tcag.ca/variation/>

Ensembl Genome Browser: <http://www.ensembl.org/>

Genbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>

HapMap database: <http://www.hapmap.org>

Human Gene Mutation Database (HGMD): <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

Human Genome Variation Society (HGVS): <http://www.HGVS.org/mutnomen/>

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

National Center for Biotechnology Information (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Niemann-Pick type C Disease Gene Variation Database (NPC-db): <http://npc.fzk.de/>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/OMIM>

Polymorphism Phenotyping (PolyPhen): <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>

Primer3: <http://frodo.wi.mit.edu/>

Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER): <http://www.pantherdb.org/>

ANNEX

Article 5 annex

Referència: Fernández-Valero EM, Ballart A, Iturriaga C, Lluch M, Macías J, Vanier MT, Pineda M, Coll MJ. Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: genotype-phenotype correlations. Clin Genet. 2005; 68(3):245-254.

RESUM

Per caracteritzar el perfil mutacional de la malaltia de NPC a Espanya i alhora facilitar el consell genètic, es va portar a terme l'anàlisi molecular a 40 pacients espanyols no relacionats. La cerca va permetre la identificació dels 88% dels al·lels amb 38 mutacions del gen *NPC1* diferents, de les quals 26 es descriuen per primera vegada. No es va identificar cap pacient amb mutacions al gen *NPC2*. Les mutacions noves inclouen 14 mutacions de canvi de sentit (p.R372W, p.P434L, p.C479Y, p.K576R, p.V727F, p.M754K, p.S865L, p.A926T, p.D948H, p.V959E, p.T1036K, p.T1066N, p.N1156I i p.F1224L), 4 mutacions sense sentit (p.W260X, p.S425X, p.C645X i p.R1059X), 2 mutacions de *splicing* (IVS7+1G>A i IVS21+1dupG), una deleció en pauta (p.I962_F966del) i 5 mutacions que alteren la pauta: 3 insercions (c.894dupT, c.1672dupG i c.2336dupT) i 2 delecions (c.2978delG i c.3662delT).

Es van identificar 3 canvis sinònims nous (p.V562V, p.A580A i p.A1187A) en 3 pacients independents i també 5 SNPs que ja havien estat descrits prèviament. La combinació d'aquests polimorfismes origina l'establiment de diferents haplotips. Es va detectar desequilibri de lligament entre les mutacions p.C177Y i c.2978delG i haplotips específics, suggerint un únic origen per a ambdues mutacions. Pel contrari, la mutació p.I1061T mostra almenys dos orígens diferents.

Les mutacions més prevalents a la població espanyola foren p.I1061T, p.Q775P, p.C177Y i p.P1007A (10%, 7%, 7% i 5% dels al·lels, respectivament). Les dades obtingudes dels pacients homozigots indiquen que la mutació p.Q775P correlaciona amb la forma clínica infantil precoç i la mutació p.C177Y amb la infantil tardana.

Short Report

Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: genotype-phenotype correlations

Fernandez-Valero EM, Ballart A, Iturriaga C, Lluch M, Macias J, Vanier MT, Pineda M, Coll MJ. Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: genotype-phenotype correlations

Clin Genet 2005; 68: 245–254. © Blackwell Munksgaard, 2005

To better characterize Niemann-Pick type C (NPC) in Spain and improve genetic counselling, molecular analyses were carried out in 40 unrelated Spanish patients. The search identified 70/80 alleles (88%) involving 38 different NPC1 mutations, 26 of which are described for the first time. No patient with NPC2 mutations was identified. The novel NPC1 mutations include 14 amino acid substitutions [R372W (c.1114C > T), P434L (c.1301C > T), C479Y (c.1436G > A), K576R (c.1727G > A), V727F (c.2179G > T), M754K (c.2261T > A), S865L (c.2594C > T), A926T (c.2776G > A), D948H (c.2842G > C), V959E (c.2876T > A), T1036K (c.3107C > A), T1066N (c.3197C > A), N1156I (c.3467A > T) and F1224L (c.3672C > G)], four stop codon [W260X (c.780G > A), S425X (c.1274C > A), C645X (c.1935T > A) and R1059X (c.3175C > T)], two donor splice-site mutations [IVS7+1G > A (g.31432G > A) and IVS21+2insG (g.5187insG)], one in-frame mutation [N961_F966delinsS (c.2882del16bpins1bp)] and five frameshift mutations [V299fsX8 (c.895insT), A558fsX11 (c.1673insG), C778fsX10 (c.2334insT), G993fsX3 (c.2973_78delG) and F1221fsX20 (c.3662delT)]. We also identified three novel changes [V562V (c.1686G > A), A580A (c.1740C > G) and A1187A (c.3561G > T)] in three independent NPC patients and five polymorphisms that have been described previously. The combination of these polymorphisms gave rise to the establishment of different haplotypes. Linkage disequilibrium was detected between mutations C177Y and G993fsX3 and specific haplotypes, suggesting a unique origin for these mutations. In contrast, I1061T mutation showed at least two different origins. The most prevalent mutations in Spanish patients were I1061T, Q775P, C177Y and P1007A (10, 7, 7 and 5% of alleles, respectively). Our data in homozygous patients indicate that the Q775P mutation correlates with a severe infantile neurological form and the C177Y mutation with a late infantile clinical phenotype.

**EM Fernandez-Valero^a,
 A Ballart^a, C Iturriaga^b, M Lluch^a,
 J Macias^a, MT Vanier^c, M Pineda^b
 and MJ Coll^a**

^aInstitut de Bioquímica Clínica, Corporació Sanitària Clínic; ^bHospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; ^cINSERM U 189, Faculté de Médecine Lyon-Sud, and Fondation Gillet-Merieux, Center Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite, France

Key words: Niemann – Pick disease type C, mutations, haplotype, genotype – phenotype correlation

Corresponding author: MJ Coll, Institut de Bioquímica Clínica, Corporació Sanitària Clínic, C/ Meija Lequerica s/n; 08028 Barcelona, Spain.

Tel.: 34 93 2279340

fax: 34 93 22756698

e-mail: mjcoll@clinic.ub.es

Received 13 April 2005, revised and accepted for publication 17 May 2005

Niemann-Pick type C (NPC) is an autosomal recessive lipid-storage disorder characterized by lysosomal/endosomal accumulation of unesterified cholesterol and glycolipids in many tissues as a consequence of defective intracellular sterol trafficking (reviewed in 1–3).

The clinical manifestations of the disorder are heterogeneous. Despite most patients exhibiting

progressive neurological disease, both age of onset and subsequent clinical course may vary (4).

Biochemically, variations in the severity of the cellular cholesterol lesion have been described, including both severe and mild alterations known as classic and variant biochemical phenotypes, respectively (5).

Fernandez-Valero et al.

More than 95% of the cases of NPC are known to be due to a defect in the NPC1 gene, which is located at 18q11-q12 (6), and the complete genomic sequence has recently been identified (7). Nearly 200 different mutations and more than 60 different polymorphisms have been described in this gene [for review, see (8, 9)]. Defects in the NPC2 gene, located at 14q24.3, are responsible for the remaining 5% of NPC patients (10). Only 14 different mutations have been described for this gene [for review, see (11)].

Although the exact defect in intracellular trafficking of cholesterol and glycolipids remains to be elucidated, recent data suggest that the products of both genes (the NPC1 and the NPC2 proteins) play important roles. The NPC1 protein has been ascribed to a permease located in the membrane of late endosomes/lysosomes that acts as a transmembrane efflux pump (12) and probably interacts with NPC2, a soluble lysosomal protein (13).

Here, we present a molecular analysis of the NPC1 and NPC2 genes in 40 unrelated Spanish patients diagnosed with NPC according to standard biochemical protocols.

Materials and methods

Patients

Samples were obtained from 41 patients belonging to 40 families with different forms of the disease. Diagnosis of NPC was determined by cytochemical demonstration of pathologically enriched cholesterol via filipin staining and low-density lipoprotein-induced cholesterol ester formation (5, 14). Patients were referred to our centre from various hospitals in Spain and can be considered as representative of the Spanish population.

DNA preparation

DNA was prepared from cultured skin fibroblasts according to standard protocols (15).

Polymerase chain reaction (PCR) amplification

Primers for amplification of each exon and the boundaries of the NPC1 gene were the same as those described previously (16), with the exception of the forward primer for exon 15: *F-aca tgc aca tga aca taa ga*.

Primers for amplification of each exon and the boundaries of HE1/NPC2 were the same as those described by Millat et al. (17).

PCR conditions were as described by Yamamoto et al. (16) except for amplification of exon 15, in which thermocycling conditions were as follows: initial denaturing step of 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C (40 s), 55 °C (30 s) and final extension of 72 °C (3 min).

Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and sequencing

Approximately 7 µl of the PCR product was mixed with formamide dye (96% formamide, 0.01% xylene cyanol and 0.01% bromophenol blue), heated to 96 °C for 3 min and rapidly cooled on ice. Electrophoresis conditions and detection of DNA fragments were as described elsewhere (18). Samples with abnormal band shifts were amplified by PCR, and products were purified (QIAquick PCR purification kit; Qiagen, Germany) and sequenced (dye terminator cycle sequencing ready reaction; Perkin Elmer Applied Biosystems Division, Foster city, CA).

Restriction analysis

The prevalent mutations W942C, P1007A, A1035V and I1061T were detected using the restriction enzymes *Bst*NI(-), *Nhe*I(+), *Nla*IV(-) and *Rsa*I(+), respectively.

Statistical analysis

The X² test was used for analysis of the haplotypes.

Results

Clinical and biochemical phenotypes

The phenotype distribution of 40 unrelated Spanish NPC patients, according to the criteria of Vanier et al. (4, 5, 19), is summarized in Table 1. The group included 4/40 (10%) perinatal forms (PN). Other patients were classified according to their neurological presentation: 12/40 (30%) showed a severe infantile (SI) form (neurological onset at age >2 years); 8/40 (20%) a late infantile (LI) form (neurological onset at age 3–5 years); 12/40 (30%) a juvenile (J) form (neurological onset at age 5–16 years) and 3/40 (7.5%) an adult (A) form (neurological onset at age >16 years). In one patient (patient 2), the clinical phenotype could not be established due to the lack of data relating to disease progression. The only available clinical data were hepatosplenomegaly (HSM) and neonatal jaundice, after which biochemical diagnosis was made.

Identification of 25 new mutations

Table 1. Summary of clinical and biochemical characteristics of the 40 NPC Spanish patients

Patient	Biochemical phenotype	Clinical phenotype ^a	Age at biochemical diagnosis	Age at onset	Clinical signs at age at onset
1	Classical	SI	10 months	19 months	HSM
2	Classical	?	3 months	1 month	HSM, jaundice
3	Classical	LI	3 months	1 month	HSM, hypotonia, failure to thrive
4	Classical	SI	6 months	1 month	HSM, hypotonia, failure to thrive
5	Classical	J	12 years	8 years	Ataxia, progressive learning disability
6	Classical	J	11 years	2 months	HSM (seizures at 10 years)
7	Classical	SI	5 months	1 month	HSM, jaundice
8	Classical	LI	2 years	5 months	HSM
9	Classical	SI		Newborn	HSM
10	Classical	SI	2 years	1 years	HSM, hypotonia, psychomotor retardation
11	Classical	LI	5 years	2 years	HSM, psychomotor retardation
12	Classical	J	23 years	12 years	Cerebellum syndrome, supranuclear paralysis, learning disability
13	Classical	PN	Newborn	1 month	HSM, hepatic failure
14	Classical	SI	7 months	Newborn	HSM, jaundice, failure to thrive
15	Classical	LI	5 years	Newborn	HSM, hypotonia
16	Intermediate	A	36 years	?	Gait instability, dysarthria
17	Classical	SI	16 months	3 months	HSM
18	Classical	SI	8 years	Newborn	HSM, hypotonia
19	Classical	LI	5 years	Newborn	HSM
20	Classical	LI	18 months	3 months	HSM
21	Classical	LI		4 years	VSO, clumsiness, dysarthria
22	Classical	LI	5 years	1 month	?
23	Variant	J	16 years	8 years	Bradypsichia, ophthalmoplegia, clumsiness
24	Classical	J	17 months	17 months	HSM, irritability
25	Classical	SI	3 years	1 years	Motor impairment, spastic tetraparesis
26	Classical	J	13 years	6 years	Learning disability, behaviour problems
27	Variant	J	8 years	?	?
28	Classical	SI	2 years	Newborn	HSM, jaundice
29	Variant	J	11 years	9 years	Generalized seizures
30	Variant	J	13 years	5 years	HSM, progressive learning disability
31	Classical	PN	Newborn	Newborn	HSM, jaundice, hypotonia, psychomotor retardation
32	Variant	J	10 years	7 years	HSM, ophthalmoplegia, ataxia, dystonia, psychomotor retardation
33	Classical	A	28 years	?	?
33'	Classical	A	32 years	?	?
34	Classical	?	14 years	?	?
35	Classical	PN	1 year	Newborn	HSM, jaundice, hypotonia, psychomotor retardation
36	Classical	J	10 years	6 years	HSM, ophthalmoplegia, ataxia, mental retardation
37	Variant	A	32 years	20 years	Clumsiness
38	Variant	LI	6 years	2 years	HSM
39	Classical	PN	Newborn	Newborn	HSM, hepatic failure
40	Classical	SI	15 months	8 months	HSM, nistagmus

A, adult; HSM, hepatosplenomegaly; J, juvenile; LI, late infantile; PN, perinatal; SI, severe infantile; VSO, vertical supranuclear ophthalmoplegia.

Patients 33 and 33' are siblings.

?, data not available.

^aClinical phenotype attending to the first neurological symptoms.

In terms of biochemical phenotype, cultured fibroblasts from a majority of patients (80%) showed by filipin staining a typical massive accumulation of unesterified cholesterol in late endosomal/lysosomal vesicles (classical biochemical phenotype). The remaining 20% (8/40 patients) showed a moderate cholesterol accumulation (variant biochemical phenotype) (5). These

patients all presented a J/A phenotype, except for case 38 who presented a LI phenotype.

HSM appears to be important as a first symptom in many NPC patients, this disturbance functioning as a unique sign for a long period of time until neurological symptoms appear. Our series comprised three patients with an SI phenotype, in whom HSM was detected between the

Fernandez-Valero et al.

newborn period and 3 months, and diagnosis was established between 1.5 and 2 years (patients 9, 17 and 28). We also had three patients with a LI phenotype (patients 8, 19 and 38), in whom HSM was detected between newborn period and 2 years, and the diagnosis was established between 2 and 6 years. Finally in one patient with a J phenotype (patient 6), HSM was detected at 2 months while the first neurological symptoms appeared at around 10 years of age.

Mutation analysis

We performed molecular analysis of the 25 exons and intron boundaries of the NPC1 gene. By screening for the four frequent mutations W942C, P1007A, A1035V and I1061T by restriction enzyme analysis, we covered 17/80 alleles (21%). In order to identify the remaining 63 alleles, we performed SSCP analysis and sequencing. This approach allowed identification of 70/80 alleles (88%) involving 38 different mutations, 25 of which are described here for the first time. All of the identified mutations and their locations are summarized in Table 2.

None of the 14 new missense mutations were found when 100 normal chromosomes were analysed. Mutation I1061T was the most frequently identified in the studied population, accounting for 8/80 (10%) of the mutant alleles. This mutation, together with another five mutations (C177Y, G993fsX3, Q775P, P1007A and A1035V) account for 31/80 (39%) alleles and 8/40 (20%) of the complete genotypes (Table 1); seven of which are in homozygosity: patients 6 (I1061T), 8 (I1061T), 9 (Q775P), 10 (A1035V), 15 (C177Y), 17 (G993fsX3) and 39 (G993fsX3).

Our analysis of the NPC1 gene based on study of genomic DNA allowed completion of only 31/40 genotypes. In eight patients (2, 3, 7, 21, 29, 36, 38 and 40), only one mutation was found. In all these cases, all the exons and intron boundaries have been sequenced, and further analysis of cDNA is currently underway. In patient 13, who displayed a classic biochemical phenotype without any identified mutation in the NPC1 gene, no alteration of the NPC2 gene was identified by the molecular study according to the manuscript of Millat et al. (17).

Polymorphism analysis

SSCP analysis of the PCR products of all the exons and intron boundaries of the NPC1 gene in patients and in control population led to the identification of five different previously

described polymorphisms (Y129Y, H215R, I858V and R1266Q described by Millat et al. 1999; Y642M described by Morris et al. 1999). Allele frequencies did not differ significantly between the patient group and a group of 50 Spanish control subjects (Table 3).

We also found three novel changes: V562V (c.1686G > A), A580A (c.1740C > G) and A1187A (c.3561G > T) found in three independent NPC patients (patients 29, 30 and 2, respectively). None of these rare variants change any amino acid in the NPC1 protein, and all were absent in 100 control chromosomes (Table 3).

Haplotype analysis

All 40 unrelated NPC patients were screened for the following five polymorphisms: Y129Y (c.387 T > C), H215R (c.644A > G), I642M (c.1926 C > G), I858V (c.2572A > G) and R1266Q (c.3797G > A). The results obtained are summarized in Table 4.

The C177Y mutation was always associated with haplotype [-,-,+,-,-] with respect to those five polymorphisms. In patients in whom this mutation was in heterozygosity with another mutation, phases could be established and/or confirmed by analysis of parental DNA. In the general population, the frequency of this haplotype was calculated to be 6.66% which is significantly different from its frequency when only C177Y alleles are considered ($p > 0.001$).

In the case of the I1061T mutation, all chromosomes shared the same haplotype [-,-,-,-,-] when the same five polymorphisms were taken in account, and phases could also be established. The X^2 test for the I1061T mutation and the [-,-,-,-,-] haplotype was also significantly different ($p < 0.001$) when the frequency of this haplotype associated with alleles bearing this mutation was compared with the frequency estimated in the control population (10%).

Finally, in relation to the G993fsX3 (c.2973_78delG) mutation, the two homozygous patients (patients 17 and 39) shared the same haplotype [-,-,-,-,-]. In the heterozygous patient, with a G993fsX3/I1061T genotype, phases could not be established.

Discussion**Mutation and haplotype analysis**

NPC is one of the most frequent lysosomal diseases found in Spain, with the identification of 2–6 new cases each year. This implies the search for heterozygous detection and prenatal

Identification of 25 new mutations

Table 2. Characteristics of mutations identified in the NPC1 gene of Spanish NPC patients

Mutation	Nucleotide change	Exon/intron	Location NPC1 protein ^a	Effect on NPC1 protein	Conserved residues ^b	Reference ^c
p.R116X	c.346C > T	E4	Lumen A	Truncated 115 aa	Yes	20
p.T137M	c.410C > T	E4	Lumen A	Thr > Met	No	21
p.C177Y	c.530G > A	E5	Lumen A	Cys > Tyr	No	22
p.W260X	c.780G > A	E6	Lumen A	Truncated 259 aa	Yes	This article
p.V299fsX8	c.895_896insT	E7	Cytoplasm B	Frameshift. Truncated by 307 aa	No	This article
IVS7 + 1G > A	g.31432G > A	I7	-	Variable splicing. Frameshift	-	This article
p.R372W	c.1114C > T	E8	Lumen C	Arg > Trp	Yes	This article
p.S425X	c.1274C > A	E8	Lumen C	Truncated by 424 aa	Yes	This article
p.P434L	c.1301C > T	E8	Lumen C	Pro > Leu	Yes	This article
p.P474L	c.1421C > T	E9	Lumen C	Pro > Leu	No	This article
p.C479Y	c.1436G > A	E9	Lumen C	Cys > Tyr	Yes	This article
p.A558fsX11	c.1673_1674insG	E11	Lumen C	Frameshift. Truncated by 569 aa	Yes	This article
p.K576R	c.1727A > G	E11	Lumen C	Lys > Arg	No	This article
p.C645X	c.1935T > A	E12	Cytoplasm D, SSD	Truncated by 644 aa	No	This article
p.V664M	c.1990G > A	E13	TM IV, SSD	Val > Met	No	8
p.V727F	c.2179G > T	E14	Cytoplasm F, SSD domain	Val > Phe	Yes	This article
p.M754K	c.2261T > A	E15	TM IV, SSD domain	Met > Lys	Yes	This article
p.C775P	c.2324A > C	E15	TM IV, SSD	Gln > Pro	Yes	24
p.C779fsX9	c.2336dupT	E15	TM IV, SSD	Frameshift. Truncated 788 aa	Yes	This article
p.S865L	c.2594C > T	E17	Lumen I	Ser > Leu	Yes	This article
p.A926I	c.2776G > A	E18	Lumen I	Ala > Thr	Yes	This article
p.W942C	c.2819G > T	E19	Lumen I	Trp > Cys	Yes	22
p.D944N	c.2830C > A	E19	Lumen I	Asp > Asn	Yes	21
p.D948H	c.2842G > C	E19	Lumen I	Asp > His	Yes	This article
p.V959E	c.2876T > A	E19	Lumen I	Val > Leu	Yes	This article
p.N961_F966 delinsS	c.2897delAATATC ACTGACCAGTT andc.2897_2898insG	E19	Lumen I	In frame mutation Loss of 5 aa and gain of 1 aa	Yes	This article
p.G993fsX3	2973_78delG	E20	Lumen I	Frameshift Truncated 995 aa	Yes	This article
p.P1007A	c.3019C > G	E20	Lumen I	Pro > Ala	Yes	25
p.A1035V	c.3104C > T	E21	Lumen I	Ala > Val	Yes	22
p.T1036K	c.3107C > A	E21	Lumen I	Thr > Lys	Yes	This article
p.R1059X	c.3175C > T	E21	Lumen I	Truncated 1058 aa	Yes	This article
p.I1061T	c.3182T > C	E21	Lumen I	Ile > Thr	Yes	25
p.T1066N	c.3197C > A	E21	Lumen I	Thr > Asn	Yes	This article
IVS21 + 2insG	g.5187_5188 insG	I21	-	Variable splicing. Frameshift	-	This article
p.N1156I	c.3467A > T	E22	TM XI	Asn > Ile	Yes	This article
p.N1156S	c.3467A > G	E22	TM XI	Asn > Ser	Yes	This article
p.F1221fsX20	c.3662delT	E24	Cytoplasm N	Frameshift Truncated 1241 aa	Yes	6
p.F1224L	c.3672C > G	E24	Cytoplasm N	Phe > Leu	Yes	22
					Yes	This article

SSD, sterol-sensing domain.

Novel mutations are given in bold.

^aProtein domains are indicated as determined by Carstea et al. (6).^bSpecies similarities of domains were determined using PolyPhen: prediction of functional effect of human SNPs for NPC1 sequences from human, cat, rabbit, pig, mouse, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae*.^cFor described mutations only the first citations are given.

Fernandez-Valero et al.

Table 3. Polymorphism frequencies in NPC patients and in Spanish control population

Polymorphism	Exon	Number alleles in controls (frequency)	Number alleles in patients (frequency)	Reference
Y129Y (c.387T > C)	4	6/100 (6%)	2/80 (2.5%)	26
H215R (c.644A > G)	6	29/100 (29%)	11/80 (13.75%)	26
V562V (c.1686G > A)	11	0/100	1/80 (1.25%)	This article
A580A (c.1740C > G)	11	0/100	1/80 (1.25%)	This article
I642M (c.1926C > G)	12	25/100 (25%)	18/80 (22.5%)	27
I858V (c.2572A > G)	17	0/100	4/80 (5%)	26
A1187A (c.3561G > T)	23	0/100	1/80 (1.25%)	This article
R1266Q (c.3797G > A)	25	7/100 (7%)	1/80 (1.25%)	26

diagnosis in an increasing number of families with an NPC-affected member. It would also be desirable to better characterize the patients, in terms of prognosis and in view of future therapeutic trials. We therefore performed a search for

molecular defects in 40 unrelated patients, diagnosed between years 1988 and 2003, and thus representative of Niemann-Pick disease in Spain. This makes our study rather unique, as most other reports comprised a mixed population

Table 4. Genotypes and polymorphism analysis of Spanish NPC patients

Patient	Genotype	Y129Y	H215R	I642M	I858V	R1266Q
1	(p.Q775P) + (p.N1156I)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
2	(IVS21 + 2insG) + ?	-/-	+/-	+/-	+/-	-/-
3	(p.C177Y) + ?	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-
4	(p.W942C) + (p.N961_F966delinsS)	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-
5	(p.I1061T) + (p.N1156S)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
6	(p.I1061T) + (p.I1061T)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
7	(p.V299fsX8) + ?	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
8	(p.I1061T) + (p.I1061T)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
9	(p.Q775P) + (p.Q775P)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
10	(p.A1035V) + (p.A1035V)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
11	(p.S865L) + (p.R1059X)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
12	(p.Q775P) + ?p.F1224L)	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-
13	? + ?	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
14	(p.A558fsX11) + (p.A558fsX11)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
15	(p.C177Y) + (p.C177Y)	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-
16	(p.R372W) + (p.T1036K)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
17	(p.G993fsX3) + (p.G993fsX3)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
18	(p.C177Y) + (p.V959E)	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-
19	(p.V727F) + (p.A1035V)	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-
20	(p.G993fsX3) + (p.I1061T)	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-
21	(p.S425X) + ?	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-
22	(p.I1061T) + (p.W260X)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
23	(p.P1007A) + (p.R1059X)	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-
24	(p.P434L) + (p.M754K)	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-
25	(IVS7+1G > A) + (p.W942C)	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-
26	(p.S425X) + (p.P474L)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
27	(p.D944N) + (p.P1007A)	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-
28	(p.R116X) + (p.Q775P)	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-
29	(p.C479Y) + ?	+/-	-/-	+/-	-/-	-/-
30	(p.P1007A) + (p.T1066N)	-/-	+/-	-/-	+/-	-/-
31	(p.A926T) + (p.D948H)	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-
32	(p.C779fsX9) + (p.P1007A)	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-
33	(p.C177Y) + (p.V664M)	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-
33'	(p.C177Y) + (p.V664M)	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-
34	(p.I1061T) + (p.T1137M)	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-
35	(p.R1059X) + (p.R1059X)	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-
36	(p.N961_F966delinsS) + ?	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-
37	(p.K576R) + (p.F1221fsX20)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
38	(p.G1252R) + ?	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-
39	(p.G993fsX3) + (p.G993fsX3)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
40	(p.C645X) + ?	-/-	+/-	-/-	+/-	-/-

?, Unknown Mutation

Identification of 25 new mutations

(24) or a small number of patients (7, 20, 23) or did not provide clinical data (8). Using a strategy of SSCP plus sequencing of the abnormal patterns, and if necessary, sequencing all the exons and intron boundaries, we covered 70/80 mutant NPC1 alleles (86%), including 38 different mutations, 25 of which are novel and 12 previously described. The Spanish population, similarly to what has been reported for other countries, has significant allelic heterogeneity, in which only 10 mutations (C177Y, S425X, Q775P, W942C, N961_F966delinsS, G993fsX3, P1007A, A1035V, R1059X and I1061T) have been found more than in one specific family. Moreover, the type and percentages of mutations in the study population do not differ significantly from those described for all mutations worldwide (16, 22, 24, 25). The majority of the molecular alterations in the patient series were missense 25/37 (68%), as occurs in the majority of genetic diseases (28). Additionally, we identified 5/37 (13.5%) frameshift mutations as a consequence of insertions and/or deletions, 4/37 nonsense mutations (11%), 2/37 (5%) splice site alterations and 1/37 (2.5%) in-frame deletion/insertions. Among the novel mutations, 56% (14/25) were amino acid substitutions, distributed throughout the gene. In this respect, four (R372W, P434L, C479Y and K576R) were located at the N-terminus of the protein, two (V727F and M754K) in the sterol-sensing domain and eight (S865L, A926T, D948H, V959E, T1036K, T1066N, N1156I and F1224L) at the C-Terminus of the protein, with a notable hot-spot in the cysteine-rich luminal loop (amino acids 855–1098), as described in other populations (8, 24, 25). Interestingly, the missense mutation, F1224L, and one frameshift mutation, F1221fsX20, represent the first mutant alleles described in the seventh luminal loop of the protein, which is largely a conserved domain. All these novel missense mutations seem to be functionally important, and although it should be confirmed by expression studies, several lines of evidence suggest that they could be pathogenic: (a) after exhaustive examination of the coding region of the NPC1 gene in the NPC1 patients, no other mutation was found in any of the cases; (b) none of the novel mutations were detected when 100 normal chromosomes were analysed; (c) all the amino acid residues were conserved in the NPC1 protein of different species, with the exception of K576R. The other 11/26 novel mutations are undoubtedly disease-causing mutations, as they produce a loss of five aminoacids and a gain of one aminoacid in the protein (N961_F966delinsS), create a premature stop codon (W260X, S425X, C645X and

R1059X) or frameshifts (V299fsX8, A558fsX11, C778fsX10, G993fsX3 and F1221fsX20). For mutations IVS7 + 1G > A and IVS21 + 2insG, which affect the splice donor site in intron 7 and 21, respectively, it would be necessary to perform analysis at the mRNA level, to assure that these changes give rise to an abnormal splicing process.

In addition to the mutations found in the study population, the majority of patients showed one or more polymorphisms (Table 3). As occurs in Portuguese populations (22), there were no significant differences between the frequencies found in patients and in the control population. The existence of several polymorphisms and fixed haplotypes for specific mutations permitted us to infer their possible origins.

Mutation I1061T is the most prevalent mutation in the study population, accounting for 10% of the mutant alleles. While it appears to be the most frequent NPC1 mutant allele in all countries except Japan (16), its prevalence varies. In a study including patients originating from different countries with a majority from France, United Kingdom, Germany and North Africa an overall value of 18% was found (Millat et al. 1999). A lower prevalence has been reported in Portuguese (8%) (22), Italian (5%) (23) and German (7, 20) patients. Interestingly, while it is highly prevalent in Hispanic Americans from Colorado/New Mexico, due to a probable founder effect, its prevalence is much lower in other Hispanic Americans (26). Haplotype studies for this mutation in our Spanish patients population show that it is always associated with haplotype [–,–,–,–,–] with respect to the five polymorphic markers Y129Y (c.387T > C), H215R (c.644A > G), I642M (c.1926C > G), I858V (c.2572A > G) and R1266Q (c.3797G > A). Haplotype studies in the Portuguese population (22) show that the I1061T mutation is associated with haplotype [+,-,-,-] with respect to the polymorphisms Y129Y (c.387T > C), H215R (c.644A > G), I642M (c.1926C > G) and I858V (c.2572A > G). Taken together, these data suggest at least two different origins for this mutation.

In contrast, we have found the same haplotype association for the C177Y mutation, as observed in the Portuguese population: [–,–,+,-] with respect to the four polymorphic markers Y129Y (c.387T > C), H215R (c.644A > G), I642M (c.1926C > G) and I858V (c.2572A > G). Moreover, we extended the series including one more polymorphic marker, R1266Q (c.3797G > A), obtaining the haplotype [–,–,+,-,-]. We suggest a unique origin for this mutation, which on a worldwide scale has only been found in Portugal and Spain.

Fernandez-Valero et al.

This situation is not unique for the C177Y mutation, because complete linkage disequilibrium was also observed for the novel mutation G992fsX4 and haplotype [–,–,–,–,–], suggesting a single Spanish origin for this mutation. Interestingly, although G992 is not a conserved domain, it seems to be a hot-spot, because two missense mutations have been found: G992W, which is known to be particularly prevalent in Nova Scotia (29) and is also reported in Portugal (22), and G992R, found in France (24). None of these mutations were found in Spain.

Genotype–phenotype correlation

As seen in all the NPC patient series described worldwide, the Spanish population exhibits considerable clinical and allelic heterogeneity. In our series, SI forms and J forms are the most frequent clinical presentations, both in equal percentages (30%). Interestingly, these values are similar to those obtained earlier in a compilation of 125 patients from mostly European and North African origin (4, 19). The Spanish population of NPC patients shows a high prevalence of SI forms. A similar percentage of this clinical form has also been found in Italy, in a small group of patients (23). This presentation with early neurological onset and rapid progression has been well documented in early European studies (30) but not in parallel studies from the USA (1). The frequency of the J form in Spain appears much lower than the 69% reported in Portuguese patients in a recent but possibly not comprehensive study (22).

Due to the high allelic heterogeneity of this disease, only a few genotype-biochemical/clinical phenotype correlations have been established. Among these correlations, we would like to introduce some considerations relating to mutations clearly correlated with the classical biochemical phenotype (I1061T, A1035V and Q775P). When the I1061T mutation presents in homozygosity, it has been suggested that it correlates with classical biochemical phenotype and juvenile clinical presentation (26). Our data confirms this observation (patient 6, Table 1) and extends the presentation of the first neurological symptom to before 5 years of age (patient 8, who began to display clumsiness at 3 years of age; Table 1). The A1035V mutation, identified for the first time in Portugal (22) and observed in patient 10, exhibits a correlation with the infantile presentation of the disease, from the phenotype observed in two homozygous patients. The Q775P mutation, affecting the sterol-sensing domain of the NPC1 protein, was previously

shown by studies in one homozygous patient to result in the complete absence of the protein, well in line with the severe neurological phenotype of the patient (24). Patient 9, homozygous for this mutation, displayed a similar clinical presentation of the disease, confirming the genotype/phenotype correlation. Q775P in combination with R116X or with N1156I (TM XI domain) also determined a severe disease. In combination with F1224L (7th luminal loop) (patient 12), however, it led to a juvenile onset neurological form.

Finally, P1007A and C177Y mutations were both claimed to induce a variant biochemical phenotype (22, 24), a finding challenged by Sun et al. (21) for P1007A. Our data (patients 23, 27, 30 and 32) support the conclusions of the French group regarding the P1007A mutation. Conversely, the C177Y mutation, found by us in homozygosity in one patient (case 15) and in heterozygosity in four patients (cases 1, 18, 33 and the sister of patient 33), presented in all our cases with the classical biochemical phenotype. These results clearly contradict those reported by Ribeiro et al. (22). What underlies the different results observed by Sun et al. or by Ribeiro et al. remains unclear. From our data (patient 15) as well as those in the Portuguese patient (22), C177Y indeed appears correlated with a LI neurological form of the disease. However, when in combination with the V664M mutation located in the sterol sensing domain, and somewhat unexpectedly as mutations in this domain are generally very deleterious, it led to an adult form (patients 33 and 33'). Valine-methionine substitutions generally induce less severe changes in the protein, and for example, homozygous NPC1 V950M was found to lead to a clear adult phenotype (24). This further demonstrates the limitations of predictions in compound heterozygotes, although genotype – phenotype correlations observed in NPC disease can be considered as relatively good compared with the situation in a number of other genetic metabolic disease.

Acknowledgements

This research was supported by grants from Fundación Niemann-Pick de España. The authors are grateful to them and to all the patients and their families. E.M Fernandez-Valero, A. Ballart and C Iturriaga are recipients of fellowships from the Spanish Foundation. INSERM and Vaincre les Maladies Lysosomales (support to MTV) are also acknowledged.

We thank Dr A. Chabás and Dr T. Pàmols from Institut de Bioquímica Clínica for their participation in the establishment of NPC biochemical diagnosis before 1993. We also thank all

Identification of 25 new mutations

the physicians who referred patients for the study: Dr Campistol and Dr Sans (Hospital St. Joan de Déu), Dr Casas (Hospital Virgen de la Arrixaca), Dr Cebrián (Hospital Provincial, Pontevedra), Dr Domingo (Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia), Dr Fraga (Hospital de Cruces, Vizcaya), Dr Garcia (Hospital Materno Infantil Orense), Dr Garcia Peñas (Hospital Niño Jesús), Dr Gregori and Dr Mulas (Hospital La Fe, Valencia), Dr Jara and Dr Hierro (Hospital La Paz), Dr Manrique (Hospital Militar Central Gomez Ulla, Madrid), Dr Martín (Hospital Doce de Octubre), Dr Martín Fumero (Hospital Virgen de la Candelaria, Sta Cruz de Tenerife) Dr Martínez-Matos (Hospital de Bellvitge, Barcelona), Dr Montalbán (Hospital Vall d'Hebron), Dr Prieto (Hospital Universitario de Salamanca), Dr Rodríguez Barriónuevo (Hospital Regional de Málaga), Dr Rodríguez Luís (Hospital Universitario de Canarias, Sta. Cruz de Tenerife), Dr Ruiz del Portal (Hospital Virgen del Rocío, Sevilla), Dr Sánchez Valverde (Hospital Virgen del Camino, Pamplona), Dr Vallmaña (Hospital Provincial Lleida), Dr Verdú (Fundación Jiménez Díaz, Madrid).

We are also grateful to Mrs A. Valle and S. Richard for their excellent technical assistance.

References

- Patterson MC, Vanier MT, Suzuki K et al. Niemann-Pick disease type C: a lipid trafficking disorder. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B., eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn. New York: Mc Graw Hill, 2001: 3611–3634.
- Vanier MT, Millat G. Niemann-Pick disease type C. *Clin Genet* 2003; 64: 269–281.
- Ikonen E, Holtta-Vuori M. Cellular pathology of Niemann-Pick type C disease. *Semin Cell Dev Biol* 2004; 15: 445–454.
- Vanier MT, Suzuki K. Niemann-Pick diseases. In: Moser HW, ed. *Neurodystrophies and Neurolipidoses*. Amsterdam: Elsevier Science, 1996: 133–162.
- Vanier MT, Rodriguez-Lafrasse C, Rousson R et al. Type C Niemann-Pick disease: spectrum of phenotypic variation in disruption of intracellular LDL-derived cholesterol processing. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1096: 328–337.
- Carstea ED, Morris JA, Coleman KG et al. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 1997; 11 (277): 228–231.
- Bauer P, Knoblich R, Finckh U et al. Complete genomic sequence, mutation analysis and characterization of haplotypes. *Hum Mutat* 2002; 19 (1): 30–38.
- Park WD, O'Brien JF, Lundquist PA et al. Identification of 58 novel mutations in Niemann-Pick disease type C: Correlation with biochemical phenotype and importance of PTC1-like domains in NPC1. *Hum Mutat* 2003; 22: 313–325.
- Scott C, Ioannou YA. The NPC1 protein: structure implies function. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1685: 8–13.
- Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H et al. Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science* 2000; 22 (290): 2298–2301.
- Vanier MT, Millat G. Structure and function of the NPC2 protein. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1685: 14–21.
- Davies JP, Chen FW, Ioannou YA. Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein. *Science* 2000; 22 (290): 2295–2298.
- Ko DC, Binkley J, Sidow A, Scott MP. The integrity of a cholesterol-binding pocket in Niemann-Pick C2 protein is necessary to control lysosome cholesterol levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2518.
- Kruth HS, Comly ME, Butler JD et al. Type C Niemann-Pick disease. Abnormal metabolism of low density lipoprotein in homozygous and heterozygous fibroblasts. *J Biol Chem* 1986; 261 (35): 16769–16774.
- Miller SA, Dyke DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
- Yamamoto T, Ninomiya H, Matsumoto M et al. Genotype-phenotype relationship of Niemann-Pick disease type C: a possible correlation between clinical onset and levels of NPC1 protein in isolated skin fibroblasts. *J Med Genet* 2000; 37 (9): 707–712.
- Millat G, Chikh K, Naureckiene S et al. Niemann-Pick disease type C: spectrum of HE1 mutations and genotype/phenotype correlations in the NPC2 group. *Am J Hum Genet* 2001; 69 (5): 1013–1021.
- Gort L, Coll MJ, Chabás A. Identification of 12 novel mutations and two new polymorphisms in the Arylsulfatase A gene: haplotype and genotype-phenotype correlation studies in Spanish metachromatic leukodystrophy patients. *Hum Mutat* 1999; 14: 240–248.
- Vanier MT, Rodriguez-Lafrasse C, Rousson R et al. Type C Niemann-Pick C disease: biochemical aspects and phenotypic heterogeneity. *Dev Neurosci* 1991; 13: 307–314.
- Kaminski WE, Klunemann HH, Ibach B, Aslanidis C, Klein HE, Schmitz G. Identification of novel mutations in the NPC1 gene in German patients with Niemann-Pick C disease. *J Inher Metab Dis* 2002; 25: 385–389.
- Sun X, Marks DL, Park WD et al. Niemann-Pick C variant detection by altered sphingolipid trafficking and correlation with mutations within a specific domain of NPC1. *Am J Hum Genet* 2001; 68 (6): 1361–1372.
- Ribeiro I, Marcao A, Amaral O, Sa Miranda MC, Vanier MT, Millat G. Niemann-Pick type C disease: NPC1 mutations associated with severe and mild cellular cholesterol trafficking alterations. *Hum Genet* 2001; 109 (1): 24–32.
- Tarugi P, Ballarini G, Bembi B et al. Niemann-Pick type C disease: mutations of NPC1 gene and evidence of abnormal expression of some mutant alleles in fibroblasts. *J Lipid Res* 2002; 43 (11): 1908–1919.
- Millat G, Marcais C, Tomasetto C et al. Niemann-Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop. *Am J Hum Genet* 2001; 68 (6): 1373–1385.
- Greer W, Dobson MJ, Girouard GS, Byers DM, Ridell DC, Neumann PE. Mutations in NPC1 highlight a conserved NPC1-specific cysteine-rich domain. *Am J Hum Genet* 1999; 65 (2): 1252–1250.
- Millat G, Marcais C, Rafi MA et al. Niemann-Pick C1 disease: the I1061T substitution is a frequent mutant allele in patients of Western European descent and correlates with a classic juvenile phenotype. *Am J Hum Genet* 1999; 65 (5): 1321–1329.
- Morris JA, Zhang D, Coleman KG, Nagle J, Pentchev PG, Carstea ED. The genomic organization and polymorphism analysis of the human Niemann-Pick C1 gene. *Biophys Res Commun* 1999; 261 (2): 493–498.
- Antonarakis SE, Krawczak M, Cooper DN. Nature and mechanisms of human gene mutation. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of*

Fernandez-Valero et al.

- Inherited Disease, 8th edn. New York: Mc Graw Hill, 2001: 3611–3634.
29. Greer WL, Ridell DC, Gillan TL et al. The Nova Scotia (type D) form of Niemann-Pick disease is caused by a G3097T transversion in NPC1. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 52–54.
 30. Vanier MT, Wenger DA, Comly ME, Rousson R, Brady RO, Pentchev PG. Niemann-Pick disease group C: clinical variability and diagnosis based on defective cholesterol esterification. A collaborative study on 70 patients. *Clin Genet* 1988; 33: 331–348.

Article 6 annex

Referència: Pineda M, Perez-Poyato MS, O'Callaghan M, Vilaseca MA, Pocovi M, Domingo R, Ruiz del Portal L, Verdú-Pérez A, Temudo T, Gaspar A, Garcia-Peñas JJ, Roldán S, Martín-Fumero L, Blanco de la Barca O, García-Silva MT, Macías-Vidal J, Coll MJ. Clinical experience with miglustat therapy in pediatric patients with Niemann-Pick disease type C: a case series. *Mol Genet Metab.* 2010; 99(4):358-66.

RESUM

Aquesta publicació avalua l'eficàcia i la tolerància al miglustat de 16 pacients NPC simptomàtics, fent servir de referència un pacient neurològicament asimptomàtic no tractat. Tots els casos van ser classificats d'acord amb l'edat d'aparició dels símptomes neurològics, i van ser valorats utilitzant un protocol clínic d'avaluació estandarditzat: escales de discapacitat i funció cognitiva, tomografia per emissió de positrons (PET), i marcadors bioquímics.

El PET i l'escala de discapacitat indiquen que l'hipometabolisme cerebral i els símptomes neurològics s'estabilitzen durant el tractament en els pacients NPC que presenten el fenotip clínic juvenil. Les formes clíniques infantils precoç i tardana, les quals tenen un grau de severitat major en el moment d'iniciar el tractament, mostren un increment a la puntuació de l'escala de discapacitat i un progressiu hipometabolisme cerebral durant el seguiment. De manera similar, mentre la puntuació de l'escala de la funció cognitiva es manté relativament estable en els pacients juvenils, s'observa deteriorament cognitiu en els pacients amb els fenotips infantils precoç i tardà. L'activitat quitotriosidasa en plasma és menor al subgrup juvenil que als infantils, i generalment es veu incrementada en aquells pacients en què es suspèn el tractament. Les activitats CCL18/PARC i quitotriosidasa plasmàtiques indiquen una major activitat macrofàgica en els pacients infantils precoços i tardans respecte els juvenils.

El miglustat és generalment ben tolerat; existeixen efectes adversos freqüents com la diarrea i els gasos, però aquests poden ser controlats eficaçment mitjançant la modificació de la dieta i l'administració de loperamida. En general, el miglustat estabilitza l'estat neurològic dels pacients NPC juvenils, encara que els beneficis terapèutics semblen ser menors en els pacients més joves que es troben en un estadi més avançat de la malaltia.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Genetics and Metabolism

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymgme

Clinical experience with miglustat therapy in pediatric patients with Niemann–Pick disease type C: A case series

M. Pineda^{a,*}, M.S. Perez-Poyato^a, M. O'Callaghan^a, M.A. Vilaseca^a, M. Pocovi^b, R. Domingo^c, L. Ruiz Portal^d, A. Verdú Pérez^e, T. Temudo^f, A. Gaspar^g, J.J. García Peñas^h, S. Roldánⁱ, L. Martín Fumero^j, O. Blanco de la Barca^k, M.T. García Silva^l, J. Macías-Vidal^a, M.J. Coll^a

^aDepartments of Pediatric Neurology and Clinical Biochemistry, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, and Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER), Instituto de Salud Carlos III, Spain

^bDepartment of Biochemistry, Molecular and Cellular Biology, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain

^cHospital Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain

^dHospital Virgen del Rocío, Seville, Spain

^eHospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain

^fSanto Antonio General Hospital, Oporto, Portugal

^gHospital Santa Maria, Lisboa, Portugal

^hHospital Niño Jesus, Madrid, Spain

ⁱHospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

^jHospital Ntra. Sra. Candelaria, Tenerife, Spain

^kHospital de Vigo, Pontevedra, Spain

^lPediatric Unit for Rare Diseases, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 October 2009

Received in revised form 25 November 2009

Accepted 25 November 2009

Available online 29 November 2009

Keywords:

Niemann–Pick disease type C (NP-C)

Miglustat

PET

Disability

Chitotriosidase, CCL18

ABSTRACT

Niemann–Pick disease type C (NP-C) is an inherited neurovisceral lysosomal lipid storage disease characterized by progressive neurological deterioration. Different clinical forms have been defined based on patient age at onset: perinatal, early-infantile (EI), late-infantile (LI), juvenile and adult. We evaluated the efficacy and tolerability of miglustat in 16 symptomatic NP-C patients, with comparative reference to one neurologically asymptomatic, untreated patient. All patients were categorized according to age at neurological disease onset, and were assessed using a standardized clinical assessment protocol: disability and cognitive function scales, positron emission tomography (PET), and biochemical markers. PET and disability scale evaluations indicated that cerebral hypometabolism and neurological symptoms were stabilized during treatment in juvenile-onset NP-C patients. EI and LI NP-C patients, who had higher disease severity at baseline (treatment start), showed increased disability scores and progressive cerebral hypometabolism during follow up. Similarly, while cognitive scale scores remained relatively stable in patients with juvenile NP-C, cognition deteriorated in EI and LI patients. Plasma chitotriosidase (ChT) activity was lower in the juvenile NP-C subgroup than in EI and LI patients, and generally increased in patients who discontinued treatment. Plasma CCL18/PARC and ChT activities indicated greater macrophagic activity in EI and LI patients versus juveniles. Miglustat was generally well tolerated; frequent adverse events included diarrhea and flatulence, which were managed effectively by dietary modification and loperamide. Overall, miglustat appeared to stabilize neurological status in juvenile-onset NP-C patients, but therapeutic benefits appeared smaller among younger patients who were at a more advanced stage of disease at baseline.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Niemann–Pick disease type C (NP-C) is a neurovisceral lysosomal lipid storage disease characterized by progressive neurological deterioration. NP-C is caused by mutations in either one of the two genes, *NPC1* or *NPC2*, which encode proteins involved in the regulation of normal intracellular lipid trafficking through sequen-

tial activities within a common pathway [1–4]. Expression of the mutant genes leads to severely impaired intracellular lipid transport and marked accumulation of both unesterified cholesterol and several glycosphingolipids in a variety of tissues and organs, in particular the brain [2,3,5,6].

NP-C has a highly variable clinical presentation. The symptomatology and rate of disease progression are strongly influenced by age at disease onset [7,8], and different clinical forms have been described on this basis. In the perinatal form, patients die from liver failure within the first months of life. Other forms are defined based

* Corresponding author. Fax: +34 93 203 3959.
E-mail address: pineda@hsjdbcn.org (M. Pineda).

on the following ages at onset: early-infantile (EI) form, <2 years; late-infantile (LI) form, 3–5 years; juvenile form, 5–16 years; adult form, >16 years. Clinical symptoms include progressive neurological deterioration and visceral organomegaly. Neurodegeneration begins with clumsiness and progressive ataxia followed by a range of symptoms that can generally include dysmetria, vertical supranuclear ophthalmoplegia, cataplexy, seizures, dystonia, pyramidal signs, dysphagia and dementia [8,9].

The biochemical diagnosis of NP-C is currently based on the demonstration of impaired low-density lipoprotein (LDL) cholesterol trafficking in cultured fibroblasts from patients, by cytochemical visualization of accumulated free cholesterol after filipin staining [9]. Recently, CCL18 pulmonary and activation-regulated chemokine (PARC), termed hereinafter as 'CCL18', has been reported as a potential new surrogate marker for monitoring symptomatic patients with Gaucher disease (GD) [10]. On average, this protein is elevated 29-fold in GD patients, without overlap between patient and control values. Chitotriosidase (ChT) is a human chitinase that shows markedly elevated activity in a variety of lysosomal storage disorders [11]. It is secreted by activated macrophages and is thought to play a role in defense against chitin-containing pathogens, in tissue remodeling and cell migration, as well as during atherogenesis. Plasma ChT is considered a useful surrogate marker in the lysosomal work-up of GD and NP-C patients with organomegaly, as it is relatively inexpensive and is easily assayed [12]. However, the use of plasma ChT as a marker of disease progression can be problematic in some patients who have no ChT activity due to possession of a 24-base pair (bp) duplication in the ChT gene; this mutation is inherited as an autosomal recessive trait [11]. Nevertheless, plasma ChT is considered also to be of possible use as a screening marker in pediatric patients [12].

Currently, there is no cure for NP-C, although palliative therapy can alleviate some symptoms of the disease [13]. Miglustat (*N*-butyldeoxynojirimycin; NB-DNJ; OGT-918) is a small iminosugar molecule that reversibly inhibits glucosylceramide synthase, the enzyme that catalyses the first committed step in glycosphingolipid synthesis [14]. The ability of miglustat to cross the blood-brain barrier indicated its potential use as a therapy for lysosomal storage diseases affecting the central nervous system. In animal NP-C models, miglustat delayed the onset of neurological symptoms and increased life span [15]. Evidence suggests that miglustat might also have beneficial effects on pathogenetic NP-C cellular pathways associated with calcium homeostasis [16]. Based on findings from a randomized, controlled clinical trial and a retrospective observational cohort study [17,18], miglustat was approved in the European Union for the treatment of progressive neurological manifestations in adult patients and pediatric patients with NP-C in January 2009.

We report an evaluation of 17 patients with NP-C (16 symptomatic and one neurologically asymptomatic) from Spain and Portugal who were treated with miglustat for up to 4 years. We applied a standardized clinical, biochemical and neuroimaging protocol in order to establish the effect of miglustat on several markers of NP-C severity.

Methods

Patients and dosing

During the last 4 years, we evaluated 17 children from Spain and Portugal who had clinical and biochemical diagnoses of NP-C. In all patients, biochemical diagnoses were confirmed by fibroblast assays for cholesterol esterification as well as filipin staining. Four of these patients have also been described in a retrospective observational cohort study of miglustat in patients with NP-C [18].

Clinical records for all patients were collected by a single investigator, and clinical NPC1 phenotypes were categorized according to age at onset of neurological symptoms. All 16 symptomatic patients received miglustat at doses based on body surface area (BSA): $(BSA \text{ patient (m}^2)/1.8) \times \text{adult dose (200 mg t.i.d.)}$. The neurologically asymptomatic patient, who was diagnosed at 8 months of age due to splenomegaly, was not receiving miglustat and was included as a control at 8 years old, following all the protocol.

Clinical assessments

A standard assessment protocol was applied to all patients, including: clinical assessment (neurological examination, modified functional disability scale and cognitive development evaluation), biochemical analyses (plasma ChT and CCL18 activities), and imaging studies (abdominal ultrasound and cerebral positron emission tomography [PET] with radiolabelled [^{18}F]-2-fluoro-deoxy-D-glucose). The full assessment battery was applied at baseline (treatment start), 6 months, 12 months and every year thereafter. Neurological examinations and biochemical analyses were also performed at screening and Months 4 and 8. Disability scale assessments were performed every 4 months. In addition, all treatment-emergent adverse events were recorded at each post-screening visit.

The modified disability scale, assessing four key functional domains (ambulation, manipulation, language and swallowing) relating to disease severity, was calculated as reported previously [8]. We modified our disability scale with the following scores: ambulation score ranged from 1 (clumsiness) to 5 (wheelchair-bound); manipulation ranged from 1 (mild tremor) to 4 (severe dysmetria/dystonia); language ranged from 1 (delayed acquisitions) to 5 (absence of communication); swallowing ranged from 1 (abnormal chewing) to 4 (nasogastric/gastric button feeding); epilepsy ranged from 1 (occasional seizures) to 3 (seizures resistant to antiepileptic drugs); ocular movements ranged from 1 (slow ocular pursuit) to 3 (complete ophthalmoplegia) (Table 1). Scores on each of these domains were used to calculate an overall (composite) disability score, which are referred to simply as 'disability scale scores throughout the remainder of this report.

The Denver developmental screening test (DDST) and Wechsler intelligence scale for children (WISC-R) were used to assess cognitive development and function. Cranial PET was used to assess brain metabolism in affected cerebral areas including the frontal and temporo-parietal regions, as well as in the thalamus, basal ganglia and cerebellum. Impaired brain function was rated according to scores ranging from 1 (mild) to 5 (severe).

Written informed consent for participation in this study was obtained from all parents or their legal representatives.

ChT studies

Plasma ChT activity was measured using the fluorogenic substrate, 4-methylumbelliferyl- β -D-N,N,N'-triacetylchitotrioside (4-MU-chitotrioside; Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA), as described previously by Hollak et al. [19]. Samples with high ChT activities were diluted to bring them into the linear range of the assay. Measured enzyme activities were doubled in patients carrying the mutated ChT gene.

A 24-bp duplication polymorphism in the ChT gene in some patients leads to a null allele, producing a defective protein product and a subsequent inherited deficiency in ChT activity. DNA analysis of ChT gene polymorphisms was undertaken in all but one patient using PCR followed by agarose gel electrophoresis of the amplified fragment as described previously [20].

Table 1
Modified disability scale for patients NP-C.

Ambulation	Score	Language	Score
Clumsiness	1	Delayed acquisitions	1
Autonomous ataxia gait	2	Mild dysarthria (understandable language)	2
Outdoor assisted ambulation	3	Severe dysarthria (only understood by some members of the family)	3
Indoor assisted ambulation	4	Non-verbal communication	4
Wheelchair-bound	5	Absence of communication	5
Manipulation	Score	Swallowing	Score
Tremor	1	Abnormal chewing	1
Slight dysmetria/dystonia (allows autonomous manipulation)	2	Occasional dysphagia	2
Mild dysmetria/dystonia (requires help for several task but is able to feed himself)	3	Daily dysphagia	3
Severe dysmetria/dystonia (requires assistance in all activities)	4	Nasogastric/gastric button feeding	4
Seizures	Score	Ocular movements	Score
Occasional seizures	1	Slow ocular pursuit	1
Seizures with antiepileptic drugs	2	Vertical ophthalmoplegia	2
Seizures resistant to antiepileptic drugs	3	Complete ophthalmoplegia	3

CCL18 protein assay

CCL18 protein assays were conducted using a CCL18-specific, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system according to the manufacturer's instructions (CytoSet, Biosource International, Camarillo, CA). Dilution series of recombinant human CCL18 protein (Biosource International, Camarillo, CA) were used as controls to produce standard curves.

Results

Patients and disposition

A total of 17 NP-C patients (9 male and 8 female) were included. No patients had a family history of NP-C, but all had a confirmed diagnosis. Among all 17 patients, 16 showed mutations in the *NPC1* gene (data not shown and partially published [21,22]). Table 2 summarizes patient baseline characteristics. Categorization of patients on clinical grounds according to age at onset of neurological symptoms identified five patients with the EI form of the disease, four patients with the Li form, and seven patients with the juvenile form. The duration of miglustat treatment ranged between 6 months and 4 years; therapy was initiated at different patient ages, depending on the clinical form.

Discontinuations due to death were reported in the following patients: patient 2 (at 6 months of treatment), patient 5 (at 14 months of treatment due to respiratory infection as a complication of immunosuppressive therapy following liver transplantation) and patient 6 (at 2 years and 7 months of treatment, due to disease progression). Discontinuations due to family decisions were reported in two patients: patient 7 after 2 years of treatment and patient 10 after 3 years of treatment.

Splenomegaly

Splenomegaly showed a high degree of variability in patients with EI NP-C and in the neurologically asymptomatic patient. The median spleen volume ranged from 140 to 200 mm (normal spleen size, 100 mm). Patients with Li and juvenile NP-C showed relatively stable spleen size throughout treatment.

Disability scale scores

In the EI patient subgroup (Fig. 1a), patients 1 and 4, who started treatment at the youngest ages, showed lower baseline disability scores than patients 2, 3 and 5. Patient 4 had the lowest disability

score throughout treatment, possibly due to early diagnosis of the disease due to splenomegaly investigations. The disability score of patient 1 increased over a period of approximately 2 years, but remained stable thereafter. Patient 5 had the highest disability score at the onset of treatment, and died at 14 months of age.

In the Li patient subgroup (Fig. 1b), patient 7, who started treatment at 2 years and 7 months of age, showed a low initial degree of disability and slow disease progression during 2 years of follow up. Patient 6, who started treatment later than other patients (at 8 years and 7 months of age), died after 2 years and 7 months on treatment.

In the juvenile patient subgroup (Fig. 1c), an initial decrease in disability score was observed in patients 10 and 11. The disability score for patient 10 started to increase at 32 weeks, which coincided with the onset of epilepsy that continued between Months 33 and 36; the patient discontinued treatment after this, and his disability score increased further, up to Month 44. In contrast, while patient 11 commenced treatment with the highest disability score, he showed stable disease throughout 3 years of treatment.

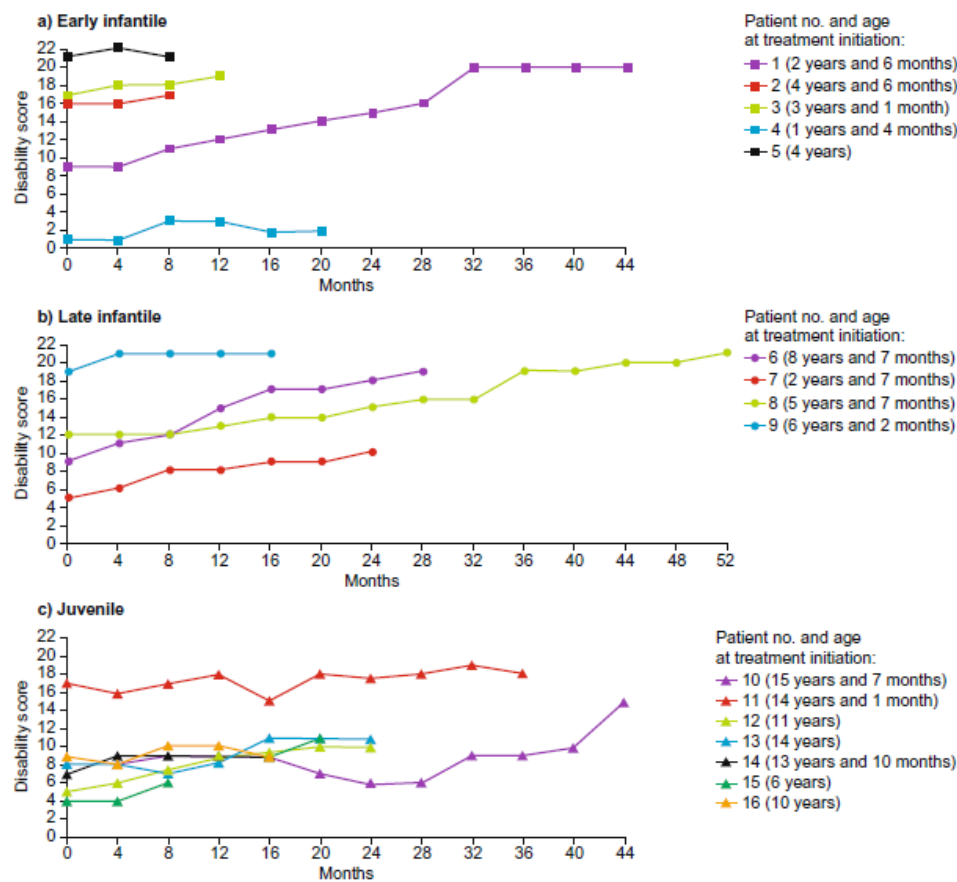
PET studies

In the EI patient subgroup, cranial PET studies in patient 1 showed normal metabolism in the cerebellum, thalamus and basal ganglia throughout 2 years of treatment, but there were notable changes in frontal and temporo-parietal cerebral metabolism (Fig. 2a). Substantial and generalized effects on cerebral metabolism were also seen in Patient 2 at baseline, but no follow-up cranial PET assessments could be performed because the patient died 6 months after the baseline assessment. Patient 4 showed mild disruption of thalamic metabolism at baseline, which progressed to 'moderate' at 1-year follow up; this condition appeared stabilized at 2-year follow up, with slight cerebellar hypometabolism. Patient 5 showed frontal-region impairment at baseline, which appeared stabilized at 1-year follow up.

In the Li patient subgroup, cranial PET showed an increased degree of hypometabolism in the frontal and temporo-parietal regions as well as in the thalamus and basal ganglia at 1 year of treatment in patient 6, but cerebellar function remained stable (Fig. 2b). This condition was unchanged at 2-year follow up. Patient 8 showed progressive increases in thalamic hypometabolism during the first and second years of treatment, and cerebellar changes also became apparent at 2-year follow up. Patient 9, who had the highest disability score at baseline and throughout treatment in the Li subgroup, showed improved frontal and temporo-parietal metabolism at 1-year follow up.

Table 2
Patient characteristics.

	Gender	ChT genotype ^a	NPC1 genotype	Age at treatment start	Treatment duration ^b	Dosage
<i>Early-infantile</i>						
Patient 1	Male	(dup/wt)	NPC40 ^c	2 Years 6 months	4 Years	100 mg b.i.d.
Patient 2	Female	(wt/wt)	NPC17 ^c	4 Years 6 months	6 Months	200 mg b.i.d.
Patient 3	Female	n.d.		3 Years 1 month	1 Year	50 mg t.i.d.
Patient 4	Female	(wt/wt)	NPC43 ^d	1 Year 4 months	2 Years	50 mg t.i.d.
Patient 5	Male	(wt/wt)	- ^e	4 Years	1 Year 2 months	30 mg t.i.d.
<i>Late-infantile</i>						
Patient 6	Female	(wt/wt)	NPC22 ^c	8 Years 7 months	2 Years 7 months	200 mg b.i.d.
Patient 7	Male	(wt/wt)	NPC31 ^c	2 Years 7 months	2 Years	50 mg b.i.d.
Patient 8	Female	(dup/wt)	NPC36 ^c	5 Years 7 months	4 Years	100 mg t.i.d.
Patient 9	Male	(wt/wt)	- ^e	6 Years 2 months	2 Years	100 mg b.i.d.
<i>Juvenile</i>						
Patient 10	Male	(wt/wt)	NPC34 ^c	15 Years 7 months	3 Years	200 mg t.i.d.
Patient 11	Male	(dup/wt)	NPC32 ^c	14 Years 1 month	4 Years	200 mg b.i.d.
Patient 12	Female	dup/19E10 + 43		11 Years	4 Years	100 mg t.i.d.
Patient 13	Male	(dup/wt)	- ^e	14 Years	3 Years	200 mg b.i.d.
Patient 14	Male	(dup/wt)	- ^e	13 Years 10 months	21 Months	200 mg t.i.d.
Patient 15	Female	(wt/wt)	- ^e	6 Years	1 Year	100 mg t.i.d.
Patient 16	Male	(wt/wt)	- ^e	10 Years	1 Year	100 mg b.i.d.
<i>Asymptomatic</i>						
Patient 17	Female	(dup/wt)	NPC24 ^c	-	No treatment	-

^a wt, wild-type allele; (dup/wt), 24-bp duplication in one allele; wt/wt, no duplication.^b Treatment duration at observation cut-off; ChT, chitotriosidase; n.d., not determined.^c Ref. [21].^d Ref. [22].^e Publication in draft.**Fig. 1.** Composite disability score in (a) EI patients, (b) Li patients, and (c) juvenile patients with NPC.

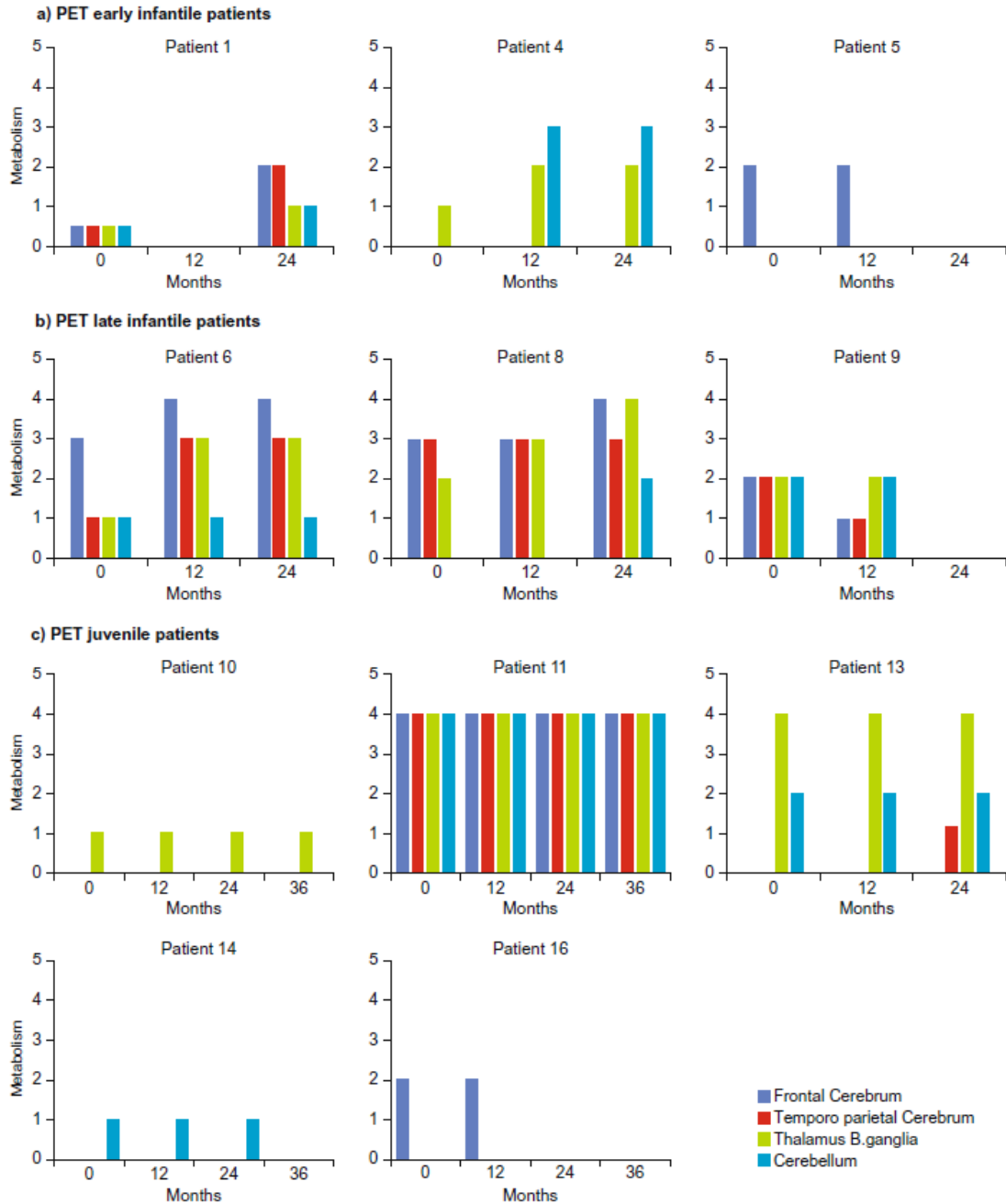


Fig. 2. PET in (a) EI patients, (b) Li patients, and (c) juvenile patients with NP-C. Findings at last PET evaluation are shown. Treatment periods may have extended past the last evaluation point. Scores range from 0 (normal cerebral metabolism) to 5 (severe impairment).

In the juvenile patient subgroup, cranial PET indicated stabilization throughout 3 years of treatment in patient 10 (Fig. 2c). Patient 11, who had the highest disability score in this subgroup, showed a generalized hypometabolism in all cerebral and cerebellar regions at baseline, which remained stable during 3 years of treatment. Patient 14 showed no changes on PET during 2 years of follow up, which appears in agreement with a lack of change in this patient's disability score throughout observation. Brain metabolism was af-

ected in the thalamic and cerebellar regions and in the basal ganglia in Patient 13 at baseline and follow up at 2 years. There was slight hypometabolism in the temporo-parietal cerebrum at 2 years, whereas there had been none at baseline or 1-year follow up.

Findings from cranial PET assessments in the asymptomatic patient showed stable cerebral, thalamic and cerebellar function throughout 4 years of follow up (data not shown).

Cognitive development and function

In the EI patient subgroup, patient 1 experienced substantial worsening of developmental cognitive function during follow up, which paralleled increases in his disability scores; his IQ score was 71 at baseline, which fell to 20 at both 1 and 2 years of treatment. Patient 4 showed stable developmental cognitive function at 2 years of treatment, with very slight retardation. No follow-up information on cognitive function was available for patients 2 and 5, as both patients died. It was not possible to evaluate cognitive development and function in patient 3 due to progressive neurological manifestations of the disease. Cognitive development and function data were not available from patients 9, 15 and 16.

In the Li patient subgroup, patients 6, 7 and 8 experienced progressive reductions in cognitive function during 2 years of treatment. It was not possible to evaluate cognition beyond 2 years due to progressive cognitive impairment (IQ: <20) and the evolution of physical conditions of the disease.

In the juvenile patient subgroup, patient 13 showed worsening of cognitive function between baseline (IQ score 78) and 1-year follow up (IQ score 55), but cognition has since remained stable throughout years 2 and 3. Cognitive function decreased during the first year of treatment in patient 11 (IQ score 35 at baseline and 20 at 1-year follow up), which reflected a parallel increase in disability scale score. Patients 10, 12 and 14 showed stable cognitive function (IQ score 40–50) during the first year of treatment. IQ

scores for patient 10 ranged from 50 at 2 years of treatment to 40 at 3 years. Patient 14 had an IQ score < 40 at 2 years of treatment.

Cognitive function has remained stable in the asymptomatic patient throughout 4 years of follow up. IQ scores ranged between 70 and 80 throughout the observation period.

Plasma ChT and CCL18 activities

Genotyping analyses for the 24-bp duplication polymorphism in the ChT gene was conducted in 16/17 patients. Plasma ChT 'pseudo-deficiency' was confirmed for seven patients (i.e. those with the 24-bp duplication in one ChT gene allele); patients 1, 8, 11, 12, 13, 14 and 17. Overall, plasma ChT activity was lower in the juvenile patient subgroup (value range; 52–474 nmol/ml h) than in the EI (value range; 316–3245 nmol/ml h) and Li subgroups (value range; 323–2744 nmol/ml h) (Fig. 3), and was increased in patients who discontinued treatment (e.g. patients 3 and 10, who both discontinued based on family decisions). The asymptomatic patient showed the lowest plasma ChT activity during 4 years of follow up (values range; 60–47 nmol/ml h).

Similar to findings with plasma ChT (overall value range; 52–3245 nmol/ml h), patients in the EI (value range; 851–1691 ng/ml) and Li subgroups (value range; 176–950 ng/ml) had higher plasma CCL18 activities compared with both the juvenile patient subgroup (value range; 112–874 ng/ml) and the asymptomatic patient (value range; 213–423 ng/ml) (Fig. 4).

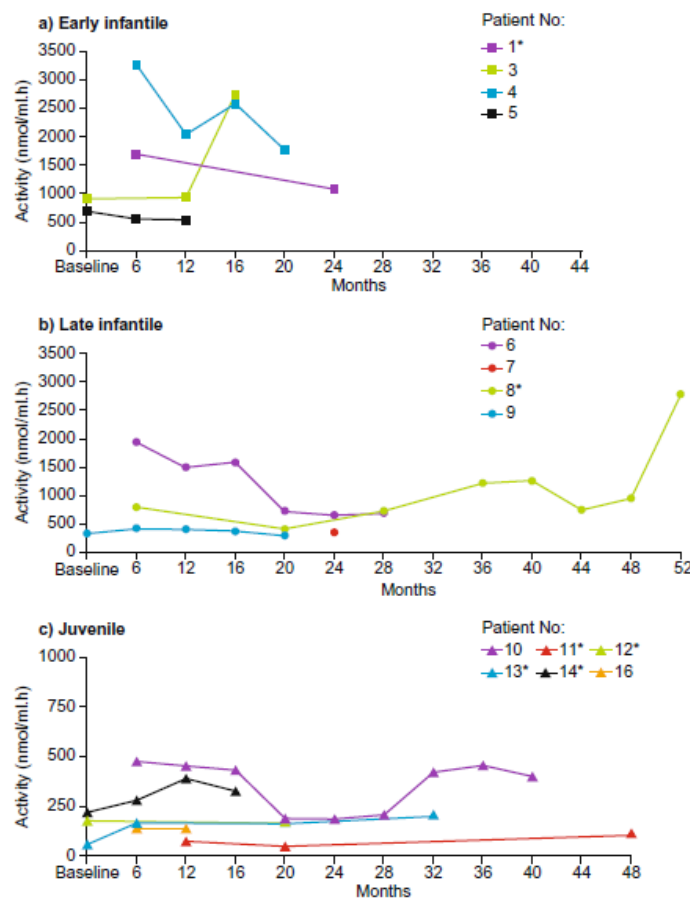


Fig. 3. Plasma ChT activity in (a) EI patients, (b) Li patients, and (c) juvenile patients with NP-C. *Pseudo-deficiency patients, possessing 24-bp duplication in one ChT gene allele; ChT, chitotriosidase. Note: plasma ChT activity in normal, healthy subjects is < 50 nmol/ml h. Data not available for patient 2 and patient 15.

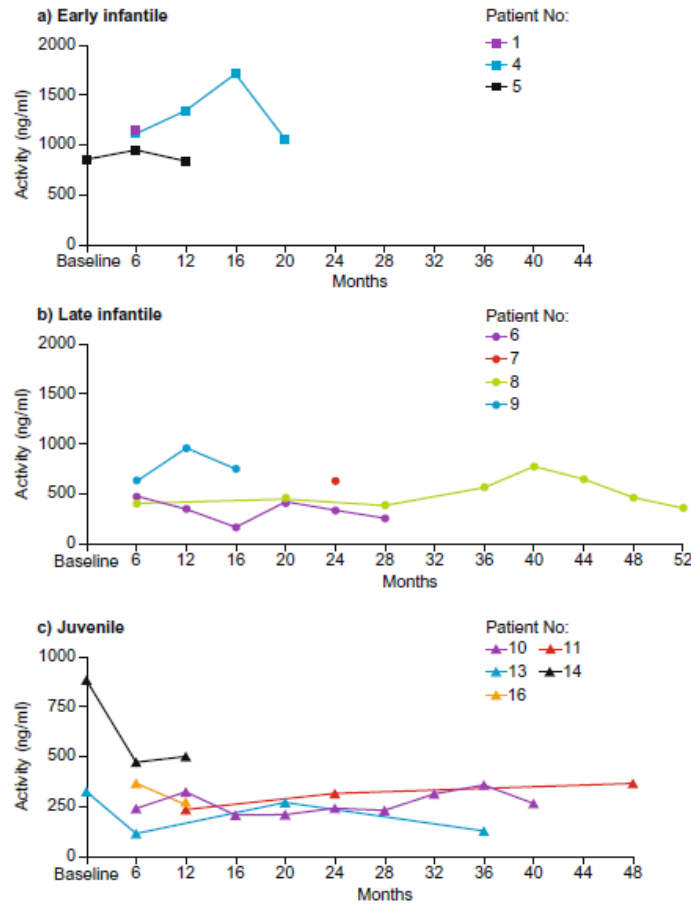


Fig. 4. Plasma CCL18 activity in (a) EI patients, (b) Li patients, and (c) juvenile patients with NP-C. Note: plasma CCL18 activity in normal, healthy subjects is zero. Data not available for patients 2, 3, 12 and 15.

Tolerability and safety

Miglustat was well tolerated, and no serious adverse events were recorded. The most frequently occurring adverse events were diarrhea and flatulence, which were managed satisfactorily using proper dietary and nutritional care such as the 'bland diet', an oral re-hydration solution, and loperamide. No patients showed clinically significant weight loss during the observation period.

Discussion

There are limited published case reports regarding the use of miglustat to treat pediatric patients with NP-C. Our case series assessed the effects of miglustat on disease progression in pediatric patients with different clinical forms of the disease. Our patients were classified on clinical grounds according to the age at onset of neurological symptoms. Splenomegaly did not appear to be a good marker of response to treatment, as there was no apparent effect of miglustat on spleen size; splenomegaly may be best considered as a disease hallmark for diagnosis. The disease-specific functional disability scale was a practical tool that provided valuable information from clinical assessments conducted according to a standard protocol. We modified our previous disability scale by adding epilepsy, which is a severe symptom that worsens the

disease, and ocular movements, as it is a hallmark of the disease. PET is expensive and is unlikely to be of practical use for routine clinical monitoring, but it has the potential to be used as a quantitative and objective marker of treatment efficacy in the early stages of disease. Further PET data on untreated patients would be valuable. Plasma ChT and CCL18 activities may serve as biochemical markers of therapeutic response in NP-C, although possible genetic deficiency should be taken into account in the case of ChT. However, ChT and CCL18 do not necessarily reflect the evolution of neurological disease.

Our findings regarding changes in neurological symptom progression, brain metabolism, cognitive status and plasma disease markers add to existing published data on the efficacy of miglustat from previous clinical trials and case reports. Pivotal efficacy data were reported from a 12-month randomized, controlled, clinical trial involving 29 juvenile and adult patients, and a parallel, non-controlled sub-study, involving 12 patients aged 4–12 years [17]. The primary study end point – horizontal saccadic eye movement velocity (HSEM- α) – was improved with miglustat versus standard care in adult and juvenile patients; similar improvements were seen in children included in the pediatric sub-study [17]. Improved swallowing capacity, stable auditory acuity, and slower deterioration of ambulation were also seen in miglustat-treated patients aged over 12 years. Further data, indicating stabilization of key parameters of neurological disease progression in NP-C, were reported in a retrospective observational cohort study in 66 patients

with a mean (standard deviation) age of 9.7 (7.6) years [18]. A published case series reported the efficacy of 24 months' miglustat therapy in three adult patients with NP-C, based on clinical evaluations and brain magnetic resonance spectroscopy (MRS) [23]. This study reported mild clinical improvement or stabilization in all patients. However, the findings were limited by the small number of patients and the choice of cerebral white matter to follow disease progression.

To date, cerebral PET scan data have not been reported from longitudinal follow up of patients with NP-C. Our PET imaging studies indicated that cerebral hypometabolism was stabilized in patients with juvenile-onset NP-C; miglustat appeared to slow progression of neurological symptoms. Patients with EI and Li forms of NP-C who started treatment in the advanced stages of the disease showed increased disability scores and progressive cerebral hypometabolism. Patient 9, who also had a high baseline disability score, showed an improvement on PET evaluation after 1 year of treatment. Control cranial PET and disability scale data indicated stable function over 4 years of follow up in the asymptomatic patient.

A published case series of two male Taiwanese patients with NP-C, who started miglustat therapy aged 14 and 9 years, reported substantial improvements in swallowing and ambulation by Month 6 of treatment, followed by stabilization of neurological symptoms between Months 6 and 12 [24]. Spleen size remained approximately stable throughout treatment in both patients and, predictably, there were no overt changes in plasma ChT activities. In our series, splenomegaly varied greatly between patients and over time, and did not appear related to treatment response or to neurological status. However, plasma CCL18 and ChT levels were higher in both the EI and Li patients compared with the juvenile group and the asymptomatic patient. Further, in patients with the EI and juvenile forms of NP-C, plasma ChT activities increased when patients discontinued therapy, suggesting that this marker is reflective of therapeutic response. The levels of plasma ChT and CCL18 indicated the presence of quantifiable, active disease in the asymptomatic patient.

Previous studies have demonstrated that both plasma ChT and CCL18 can serve as markers for the extent of pathological formation of lipid-laden macrophages in GD [10]. Further, reductions in plasma CCL18 levels have been shown able to reflect therapeutic corrections of the total-body burden of activated macrophages. It should also be noted that plasma CCL18 levels are affected by immune system activity, and it is possible that CCL18 levels might reflect specific immune processes during NP-C. Zimran et al. [25] characterized the inflammatory profile of patients with GD, and it might be that similar factors and processes are involved in the modulation of plasma CCL18 concentration in patients with NP-C.

Santos et al. [26] studied the effects of miglustat treatment in a 9-year old Brazilian patient, reporting a rapid and positive impact of therapy on cognitive function, ataxia, dysarthria and ophthalmoplegia. In addition, functional disability (assessed on the disability scale published by Iturriaga et al. [8]) was reduced from a pre-treatment score of 15 down to a score of 8, after treatment. These findings are comparable with data from our series. Although disability scale scores increased in patients with EI disease (e.g. in patient 1 at 2-year follow up), progression was slow compared with the natural evolution of this clinical form. In addition, patient 4 remained stable throughout 2 years of treatment, and a decrease in disability scores was observed in patients with the juvenile form of the disease (although this trend reversed at the onset of epilepsy).

With regard to cognitive function and developmental level, the severity of cognitive impairment appears strongly related to the age at which treatment is commenced; in general, cognitive outcomes were worse in younger patients. There was a clear worsen-

ing of cognitive scores in patients with EI and Li disease during follow up, but scores appeared to remain stable in patients with juvenile-onset disease.

Miglustat was generally well tolerated in our patient series. Some patients experienced episodes of diarrhea and flatulence at the onset of treatment, but there was no weight loss during the observation period. There were no reports of insomnia, paresthesia or fine tremors, which have been described in previous studies with miglustat [17,24,26].

In summary, the patients in our series who showed deterioration during miglustat therapy were those who were at a more advanced stage of the disease. This seems in agreement with a previous case of a male patient aged 3 years, where little therapeutic response was reported after 12 months' treatment with miglustat [27]. In general, patients with infantile NP-C generally exhibit greater symptom severity and more rapid disease progression than those with juvenile-onset disease [28], and therefore seem less likely to show appreciable therapeutic responses to miglustat therapy [9]. We consider that miglustat therapy should be commenced at or just before neurological signs start to appear. However, more data are necessary to define further the stages at which treatment is best initiated within the different clinical forms of NP-C.

Acknowledgments

Alpha-Plus Medical Communications Ltd provided medical writing assistance in the preparation of this report, paid for by Actelion Pharmaceuticals Ltd. The authors thank Dr. J.R. García Garzón, CETIR, PET Unit, Esplugues, Barcelona, who kindly performed the imaging studies, and are also grateful to the Spanish Niemann–Pick Foundation for providing research funding.

References

- [1] M.T. Vanier, G. Millat, Niemann–Pick disease type C, *Clin. Genet.* 64 (2003) 269–281.
- [2] J. Storch, Z. Xu, Niemann–Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking, *Biochim. Biophys. Acta* 1791 (2009) 671–678.
- [3] D.E. Sleat, J.A. Wiseman, M. El-Banna, S.M. Price, L. Verot, M.M. Shen, G.S. Tint, M.T. Vanier, S.U. Walkey, P. Lobel, Genetic evidence for nonredundant functional cooperativity between NPC1 and NPC2 in lipid transport, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 5886–5891.
- [4] G. Millat, K. Chikh, S. Naureckiene, D.E. Sleat, A.H. Fensom, K. Higaki, M. Elleder, P. Lobel, M.T. Vanier, Niemann–Pick disease type C: spectrum of HEI mutations and genotype/phenotype correlations in the NPC2 group, *Am. J. Hum. Genet.* 69 (2001) 1013–1021.
- [5] M.T. Vanier, Lipid changes in Niemann–Pick disease type C brain: personal experience and review of the literature, *Neurochem. Res.* 24 (1999) 481–489.
- [6] M.T. Vanier, Biochemical studies in Niemann–Pick disease I. Major sphingolipids of liver and spleen, *Biochim. Biophys. Acta* 750 (1983) 178–184.
- [7] J.E. Wraith, N. Guffon, M. Rohrbach, W.L. Hwu, G.C. Korenke, B. Bambi, C. Luzy, R. Giorgino, F. Sedel, Natural history of Niemann–Pick disease type C in a multicentre observational retrospective cohort study, *Mol. Genet. Metab.* 98 (2009) 250–254.
- [8] C. Iturriaga, M. Pineda, E.M. Fernandez-Valero, M.T. Vanier, M.J. Coll, Niemann–Pick C disease in Spain: clinical spectrum and development of a disability scale, *J. Neurol. Sci.* 249 (2006) 1–6.
- [9] J.E. Wraith, M.R. Baumgartner, B. Bambi, A. Covanis, T. Levade, E. Mengel, M. Pineda, F. Sedel, M. Topcu, M.T. Vanier, H. Widner, F.A. Wijburg, M.C. Patterson, Recommendations on the diagnosis and management of Niemann–Pick disease type C, *Mol. Genet. Metab.* 98 (2009) 152–165.
- [10] R.G. Boot, M. Verhoek, M. de Fost, C.E. Hollak, M. Maas, B. Bleijlevens, M.J. van Breemen, M. van Meurs, L.A. Boven, J.D. Laman, M.T. Moran, T.M. Cox, J.M. Aerts, Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention, *Blood* 103 (2004) 33–39.
- [11] Y. Guo, W. He, A.M. Boer, R.A. Wevers, A.M. de Bruijn, J.E. Groener, C.E. Hollak, J.M. Aerts, H. Galjaard, O.P. van Diggelen, Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders, *J. Inher. Metab. Dis.* 18 (1995) 717–722.
- [12] M. Ries, E. Schaefer, T. Luhrs, L. Mani, J. Kuhn, M.T. Vanier, F. Krummenauer, A. Gal, M. Beck, E. Mengel, Critical assessment of chitotriosidase analysis in the rational laboratory diagnosis of children with Gaucher disease and Niemann–Pick disease type A/B and C, *J. Inher. Metab. Dis.* 29 (2006) 647–652.

- [13] M.C. Patterson, F. Platt, Therapy of Niemann–Pick disease, type C, *Biochim. Biophys. Acta* 1685 (2004) 77–82.
- [14] T.D. Butters, R.A. Dwek, F.M. Platt, Inhibition of glycosphingolipid biosynthesis: application to lysosomal storage disorders, *Chem. Rev.* 100 (2000) 4683–4696.
- [15] M. Zervas, K.L. Somers, M.A. Thrall, S.U. Walkley, Critical role for glycosphingolipids in Niemann–Pick disease type C, *Curr. Biol.* 11 (2001) 1283–1287.
- [16] E. Lloyd-Evans, A.J. Morgan, X. He, D.A. Smith, E. Elliot-Smith, D.J. Silence, G.C. Churchill, E.H. Schuchman, A. Galione, F.M. Platt, Niemann–Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium, *Nat. Med.* 14 (2008) 1247–1255.
- [17] M.C. Patterson, D. Vecchio, H. Prady, L. Abel, J.E. Wraith, Miglustat for treatment of Niemann–Pick C disease: a randomised controlled study, *Lancet Neurol.* 6 (2007) 765–772.
- [18] M. Pineda, J.E. Wraith, E. Mengel, F. Sedel, W.L. Hwu, M. Rohrbach, B. Bembi, M. Walterfang, G.C. Korenke, T. Marquardt, C. Luzy, R. Giorgino, M.C. Patterson, Miglustat in patients with Niemann–Pick disease Type C (NP-C): a multicenter observational retrospective cohort study, *Mol. Genet. Metab.* 98 (2009) 243–249.
- [19] C.E. Hollak, S. van Weely, M.H. van Oers, J.M. Aerts, Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease, *J. Clin. Invest.* 93 (1994) 1288–1292.
- [20] M. Artieda, A. Cenarro, A. Ganan, I. Jerico, C. Gonzalvo, J.M. Casado, I. Vitoria, J. Puzo, M. Poci, F. Civeira, Serum chitotriosidase activity is increased in subjects with atherosclerosis disease, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 1645–1652.
- [21] E.M. Fernandez-Valero, A. Ballart, C. Iturriaga, M. Lluch, J. Macias, M.T. Vanier, M. Pineda, M.J. Coll, Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann–Pick type C patients: genotype–phenotype correlations, *Clin. Genet.* 68 (2005) 245–254.
- [22] J. Macias-Vidal, L. Gort, M. Lluch, M. Pineda, M.J. Coll, Nonsense-mediated mRNA decay process in nine alleles of Niemann–Pick type C patients from Spain, *Mol. Genet. Metab.* 97 (2009) 60–64.
- [23] D. Galanaud, A. Tourbah, S. Lehericy, N. Leveque, B. Heron, T. Billete de Villemeur, N. Guffon, F. Feillet, N. Baumann, M.T. Vanier, F. Sedel, 24 month-treatment with miglustat of three patients with Niemann–Pick disease type C: follow up using brain spectroscopy, *Mol. Genet. Metab.* 96 (2009) 55–58.
- [24] Y.H. Chien, N.C. Lee, L.K. Tsai, A.C. Huang, S.F. Peng, S.J. Chen, W.L. Hwu, Treatment of Niemann–Pick disease type C in two children with miglustat: initial responses and maintenance of effects over 1 year, *J. Inherit. Metab. Dis.* 30 (2007) 826.
- [25] A. Zimran, A. Bashkin, D. Elstein, B. Rudensky, R. Rotstein, M. Rozenblat, T. Mardi, D. Zeltser, V. Deutsch, I. Shapira, S. Berliner, Rheological determinants in patients with Gaucher disease and internal inflammation, *Am. J. Hematol.* 75 (2004) 190–194.
- [26] M.L. Santos, S. Raskin, D.S. Telles, A. Lohr Junior, P.B. Liberalesso, S.C. Vieira, M.L. Cordeiro, Treatment of a child diagnosed with Niemann–Pick disease type C with miglustat: a case report in Brazil, *J. Inherit. Metab. Dis.* (2008), doi:10.1007/s10545-008-0923-9 [Epub ahead of print].
- [27] A.R. Paciorowski, M. Westwell, S. Ounpuu, K. Bell, J. Kagan, C. Mazzarella, R.M. Greenstein, Motion analysis of a child with Niemann–Pick disease type C treated with miglustat, *Movement Disord.* 23 (2008) 124–128.
- [28] J. Imrie, S. Dasgupta, G.T. Besley, C. Harris, L. Heptinstall, S. Knight, M.T. Vanier, A.H. Fensom, C. Ward, E. Jacklin, C. Whitehouse, J.E. Wraith, The natural history of Niemann–Pick disease type C in the UK, *J. Inherit. Metab. Dis.* 30 (2007) 51–59.

Article 7 annex

Referència: Quijada-Fraile P, Martín-Hernández E, Martínez de Aragón A, Macías-Vidal J, Coll MJ, Nogales-Espert A, García-Silva MT. Niemann-Pick type C disease: From neonatal cholestasis to neurological degeneration. Different phenotypes. *An Pediatr (Barc)*. 2010; 73(5):257-63.

RESUM

La malaltia de NPC freqüentment es manifesta a l'edat pediàtrica, presentant gran variabilitat en les manifestacions clíniques. La malaltia condueix a un deteriorament neurològic amb diferents símptomes que estan relacionats amb l'edat. Una colèstasi neonatal transitòria, l'aparició d'esplenomegàlia i/o hepatomegàlia poden precedir en anys als símptomes neurològics.

Es presenten els 6 casos de NPC diagnosticats a la Unidad Pediàtrica de Enfermedades Raras, Mitocondriales y Metabólicas Hereditarias de l'Hospital Universitario 12 de Octubre. Es revisen les manifestacions clíniques, les ressonàncies magnètiques i l'anàlisi molecular d'aquests pacients.

Tots van arribar a la consulta abans dels 6 anys, 5 dels pacients van presentar afectació hepàtica i/o colèstasi durant el període neonatal. En 2 dels casos es va detectar ascites en el període prenatal. La presència d'esplenomegàlia es va observar en 5 d'ells. I en tots els casos es van detectar mutacions al gen *NPC1*.

Aquest treball posa de rellevància la importància d'identificar els primers símptomes clínics per poder diagnosticar aquesta malaltia precoçment, ja que això dirigiria cap a un tractament adequat. D'altra banda també és important assessorar a les famílies i proporcionar-les hi un correcte consell genètic.



ORIGINAL

Enfermedad de Niemann-Pick tipo C: desde una colestasis neonatal hacia un deterioro neurológico. Variabilidad fenotípica

P. Quijada Fraile^a, E. Martín Hernández^a, A. Martínez de Aragón^b, J. Macías-Vidal^c, M.J. Coll^c, A. Nogales Espert^d y M.T. García Silva^{a,*}

^aUnidad Pediátrica de Enfermedades Raras, E. Mitocondriales y Metabólicas Hereditarias, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España

^bNeurorradiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España

^cInstituto de Bioquímica Clínica, Hospital Clínic, Universidad de Barcelona, Barcelona, España

^dDepartamento de Pediatría, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España

Recibido el 10 de junio de 2010; aceptado el 14 de julio de 2010

PALABRAS CLAVE

Enfermedad de Niemann-Pick tipo C;
Colestasis neonatal;
Esplenomegalia;
Parálisis de la mirada vertical

Resumen

Introducción: La enfermedad de Niemann-Pick tipo C está causada por un defecto en el transporte intracelular de colesterol que produce un acúmulo de lípidos en los lisosomas de diferentes tejidos. Es una enfermedad rara, debida generalmente a mutaciones en el gen *NPC1* y solo unos pocos casos se asocian a mutaciones en el gen *NPC2*. Frecuentemente se manifiesta en la edad pediátrica, presentando gran variabilidad en las manifestaciones clínicas. La enfermedad conduce a un deterioro neurológico con diferentes síntomas que están relacionados con la edad. Una colestasis neonatal transitoria, la aparición de esplenomegalia y/o hepatomegalia pueden preceder en años a los síntomas neurológicos. **Pacientes y métodos:** Presentamos los 6 casos diagnosticados en nuestra unidad en los últimos 20 años. Se han revisado las manifestaciones clínicas, los hallazgos neurorradiológicos (RM) y el análisis molecular de todos ellos.

Resultados: Todos se presentaron antes de los 6 años y 5 casos tuvieron afectación hepática y/o colestasis en el periodo neonatal. En 2 casos se detectó ascitis en el periodo prenatal. La presencia de esplenomegalia se objetivó en 5 casos. En todos los casos se detectaron mutaciones en el gen *NPC1*.

Conclusión: Es importante el conocimiento de esta enfermedad y la identificación de los síntomas clínicos precoces para poder diagnosticarla precozmente, lo que conllevaría a un tratamiento adecuado, pudiendo evitar procedimientos innecesarios. Por otra parte es importante asesorar adecuadamente a las familias y proporcionar un consejo genético.

© 2010 Asociación Española de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mgarcias.hdoc@salud.madrid.org (M.T. García Silva).

KEYWORDS

Niemann-Pick type C disease;
Neonatal cholestasis;
Splenomegaly;
Vertical gaze palsy

Niemann-Pick type C disease: From neonatal cholestasis to neurological degeneration. Different phenotypes

Abstract

Introduction: Niemann-Pick type C is a lysosomal storage disorder caused by a defect in intracellular trafficking of cholesterol. It is a rare disease, usually caused by mutations in *NPC1* gene, but in some cases by mutations in *NPC2* gene. Usually it is present in the paediatric age with a great variability of clinical manifestations. This disease leads to neurological degeneration with various age-related symptoms. Transient neonatal cholestasis, the appearance of splenomegaly and/or hepatomegaly may occur years before the neurological symptoms.

Patients and methods: We report 6 cases diagnosed in our unit in the last 20 years. We reviewed the clinical manifestations, neuroradiological findings (MRI) and molecular analysis of all of them.

Results: The disease began before 6 years of age and 5 cases had liver dysfunction and cholestasis in the neonatal period. Ascites was detected in 2 cases in prenatal period. Five cases have or had splenomegaly. Mutations in *NPC1* gene were detected in all of them.

Conclusions: It is important to understand this disease and the identification of early clinical symptoms to make an early diagnosis, leading to appropriate treatment and avoiding unnecessary tests. Moreover, it is important to suitably advise families and provide them with genetic counselling.

© 2010 Asociación Española de Pediatría. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC) es debida a un defecto en el transporte intracelular de colesterol, esfingolípidos y glicoesfingolípidos, que se acumulan junto al colesterol no esterificado en los endosomas tardíos y lisosomas¹. La incidencia estimada de la enfermedad es de 1/150.000 recién nacidos vivos en Europa. Se hereda de forma autosómica recesiva y es producida en la mayoría de los casos (95%) por mutaciones en el gen *NPC1* y en una pequeña proporción (5%) en el *NPC2*. Afecta al sistema nervioso central, produciendo un deterioro neurológico y a otros órganos como el hígado y el bazo^{2,3}.

Existe una gran variabilidad de manifestaciones clínicas⁴. La forma más frecuente de presentación asocia una colestasis neonatal transitoria, la aparición de esplenomegalia y/o hepatomegalia progresiva y posteriormente síntomas neurológicos. Entre las manifestaciones neurológicas destacan las alteraciones en la motilidad ocular siendo característica la parálisis de la mirada vertical, también pueden tener disfagia, disartria, ataxia, distonía, crisis epilépticas, daño cognitivo progresivo, síntomas psiquiátricos y crisis de cataplejía gelástica. La hepatoesplenomegalia es un signo frecuente, pero su ausencia no excluye el diagnóstico.

Se han establecido 5 formas clínicas⁵ dependiendo de la edad de presentación de los síntomas neurológicos. Forma infantil precoz (<2 años), forma infantil tardía (2-6 años), forma juvenil (6-16 años), forma adulta (>16 años). Además existe una forma perinatal de aparición precoz y con mala evolución clínica. En la tabla 1 se muestran los síntomas neurológicos y sistémicos más frecuentes en las distintas formas clínicas. A continuación presentamos los

casos con enfermedad de NPC de nuestro centro con el objetivo de dar a conocer esta patología y alertar a los pediatras para realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad.

Pacientes y métodos

Desde el año 1990 se han diagnosticado 6 pacientes (de entre 0 y 12 años de edad) con enfermedad de NPC en nuestra unidad. Hemos realizado un estudio descriptivo mediante la revisión de las historias clínicas. En todos los casos se ha confirmado el diagnóstico en fibroblastos cultivados demostrando un acúmulo de colesterol no esterificado en los lisosomas después de realizar el análisis citoquímico con filipina⁶. Mediante la utilización del microscopio óptico con luz ultravioleta se puede observar un acúmulo de vesículas perinucleares fluorescente que indican la localización y el aumento cualitativo de colesterol no esterificado. Se define «fenotipo clásico» a los casos que presenta la tinción con filipina claramente positiva y «fenotipo variante» a los casos en los que el aumento de vesículas fluorescente es muy escaso o prácticamente nulo. El diagnóstico bioquímico se confirmó mediante el análisis molecular. El diagnóstico molecular se realizó a través de la amplificación del DNA a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los distintos exones y zonas intrónicas flanqueantes del gen *NPC1* y posterior secuenciación de dichos fragmentos siguiendo protocolos previamente establecidos⁷. Se han revisado las manifestaciones clínicas, los hallazgos neuroradiológicos (RM) y el análisis molecular de todos ellos. Se ha solicitado consentimiento informado a los familiares de acuerdo con el comité de ética del centro.

Tabla 1 Síntomas y signos clínicos de la enfermedad de NPC según las formas clínicas modificado de NP-C Guidelines Working Group⁵

Formas clínicas	Manifestaciones sistémicas	Manifestaciones neurológicas
<i>Pre/perinatal</i> (≤3 meses)	Hidrops, hepatoesplenomegalia, ascitis fetal persistente o no al nacimiento, colestasis prolongada, insuficiencia respiratoria, fallo hepático	No reconocidas
<i>Infantil precoz</i> (3 meses a 2 años)	Hepatoesplenomegalia o hepatomegalia o esplenomegalia aislada	Retraso psicomotor, hipotonía central, hipoacusia, parálisis de la mirada vertical (rara)
<i>Infantil tardío</i> (2 años a 6 años)	Visceromegalia (frecuente)	Caídas frecuentes, torpeza motora, ataxia, distonía, disfagia y disartria progresivas, hipotonía central, hipoacusia, crisis convulsivas, cataplejía, parálisis de la mirada vertical
<i>Juvenil</i> (6 a 15 años)	Visceromegalia (no siempre)	Fracaso escolar, problemas de aprendizaje, problemas de conducta, caídas frecuentes, torpeza motora, ataxia, disartria, distonía, disfagia, mioclonías, cataplejía, crisis convulsivas, parálisis de la mirada vertical
<i>Adolescente y adultos</i> (> 15 años)	Visceromegalia (no siempre presente) o esplenomegalia aislada (en algunos casos)	Torpeza, cataplejía, síntomas psiquiátricos, deterioro cognitivo, demencia, parálisis de la mirada vertical, ataxia, distonía, disartria, disfagia, mioclonías, crisis (parciales o generalizadas)

Resultados

Caso 1: niño de 3 años de edad que presentó ascitis masiva y hepatoesplenomegalia sin otros signos de hidrops fetal en la semana 20 de gestación. El parto fue en la semana 31 mediante cesárea. Durante el periodo neonatal presentó ascitis de difícil control, colestasis neonatal y disfunción hepática. Se le realizó biopsia hepática que mostró intensa colestasis hepatocitaria y canalicular y leve ductopenia, sugestiva de pobreza de ductos biliares. Además presentó una hemorragia intraventricular grado II/III (debido a la prematuridad y a una coagulopatía secundaria a la afectación hepática). Durante el primer año de vida continuó con hepatoesplenomegalia, desarrollando una enfermedad crónica hepática y cirrosis con hipertensión portal además de retraso psicomotor severo. A los 2 años y medio sufrió un deterioro neurológico. En la exploración actual presenta hepatomegalia y esplenomegalia, espasticidad en miembros inferiores, temblor, distonía leve, sedestación inestable, estrabismo alternante, paresia de la mirada vertical y lesiones de dermatitis palpebral. Recientemente refiere crisis de cataplejía. Se realizó una RM cerebral a los 2,2 años donde se objetivó una alteración en la mielinización periventricular.

Caso 2: niña en la que se detectó ascitis masiva a las 30 semanas de gestación. Desde el nacimiento presentó gran hepatoesplenomegalia con hipertensión portal, instaurándose un fallo hepático que motivó 2 trasplantes hepáticos. Tras fallo del injerto falleció al 1,5 meses de vida. Los hallazgos anatomopatológicos en la biopsia hepática mostraron abundantes mielinosomas en el citoplasma de las células de Kupffer y en los hepatocitos correspondientes a lípidos parcialmente metabolizados en los lisosomas. Tras la

autopsia se objetivó mediante microscopio electrónico abundante material de depósito en el citoplasma de las neuronas constituido por pequeños cuerpos pleomórficos (la mayor parte formados por membranas que se disponen concéntricamente).

Caso 3: niña de 4 años. Durante el embarazo se objetivó un retraso del crecimiento intrauterino en el último trimestre. En el periodo neonatal presentó ictericia prolongada que no requirió ingreso. Desde los primeros meses de vida se objetivó escasa ganancia ponderal. Hacia los 3 meses se evidenció una gran hepatoesplenomegalia. A los 2 años se le realizó una esplenectomía, lo que precipitó una regresión neurológica importante. Ha tenido varios episodios de neumonía con insuficiencia respiratoria. En la actualidad presenta una encefalopatía con tetraparesia espástica, paresia de la mirada vertical y ausencia de lenguaje. Tiene crisis de cataplejía gelástica y crisis convulsivas. Se ha realizado RM cerebral a los 4 años en la que se ha objetivado atrofia corticosubcortical, fundamentalmente supratentorial, alteración en la mielinización que afecta predominantemente a la sustancia blanca posterior y subcortical. En la espectroscopia, hay descenso del pico de N-acetil-aspartato (Naa) tanto en ganglios basales como en centro semioval.

Caso 4: niño de 8 años. Desde el nacimiento presentó alteraciones en la pigmentación cutánea de forma lineal en el tronco (hemitórax izquierdo) y en la cara interna de la pierna sugerentes de hipomelanosis de ito. Durante el primer año de vida no le notaron nada anormal salvo estridor laríngeo ocasional. Desde el segundo año de vida se apreció un retraso del lenguaje y progresivamente torpeza motora. A partir de los 3 años de edad sufrió una regresión neurológica y ataxia. A los 5 años comenzó con alteración en

la deglución y posteriormente con epilepsia mioclónica resistente a múltiples fármacos antiepilépticos. A la edad de 5 años acude por primera vez a nuestra consulta con el diagnóstico de hipomelanosis de Ito y en la exploración presentaba esplenomegalia, déficit intelectual, ataxia, coordinación deficiente y ptosis palpebral leve del ojo derecho. A los 6 años desarrolló parálisis de la mirada vertical. En la RM cerebral realizada a los 5 años se objetivó atrofia mesial con dilatación del asta temporal.

Caso 5: niña de 5 años, de origen ecuatoriano, hija de padres consanguíneos. Desde el primer mes de vida presentó colestasis que remitió al año de vida, hepatoesplenomegalia y posteriormente retraso psicomotor severo con marcada hipotonía y ataxia. Le realizaron una biopsia hepática donde se objetivó moderada fibrosis portal y una intensa colestasis intrahepática con células espumosas sugestivas de enfermedad de depósito lipídico. A los 4 años comenzó con crisis de cataplejía gelástica, crisis epilépticas y parálisis de la mirada vertical. En la actualidad presenta hipotonía, ataxia y persiste la esplenomegalia. En la RM cerebral realizada a los 5 años se objetivó alteración severa de la mielinización.

Caso 6: niño de 12 años de edad. En el periodo neonatal presentó colestasis neonatal y posteriormente hepatopatía crónica con hepatoesplenomegalia. Se le realizó una biopsia hepática donde se objetivó una hepatopatía colestática con ductopenia. A los 5 años y medio comenzó con parálisis de la mirada vertical. A los 8 años inició una regresión neurológica con mal rendimiento escolar y déficit de atención seguido de deterioro cognitivo siendo remitido a nuestra consulta a los 9 años. A los 11 años presentó crisis convulsivas. En la exploración presenta ataxia, parálisis de la mirada vertical sin hepatoesplenomegalia. Se le ha realizado RM cerebral a los 9 años donde no se objetivaron alteraciones, salvo un quiste aracnoideo.

En todos los casos se observaron depósitos de colesterol no esterificado en fibroblastos mediante la tinción histoquímica con filipina, presentando todos un «fenotipo clásico» excepto el caso 4 que resultó ser un «fenotipo variante». El diagnóstico se confirmó con el estudio genético, hallándose mutaciones en el gen *NPC1* en los 6 pacientes.

Todos los casos reciben actualmente tratamiento con miglustat (un inhibidor de la glucosilceramida sintasa responsable del primer paso de la síntesis de los glucolípidos). En la tabla 2 se muestra la edad de inicio de los síntomas extraneurológicos y neurológicos, edad de confirmación bioquímica, fenotipo bioquímico, análisis molecular e inicio de tratamiento de todos los casos.

Discusión

La enfermedad de NPC presenta una gran variedad de manifestaciones clínicas. Los síntomas extraneurológicos comenzaron en el periodo perinatal en 5 de los casos presentados. Todos menos el caso 4 presentaron colestasis neonatal y hepatopatía. Estos síntomas ayudan a un diagnóstico precoz de la enfermedad. En ocasiones es difícil discriminar cuáles son los primeros síntomas neurológicos debidos a la enfermedad de NPC en niños con retraso psicomotor previo, como en el caso 1. En el caso 2, con una forma perinatal y cuadro clínico muy grave, no se

detectaron síntomas neurológicos, pero hay que destacar que aún en ausencia de los mismos en el examen neuropatológico se evidenciaron alteraciones propias de enfermedad de depósito en las neuronas.

Es importante remarcar que nuestra casuística apoya la experiencia de otros centros, en estos aconsejan que se debe pensar en esta enfermedad en cuadros de colestasis neonatal de etiología incierta⁸ y en las hepatitis idiopáticas neonatales⁹. En un estudio realizado en el Reino Unido objetivaron que la enfermedad de NPC es la segunda causa genética de enfermedad hepática en la infancia después del déficit de alfa-1 antitripsina¹⁰. Yerushalmi B refiere que la enfermedad de NPC es la causa más común de enfermedad metabólica/genética que se presenta como colestasis neonatal. Por otro lado el grado de afectación hepática no es un indicador de la gravedad de la progresión neurológica de la enfermedad^{9,11} (puesto que algunos evolucionan como formas adultas).

La esplenomegalia es un signo más consistente que la hepatomegalia en los niños, debemos tenerlo en cuenta para llegar a un diagnóstico precoz de la enfermedad¹². Todos los casos vistos en nuestra unidad han tenido o tienen esplenomegalia. De hecho el caso 3 sufrió una regresión neurológica rápida precipitada tras la esplenectomía por el acúmulo de lípidos en el sistema nervioso.

Entre los síntomas neurológicos la parálisis de la mirada vertical es un signo característico que suele aparecer de 2 a 4 años después de los signos de afectación cerebelosa y muy próximo al inicio de otros síntomas secundarios a afectación de tronco cerebral¹³. Se ha objetivado en todos nuestros casos excepto en el caso 2. Las crisis de cataplejía gelástica aparecieron en el caso 3 a la edad de 3 años y en el caso 5 a la edad de 4 años, similar a lo referido en otros artículos¹³.

La progresión de la enfermedad es más rápida cuando los síntomas se inician precozmente¹⁴. El único tratamiento que existe actualmente es la terapia de reducción de sustrato con miglustat^{15,16}. Este fármaco está aprobado como medicamento de uso compasivo.

En un estudio reciente se ha demostrado enlentecimiento en la manifestación de los síntomas neurológicos de la enfermedad¹⁷. Existen dudas razonables sobre el momento adecuado para iniciar el tratamiento en los diagnósticos precoces que aún no han empezado con el deterioro neurológico. Se recomienda administrarlo justo en el momento en el que aparecen los síntomas neurológicos¹⁸. Esta decisión es difícil en los casos con retraso psicomotor previo como en el caso 1.

La RM cerebral en la enfermedad de NPC no suele mostrar imágenes específicas. Es frecuente ver atrofia cerebral a lo largo de la evolución y en particular atrofia del vermis cerebeloso¹⁹. También se puede observar adelgazamiento del cuerpo calloso y aumento de la señal en la sustancia blanca que puede reflejar una desmielinización secundaria¹⁵. En la enfermedad de NPC se pueden poner de manifiesto alteraciones en la espectroscopia cerebral²⁰ (descenso de la N-acetil-aspartato/creatina (Naa/Cr) en corteza frontal y parietal, centro semioval y núcleo caudado y aumento de colina/creatina en corteza frontal y centro semioval)²¹. En nuestra serie, algunos casos presentaron descenso de Naa. La RM con espectroscopia puede ser útil en el seguimiento de la enfermedad. En las figuras 1 y 2 se muestran las imágenes de las RM de los pacientes.

Tabla 2 Se muestran los síntomas extraneurológicos y neurológicos, edad de confirmación bioquímica, fenotipo bioquímico y análisis molecular

Caso	1	2	3	4	5	6
Inicio síntomas EN	Prenatal	Prenatal	Prenatal	2 años	Neonatal	Neonatal
1.º síntoma EN	+	+	+		+	+
Colestasis neonatal	+	+				
Ascitis fetal	+	+				
HE	+	+				
CIR			+			
Alt pigmentación				+		
Inicio síntomas N	1 año	-	2 años	1 año	1 año	5,5 años
Síntomas N						
Retraso psicomotor	+			+	+	
Regresión	+		+	+	+	+
Ataxia				+	+	+/ -
Temblor	+					
Distonía	+					+
Estrabismo	+					+
PMV	+				+	+
Tetraparesia			+			
Cataplejía	+		+		+	
Crisis convulsivas			+		+	
Edad diagnóstico	3 meses	3 meses	2 años	5,5 años	1 año	10 años
Fenotipo bioquímico ²²	Clásico	Clásico	Clásico	Variante	Clásico	Clásico
Análisis molecular ²⁷	p.[Q119VfsX8]+[D944N]	p.[G993EfsX4]+[G993EfsX4]	p.[Q775P]+[D944N]	p.[Q119VfsX8]+[G992W]	p.[C177Y]+[C177Y]	p.[N916del]+[A1151T]
Edad de inicio de tratamiento	15 meses	-	3 años	6 años	5 años	10,5 años

Alt: alteración; EN: extraneurológicos; HE: hepatoesplenomegalia; N: neurológicos; PMV: parálisis mirada vertical.

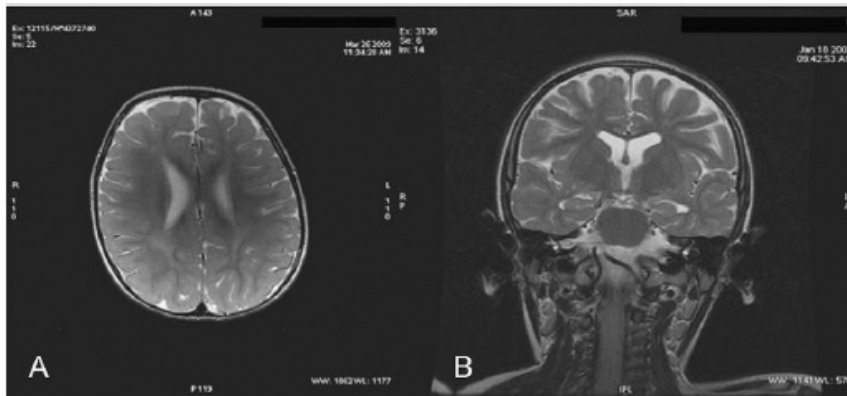


Figura 1 A) Caso 1: RM craneal, corte axial, T2: muestra escasa mielinización a la edad de 2 años. B) Caso 4: RM craneal, corte coronal, T2: se visualiza una atrofia cortico-subcortical supratentorial.

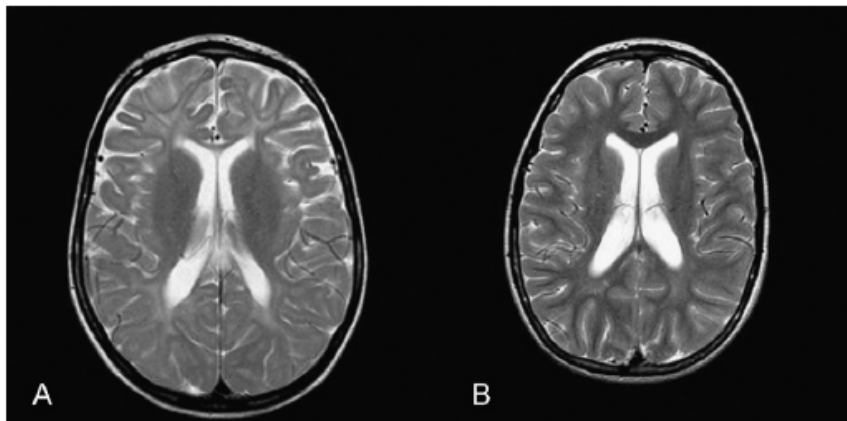


Figura 2 A) Caso 5: RM craneal, corte axial, T2: existe anomalía severa de la mielinización y atrofia cortico-subcortical. B) Caso 6: RM craneal, corte axial, T2: discreta atrofia cortico-subcortical.

El análisis bioquímico mostró que todos los pacientes presentan el fenotipo bioquímico clásico que es el más frecuente, a excepción del paciente 4 que presentó un fenotipo bioquímico variante²². El fenotipo variante suele dar formas juveniles o adultas, sin embargo nuestro caso es una forma infantil precoz. No se han encontrado hasta el momento marcadores bioquímicos de actividad de la enfermedad¹⁸ y que además sirvan como control del tratamiento. La quitotriosidasa no ha demostrado ser un buen marcador de progresión de la enfermedad²³.

El análisis molecular detectó mutaciones en el gen *NPC1* en todos los casos como en la mayor parte de los casos publicados^{7,24}. Esto permite el consejo genético a través del diagnóstico de heterocigotos y del diagnóstico prenatal. La heterogeneidad alélica de esta enfermedad es muy grande y dificulta la correlación genotipo/fenotipo clínico salvo algunas excepciones. En el caso de la mutación p.C177Y, hasta la fecha, siempre que se presentaba en homocigosis se correlacionaba con la presentación infantil tardía²⁴. En este trabajo, presentamos el primer paciente (caso 5) con este genotipo, pero con una presentación infantil precoz (tabla 2). Por otro lado, son de destacar ciertas correlaciones entre el genotipo y el fenotipo bioquímico. Este es el

caso de la mutación p.G992W, que tanto si se presenta en homo como en heterocigosis, presenta una forma bioquímica variante después de realizar la tinción citoquímica con filipina tal y como se ha descrito para todas las mutaciones que afectan al codón 992^{25,26}.

Conclusiones

La enfermedad de NPC debe incluirse en el diagnóstico diferencial de la ascitis de origen prenatal, la colestasis neonatal y la esplenomegalia, para poder realizar un diagnóstico y un tratamiento precoces. Debemos pensar en la enfermedad de NPC en cuadros neurodegenerativos sobre todo si hay alteración de la mirada vertical. La presencia de esplenomegalia orienta el diagnóstico pero su ausencia no lo descarta. Hay que resaltar que los primeros síntomas suelen ser precoces y extraneurológicos y preceden en un tiempo variable (meses o años) al deterioro neurológico. Es imprescindible la confirmación diagnóstica mediante el estudio citoquímico utilizando filipina sobre un cultivo de fibroblastos procedentes de una biopsia de piel y/o a través del análisis molecular en los genes *NPC1* y *NPC2* si fuese

necesario. Esto permitirá además realizar un consejo genético adecuado.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Patterson MC, Vanier MT, Suzuki K, Morris JA, Carstea E, Neufeld BD, et al. Niemann-Pick disease, type C: a lipid trafficking disorder. En: Scriver Cr, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B, editores. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3611–33. Ch 145.
- Zervas M, Dobrenis K, Walkley SU. Neurons in Niemann-Pick disease type C accumulates gangliosides as well as unesterified cholesterol and undergo dendritic and axonal alterations. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001;60:49–64.
- Pacheco CD, Lieberman AP. The pathogenesis of Niemann-Pick type C diseases: a role for autophagy? *Expert Rev Mol Med*. 2009;10:1–17.
- Garver WS, Francis GA, Jelinek D, Shepherd G, Flynn J, Castro G, et al. The National Niemann-Pick C disease database: report of clinical features and health problems. *Am J Med Genet A*. 2007;143A:1204–11.
- Wraith JE, Baumgartner MR, Bembi B, Covanis A, Levade T, Mengel E, et al. Recommendations on the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C. *Mol Genet Metab*. 2009;98:152–65.
- Kruth HS, Comly ME, Butler JD, Vanier MT, Fink JK, Wenger DA, et al. Type C Niemann-Pick disease. Abnormal metabolism of low density lipoprotein in homozygous and heterozygous fibroblasts. *J Biol Chem*. 1986;261:16769–74.
- Fernández-Valero EM, Ballart A, Iturriaga C, Lluch M, Macías J, Vanier MT, et al. Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: genotype-phenotype correlations. *Clin Genet*. 2005;68:245–54.
- Kelly DA, Portmann B, Mowat AP, Sherlock S, Lake BD. Niemann-Pick disease type C: diagnosis and outcome in children, with particular reference to liver disease. *J Pediatr*. 1994;124:655–6.
- Yerushalmi B, Sokol RJ, Narkewicz MR, Smith D, Ashmead JW, Wenger DA. Niemann-Pick Diseases type C in neonatal cholestasis at a North American Center. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2002;35:44–50.
- Mieli-Vergani G, Howard ER, Mowat AP. Liver disease in infancy: a 20 year perspective. *Gut Suppl*. 1991;5:123–8.
- Imrie J, Dasgupta S, Besley GTN, Harris C, Heptinstall L, Knight S, et al. The natural history of Niemann-Pick disease type C in the UK. *J Inher Metab Dis*. 2007;30:833.
- Imrie J, Wraith JE. Isolated splenomegaly as the presenting feature of Niemann-Pick disease type C. *Arch Dis Child*. 2001;84:427–9.
- Iturriaga C, Pineda M, Fernández-Valero EM, Varnier MT, Coll MJ. Niemann-Pick disease in Spain: Clinical spectrum and development of a disability scale. *J Neurol Sci*. 2006;249:1–6.
- Wraith JE, Guffon N, Rohrbach M, Hwu WL, Korenke GC, Bembi B, et al. Natural history of Niemann-Pick disease type C in a multicentre observational retrospective cohort study. *Mol Genet Metab*. 2009;98:250–4.
- Patterson MC, Vecchio D, Prady H, Abel L, Wraith JE. Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. *Lancet Neurol*. 2007;6:765–72.
- Chien YH, Lee NC, Tsai LK, Huang AC, Peng SF, Chen SJ, et al. Treatment of Niemann-Pick disease type C in two children with miglustat: Initial responses and maintenance of effects over 1 year. *J Inher Metab Dis*. 2007;30:826.
- Pineda M, Wraith JE, Mengel E, Sedel F, Hwu W-L, Rohrbach M, et al. Miglustat in patients with Niemann-Pick disease Type C (NP-C): A multicenter observational retrospective cohort study. *Mol Genet Metab*. 2009;98:243–9.
- Wraith JE, Baumgartner MR, Bembi B, Covanis A, Levade T, Mengel E, et al. Recommendations on the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C. *Mol Genet Metab*. 2009;98:152–65.
- Sevin M, Lesca G, Baumann N, Millat G, Lyon-Caen O, Varnier MT, et al. The adult form of Niemann-Pick type C. *Brain*. 2001;130:120–33.
- Wattjes MP, Harzheim M, Lutterbey GG, Bogdanow M, Schild HH, Träber F. High field MR imaging, 1H-MR spectroscopy in clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis: correlation between metabolic alterations and diagnostic MR imaging criteria. *J Neurol*. 2008;255:56–63.
- Tedeschi G, Bonavita S, Barton NW, Betolino A, Frank JA, Patronas NJ, et al. Proton magnetic resonance spectroscopic imaging in the clinical evaluation of patients with Niemann-Pick type C disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998;65:72–9.
- Vanier MT, Rodriguez-Lafrasse C, Rousson R, Gazzah N, Juge MC, Pentchev PG, et al. Type C Niemann-Pick disease: spectrum of phenotypic variation in disruption of intracellular LDL-derived cholesterol processing. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1096:328–37.
- Pineda M, Pérez-Poyato MS, O'Callaghan M, Vilaseca MA, Poci M, Domingo R, et al. Clinical experience with miglustat therapy in pediatric patients with Niemann-Pick disease type C: A case series. *Mol Genet Metab*. 2010;99:358–66.
- Macías-Vidal J, Gort L, Lluch M, Pineda M, Coll MJ. Nonsense-mediated mRNA decay process in nine alleles of Niemann-Pick type C patients from Spain. *Mol Genet Metab*. 2009;97:60–4.
- Millat G, Marçais C, Tomasetto C, Chikh K, Fensom AH, Harzer K, et al. Niemann-Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop. *Am J Hum Genet*. 2001;68:1373–85.
- Greer WL, Dobson MJ, Girouard GS, Byers DM, Riddell DC, Neuman PE. Mutations in NPC1 highlight a conserved NPC1-specific cysteine-rich domain. *Am J Hum Genet*. 1999;65:1252–60.
- Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat*. 2000;15:7–12.

Article 8 annex

Referència: Rodríguez-Pascau L, Toma C, Macías-Vidal J, Cozar M, Lykopoulou L, Coll MJ, Grinberg D, Vilageliu L. Characterisation of two deletions involving *NPC1* and flanking genes in Niemann-Pick type C disease patients. [Article sotmès a Molecular Genetics and Metabolism].

RESUM

S'han descrit més de 300 mutacions als gens *NPC1* i *NPC2* causants de malaltia, que inclouen petites delecions i insercions, mutacions de canvi de sentit, mutacions sense sentit i mutacions de *splicing*. En aquest treball es mostra que variants estructurals que afecten al gen *NPC1* poden estar també involucrades a la malaltia de NPC.

Per confirmar i caracteritzar la presència de dues grans delecions en hemizigosi a dos pacients, es va emprar la tècnica de QMPSF i l'anàlisi de segregació de diferents SNPs a ambdues famílies. Un dels pacients (NPC57) presenta en un al·lel una mutació de canvi de sentit prèviament descrita (p.T1066N) i a l'altre al·lel, una delecio heretada que inclou el gen *NPC1* sencer i part dels gens flanquejants *C18orf8* i *ANKRD29*. El segon pacient (NPC-G1) té una nova delecio d'un nucleòtid (c.852delT; p.F284LfsX26) i una delecio que afecta a part del gen *NPC1* i dels gens adjacents *ANKRD29* i *LAMA3*.

Aquests resultats representen la primera caracterització de dues microdelecions a la regió cromosòmica 18q11-q12 responsables de causar la malaltia de NPC i proporcionen una estratègia de cerca per aquells al·lells del gen *NPC1* pendents d'identificar.

Characterisation of two deletions involving *NPC1* and flanking genes in Niemann-Pick Type C disease patients

Laura Rodríguez-Pascau ^{a,b,c}, Claudio Toma ^{a,b,c}, Judit Macías-Vidal ^{b,d,e}, Mónica Cozar ^{a,b,c}, Bru
Cormand ^{a,b,c}, Lilia Lykopoulou ^f, Maria Josep Coll ^{b,d,e}, Daniel Grinberg ^{a,b,c,*}, Lluïsa Vilageliu ^{a,b,c,*}

^a Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^b CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain

^c Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain

^d Institut de Bioquímica Clínica, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic,
Barcelona, Spain

^e Institut d'investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

^f First Department of Pediatrics, University of Athens, "Aghia Sofia" Children's Hospital, Athens,
Greece

* Co-last authors

Corresponding author:

Lluïsa Vilageliu

Departament de Genètica, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

e-mail: lvilageliu@ub.edu

Telephone: +34 934021494

Fax: +34 934034420

Abstract

Niemann-Pick type C (NPC) disease is an autosomal recessive lysosomal disorder characterised by the accumulation of a complex pattern of lipids in the lysosomal-late endosomal system. More than 300 disease-causing mutations have been identified so far in the *NPC1* and *NPC2* genes, including indel, missense, nonsense and splicing mutations. We present the first report showing that structural variants encompassing *NPC1* are also involved in this disease. QMPSF and SNP inheritance analyses were used to confirm and further characterise the presence of hemizygous deletions in two patients. One of the patients (NPC57) bore a previously described missense mutation (p.T1066N) in one allele and an inherited deletion that included the whole *NPC1* gene and at least part of the flanking *C18orf8* and *ANKRD29* genes, in the other allele. The second patient (NPC-G1) had a novel 1-bp deletion (c.852delT; p.F284Lfs*26) and a deletion encompassing part of *NPC1* and the adjacent *ANKRD29* and *LAMA3*. These findings represent the first characterisation of two chromosomal microdeletions at 18q11-q12 that cause NPC disease and provide insight into missing *NPC1* mutant alleles.

Keywords:

Niemann-Pick type C; *NPC1* gene; Gene deletions; QMPSF; SNP analysis.

Abbreviations:

NPC, Niemann-Pick type C; NPC1, *NPC1* gene; NPC2, *NPC2* gene; QMPSF, quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments; NMD, nonsense-mediated mRNA decay; MAF, minor allele frequency; CNVs, copy number variants; JEB, junctional epidermolysis bullosa; LOCS, laryngo-onycho-cutaneous syndrome; DGV, Database of Genomic Variants.

1. Introduction

Niemann-Pick type C (NPC) disease (OMIM ID: 257220, 607625) is a rare autosomal recessive disorder characterised by the defective lysosomal storage of multiple lipids, such as cholesterol and glycosphingolipids [1]. The clinical phenotype of NPC is extremely heterogeneous, with an age of onset ranging from the perinatal period until well into adulthood [2]. Affected individuals present hepatosplenomegaly and progressive neurodegeneration.

NPC is caused by mutations in two genes, *NPC1* (MIM ID: 607623) or *NPC2* (MIM ID: 601015) [3, 4]. Approximately 95% of patients have mutations in the former, which encodes a transmembrane protein residing in late endosomes/lysosomes [5], whereas the remaining 5% of the cases result from defects in the latter, a small soluble lysosomal protein [6].

To date over 300 disease-causing mutations have been reported [2], most being missense mutations [7] while the remaining ones are splicing mutations, indels and nonsense mutations.

Here we characterised two heterozygous deletions at 18q11-q12 involving *NPC1*. In a previous survey we briefly described one of these deletions [8]. Here we characterised both deletions using two methods: the segregation analysis of several SNPs within the patients' families, in which Mendelian errors were consistent with the presence of a deletion, and the quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments (QMPSF) [9].

The deletions described in this study were in compound heterozygosity. In patient NPC57 we found a previously described missense mutation (p.T1066N) in the other allele, whereas in patient NPC-G1 we detected a novel single-nucleotide deletion (c.852delT), this causing a frame shift and a premature stop codon (p.F284Lfs*26). To our knowledge, this is the first report of structural variants involved in NPC disease.

2. Materials & Methods

2.1. Patients

General information and clinical details of the patients NPC57 and NPC-G1 are shown in Supplementary Table 1.

2.2. Genomic DNA amplification and sequencing

Primers were designed to amplify each *NPC1* exon and corresponding intronic flanking regions (primers available upon request). The PCR products were sequenced in forward and reverse directions using ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.3. Reverse transcription of *NPC1* mRNA and cDNA sequencing

Total cellular RNA was isolated and cDNA was synthesised as previously described [10]. The *NPC1* cDNA was then amplified using primers 5'TGTCCAGATGTCCATCCTGTT3' and 5'ATTGCTATCGATGGGAGTGT3' to confirm the c.852delT mutation. The resulting amplification product was sequenced as described above. To assay nonsense-mediated mRNA decay (NMD), fibroblasts from the patient and from a control individual were cultured in the presence of 500 µg/ml of cycloheximide for 6 hours.

In order to identify the breakpoints in patient NPC-G1, several attempts were made to amplify the region just outside the deletion using a combination of three forward and three reverse primers (primers available upon request). The maximum size expected for the nine PCR products ranged from 766 bp to 1331 bp. The PCR amplifications were performed using a range of polymerases and conditions.

2.4. Polymorphism analysis

To define the boundaries of the two deletions, several polymorphisms located in *NPC1* and flanking genes (*CABLES1*, *C18orf45*, *RIOK3*, *C18orf8*, *ANKRD29*, *LAMA3*, *TTC39C*, *OSBPL1A*, *IMPACT*, *ZNF521*) were analysed by PCR amplification and sequencing. Polymorphisms were selected from the CEU panel of the HapMap database (www.hapmap.org, release 28), choosing only those with a minor allele frequency (MAF) >0.2 in order to increase the chance of heterozygosity in our sample. The list of polymorphisms is shown in Supplementary Table 2. Samples from parents were also analysed for most of the polymorphisms.

2.5. QMPSF assay

QMPSF assay was used to detect the deletions and to narrow down their extension. Short genomic fragments (between 100 and 250 bp) located in *NPCI* and flanking genes were simultaneously PCR-amplified in a single tube using dye-labelled primers. An additional fragment corresponding to exon 7 of the *RNF20* gene, located on chromosome 9q, was co-amplified as a reference [11]. Three distinct multiplex PCR reactions were designed to delimit the breakpoints of the deletions in the two patients (Set 1, 2 and 3). Primers, location and length of the fragments are shown in Supplementary Table 3. One μL of the PCR product was resuspended in a mix containing 10.9 μL of deionised formamide and 0.1 μL of GeneScan 600 LIZ size standard (Applied Biosystems). PCR products were run on an ABI PRISM sequencer and data were analysed using Peak Scanner v.1.0 software (Applied Biosystems). The analysis was based on the comparison of peak heights between each patient and an average of healthy controls. The copy number of each tested fragment was expressed as the following ratio: (height of the peak corresponding to the tested fragment for the patient / height of the peak corresponding to *RNF20* for the patient) / (height of the peak corresponding to the tested fragment for the average of controls / height of the peak corresponding to *RNF20* for the average of controls). Ratios < 0.65 were indicative of deletion. Positive results were confirmed in a second independent QMPSF assay.

3. Results

Sequencing the 25 *NPCI* exons and intronic flanking regions allowed the identification of a novel mutation, c.852delT, in patient NPC-G1. This defect was inherited from the mother. cDNA analysis revealed that the c.852delT allele was partially subjected to NMD (data not shown). The affected patient was apparently homozygous for this mutation and no additional mutation was found, either at the gDNA or cDNA level. Surprisingly, the father did not carry the c.852delT mutation (Fig. 1). Moreover, Mendelian inconsistencies were observed at this first stage for two *NPCI* polymorphisms, rs12970899 and rs1805081 (Supplementary Table 2). This evidence suggested the potential presence of a paternal deletion encompassing the *NPCI* gene.

In a previous study we briefly described another patient (NPC57) consistent with the presence of a heterozygous deletion including the whole *NPC1* gene [8].

QMPSF and SNP inheritance analyses were used to confirm the deletions in patients NPC57 and NPC-G1 and to further characterise the extension.

Regarding the QMPSF assay, three sets of probes were designed (Fig. 2A). Initially, set 1 (probes A, C, E, I, J) was used for both patients. Based on the results of set 1, two additional sets of probes, set 2 (probes B, C, D, E) and set 3 (probes E, F, G, H, I), were designed for patients NPC57 and NPC-G1 respectively. In sets 2 and 3 we also included probes from set 1 as a control for the presence (set 2: C; set 3: E) or absence (set 2: E; set 3: I) of the deletion. Both patients, their parents, and a sample of 80 healthy controls were analysed with the three sets of probes. The results of the QMPSF analysis are shown in Fig. 2A and in Supplementary Table 3.

In addition, the segregation analysis of 149 polymorphisms was used to map the deletions across *NPC1* and flanking genes. The results for both patients and their respective parents are summarised in Supplementary Table 2.

The combination of these two assays confirmed the presence of the deletions in the two patients and their carrier parents and allowed us to narrow down their boundaries (Fig. 2A and Supplementary Table 2). The NPC57 deletion encompassed a minimum of 89.7 kb (chr18: 19.351.458-19.441.165) and included the whole *NPC1* gene and at least part of *C18orf8* and *ANDRD29*. Unfortunately, both parents of patient NPC57 shared the same haplotypic block in the distal and the proximal breakpoint regions (Supplementary Table 2), thus precluding further delimitation of the deletion boundaries using allelic information. Thus, the deletion in this patient spanned from a minimum of approximately 90 kb to a maximum of 376 kb.

In the case of patient NPC-G1, the combination of the two approaches allowed us to refine the proximal and distal boundaries. In this patient, the deletion spanned approximately 432 kb (chr18: 19.383.872-19.815.788). The proximal breakpoint was found to be between the markers rs1652344 and rs34491171 (intron 10 of *NPC1*). The heterozygosity for the first marker and the apparent Mendelian error in the second were consistent with the deletion status. The distal breakpoint occurred between the

markers rs1258143 and rs17187360, located in the intergenic region between *LAMA3* and *TTC39C*, which are at 5' of *NPCI*. The loss of heterozygosity for rs1652344 and rs17187360 in several PCR amplifications across the proximal and distal region (Fig. 2B) allowed us to narrow down the candidate region to 272 bp (proximal breakpoint) and 453 bp (distal breakpoint).

On the basis of these results, we performed two prenatal diagnoses in the NPC-G1 family (not shown). The first foetus carried both *NPCI* mutations (pregnancy was interrupted), whereas the second inherited the wild type allele from the parents.

4. Discussion

In this study we report two deletions encompassing *NPCI*, thereby showing that rare structural variants are also involved in NPC disease. Repetitive sequence elements and short repeats are known to be involved in genomic rearrangements [12]. In this regard, non-homologous recombinations mediated by *Alu* elements have been described in other lysosomal disorders [13-16].

In patient NPC57, several repeated elements mapped in the uncertain regions flanking the deletion. This observation indicates that a number of combinations of these elements may be at the origin of the rearrangement observed. Regarding the patient NPC-G1, the candidate regions for the proximal and distal breakpoints were finely mapped, resulting in small regions of 272 bp and 453 bp, where two repetitive elements, an *AluSx3* (intron 10 of *NPCI*) and an *L2a* element (intergenic region between *LAMA3* and *TTC39C*) may be involved in the recombination event (Fig. 2B). However, although the small region between the two repetitive elements was expected to be no longer than 725 bp, no PCR product was amplified after several attempts. One possible explanation for this is that a complex chromosomal rearrangement associated with the deletion prevents this amplification. Complex chromosomal rearrangements have been described in other diseases [17, 18]. The finding that the patient's cytogenetic study showed a normal karyotype led us to rule out the presence of a large chromosomal recombination. The possibility of a duplication event, flanking the proximal and distal breakpoint, was also discarded as the QMPSF probes resulted in a normal dosage status. Thus, a plausible explanation is the occurrence of the deletion concomitantly with another type of

rearrangement, such as an inversion that cannot be detected with the resolution power of conventional cytogenetic analysis.

The Database of Genomic Variants was used to search for copy number variants (CNVs) at the *NPCI* locus (DGV, <http://projects.tcag.ca/variation/>). The only variation including *NPCI* was a deletion present in an isolated healthy population from Micronesia (variation_47911, [19] in Fig. 2A). This deletion is different from those presented in this study, thus pointing to an independent recombination event in our patients.

Noteworthy, the deletion of patient NPC-G1, and probably that of patient NPC57, also encompassed *LAMA3*, a gene implicated in two autosomal recessive disorders, namely junctional epidermolysis bullosa (JEB) (OMIM ID: 226650) and laryngo-onycho-cutaneous syndrome (LOCS) (OMIM ID: 245660). Thus, the rearrangements described in these two families, if present in the general population, might be involved not only in NPC but also in JEB and LOCS. The remaining genes included in these deletions are not reported to be responsible for any other human disease.

The two patients included in this study had severe phenotypes (see Supplementary Table 1). Although the structural variants described here are severe, the second allele should also be considered. In patient NPC-G1, the other allele bore a 1-bp deletion and did not produce functional protein. In the other patient, the second allele bore a missense mutation, p.T1066N. This mutation was found only once before, in another Spanish patient, in compound heterozygosity with p.P1007A [20] but no genotype-phenotype correlation was established for the p.T1066N mutation. The case presented here suggests that p.T1066N is a severe mutation.

To summarize, we report the first cases of the participation of deletions involving *NPCI* and flanking genes in NPC disease. Our results highlight the need to search for structural variants in NPC patients lacking characterised *NPCI* or *NPC2* mutations by conventional genomic and cDNA screening methods.

Acknowledgements

We thank the families of the patients for their collaboration, and Drs. J. Dalmau and J. M. Millán for providing samples and sharing clinical information. We are also grateful to the “Fundación Niemann-Pick de España” for permanent support and funding. This study was also funded by the Spanish “Ministerio de Educación y Ciencia” (MEC, SAF2006-12276) and “Ministerio de Ciencia e Innovación” (MICINN, SAF2009-11289, SAF2010-17589 and SAF 2011-25431) and the “Generalitat de Catalunya” (SGR2005-00848, 2009SGR-971 and 2009SGR-1072). L.R-P. was the recipient of an FI fellowship from the “Generalitat de Catalunya”, C.T. was the recipient of a Marie Curie EIF fellowship (PIEF-GA-2009-254930) and J.M-V. was the recipient of Juan Girón fellowship from the “Fundación Niemann-Pick España”. The CIBER of “Enfermedades Raras” (CIBERER) is an initiative of the ISCIII.

References

- [1] M.C. Patterson, M.T. Vanier, K. Suzuki, J.A. Morris, E. Carstea, E.B. Neufeld, J.E. Blanchette-Mackie, P. Pentchev, Niemann-Pick Disease type C: a lipid trafficking disorder, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw Hill, New York, 2001, pp 3611-3663.
- [2] M.T. Vanier, Niemann-Pick disease type C, *Orphanet J. Rare Dis.* 5 (2010) 16.
- [3] E.D. Carstea, J.A. Morris, K.G. Coleman, S.K. Loftus, D. Zhang, C. Cummings, J. Gu, M.A. Rosenfeld, W.J. Pavan, D.B. Krizman, J. Nagle, M.H. Polymeropoulos, S.L. Sturley, Y.A. Ioannou, M.E. Higgins, M. Comly, A. Cooney, A. Brown, C.R. Kaneski, E.J. Blanchette-Mackie, N.K. Dwyer, E.B. Neufeld, T.Y. Chang, L. Liscum, J.F. Strauss, 3rd, K. Ohno, M. Zeigler, R. Carmi, J. Sokol, D. Markie, R.R. O'Neill, O.P. van Diggelen, M. Elleder, M.C. Patterson, R.O. Brady, M.T. Vanier, P.G. Pentchev, D.A. Tagle, Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis, *Science* 277 (1997) 228-231.
- [4] S. Naureckiene, D.E. Sleat, H. Lackland, A. Fensom, M.T. Vanier, R. Wattiaux, M. Jadot, P. Lobel, Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease, *Science* 290 (2000) 2298-2301.

- [5] M.E. Higgins, J.P. Davies, F.W. Chen, Y.A. Ioannou, Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network, *Mol. Genet. Metab.* 68 (1999) 1-13.
- [6] M.T. Vanier, G. Millat, Structure and function of the NPC2 protein, *Biochim. Biophys. Acta* 1685 (2004) 14-21.
- [7] H. Runz, D. Dolle, A.M. Schlitter, J. Zschocke, NPC-db, a Niemann-Pick type C disease gene variation database, *Hum. Mutat.* 29 (2008) 345-350.
- [8] J. Macias-Vidal, L. Rodriguez-Pascau, G. Sanchez-Olle, M. Lluch, L. Vilageliu, D. Grinberg, M.J. Coll, Molecular analysis of 30 Niemann-Pick type C patients from Spain, *Clin. Genet.* 80 (2011) 39-49.
- [9] F. Charbonnier, G. Raux, Q. Wang, N. Drouot, F. Cordier, J.M. Limacher, J.C. Saurin, A. Puisieux, S. Olschwang, T. Frebourg, Detection of exon deletions and duplications of the mismatch repair genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families using multiplex polymerase chain reaction of short fluorescent fragments, *Cancer Res.* 60 (2000) 2760-2763.
- [10] L. Rodriguez-Pascau, M.J. Coll, L. Vilageliu, D. Grinberg, Antisense oligonucleotide treatment for a pseudoexon-generating mutation in the NPC1 gene causing Niemann-Pick type C disease, *Hum. Mutat.* 30 (2009) E993-E1001.
- [11] E. Maestrini, A.T. Pagnamenta, J.A. Lamb, E. Bacchelli, N.H. Sykes, I. Sousa, C. Toma, G. Barnby, H. Butler, L. Winchester, T.S. Scerri, F. Minopoli, J. Reichert, G. Cai, J.D. Buxbaum, O. Korvatska, G.D. Schellenberg, G. Dawson, A. de Bildt, R.B. Minderaa, E.J. Mulder, A.P. Morris, A.J. Bailey, A.P. Monaco, High-density SNP association study and copy number variation analysis of the AUTS1 and AUTS5 loci implicate the IMMP2L-DOCK4 gene region in autism susceptibility, *Mol. Psychiatry* 15 (2010) 954-968.
- [12] N. Chuzhanova, S.S. Abeysinghe, M. Krawczak, D.N. Cooper, Translocation and gross deletion breakpoints in human inherited disease and cancer II: Potential involvement of repetitive sequence elements in secondary structure formation between DNA ends, *Hum. Mutat.* 22 (2003) 245-251.
- [13] V. Ricci, S. Regis, M. Di Duca, M. Filocamo, An Alu-mediated rearrangement as cause of exon skipping in Hunter disease, *Hum. Genet.* 112 (2003) 419-425.

- [14] R. Santamaria, M. Blanco, A. Chabas, D. Grinberg, L. Vilageliu, Identification of 14 novel GLB1 mutations, including five deletions, in 19 patients with GM1 gangliosidosis from South America, *Clin. Genet.* 71 (2007) 273-279.
- [15] K.J. Champion, M.J. Basehore, T. Wood, A. Destree, P. Vannuffel, I. Maystadt, Identification and characterization of a novel homozygous deletion in the alpha-N-acetylglucosaminidase gene in a patient with Sanfilippo type B syndrome (mucopolysaccharidosis IIIB), *Mol. Genet. Metab.* 100 (2010) 51-56.
- [16] M. Cozar, B. Bembi, S. Dominissini, S. Zampieri, L. Vilageliu, D. Grinberg, A. Dardis, Molecular characterization of a new deletion of the GBA1 gene due to an inter Alu recombination event, *Mol. Genet. Metab.* 102 (2011) 226-228.
- [17] A.J. Dawson, S. Bal, B. McTavish, M. Tomiuk, I. Schroedter, A.N. Ahsanuddin, M.D. Seftel, R. Vallente, S. Mai, P.D. Cotter, K. Hovanes, M. Gorre, S.R. Gunn, Inversion and deletion of 16q22 defined by array CGH, FISH, and RT-PCR in a patient with AML, *Cancer Genet.* 204 (2011) 344-347.
- [18] L. Ballarati, M.P. Recalcati, M.F. Bedeschi, F. Lalatta, C. Valtorta, M. Bellini, P. Finelli, L. Larizza, D. Giardino, Cytogenetic, FISH and array-CGH characterization of a complex chromosomal rearrangement carried by a mentally and language impaired patient, *Eur. J. Med. Genet.* 52 (2009) 218-223.
- [19] A. Gusev, J.K. Lowe, M. Stoffel, M.J. Daly, D. Altshuler, J.L. Breslow, J.M. Friedman, I. Pe'er, Whole population, genome-wide mapping of hidden relatedness, *Genome. Res.* 19 (2009) 318-326.
- [20] E.M. Fernandez-Valero, A. Ballart, C. Iturriaga, M. Lluch, J. Macias, M.T. Vanier, M. Pineda, M.J. Coll, Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: genotype-phenotype correlations, *Clin. Genet.* 68 (2005) 245-254.

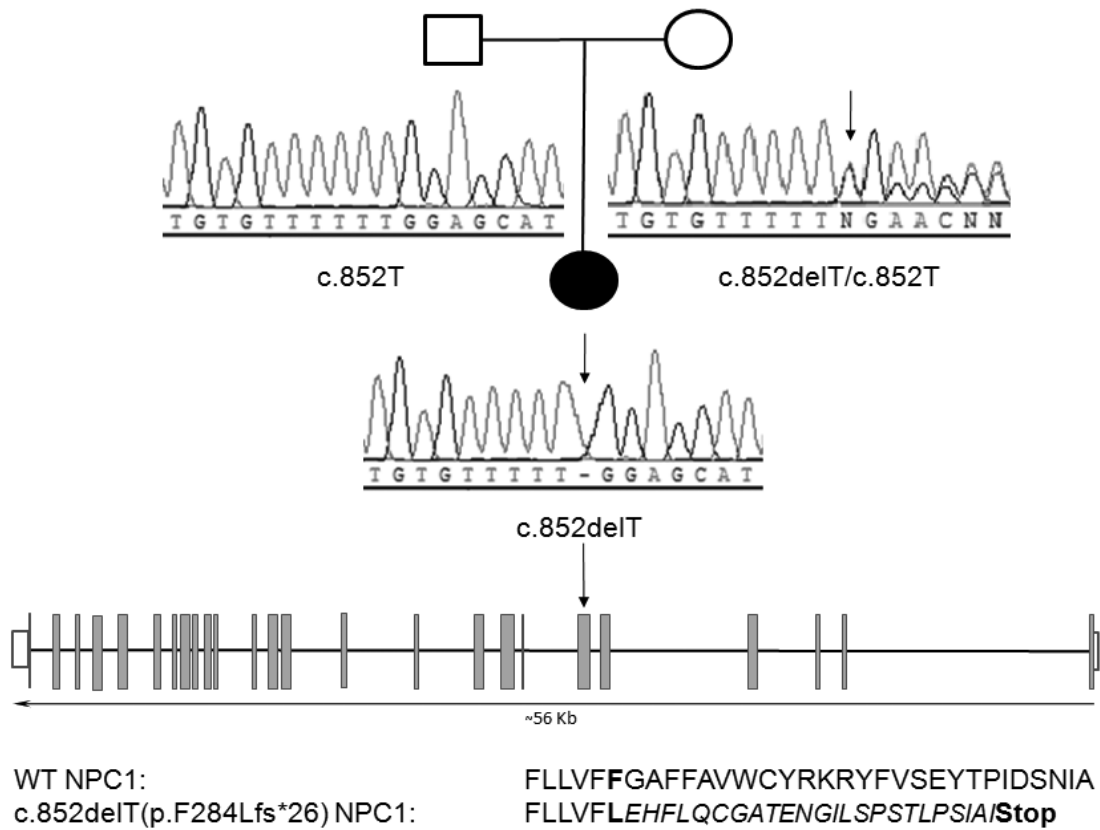


Fig. 1. Pedigree of NPC-G1 family showing the chromatograms for mutation c.852delT. The exon where this mutation was found and the premature stop codon produced as a consequence of the frame shift are shown.

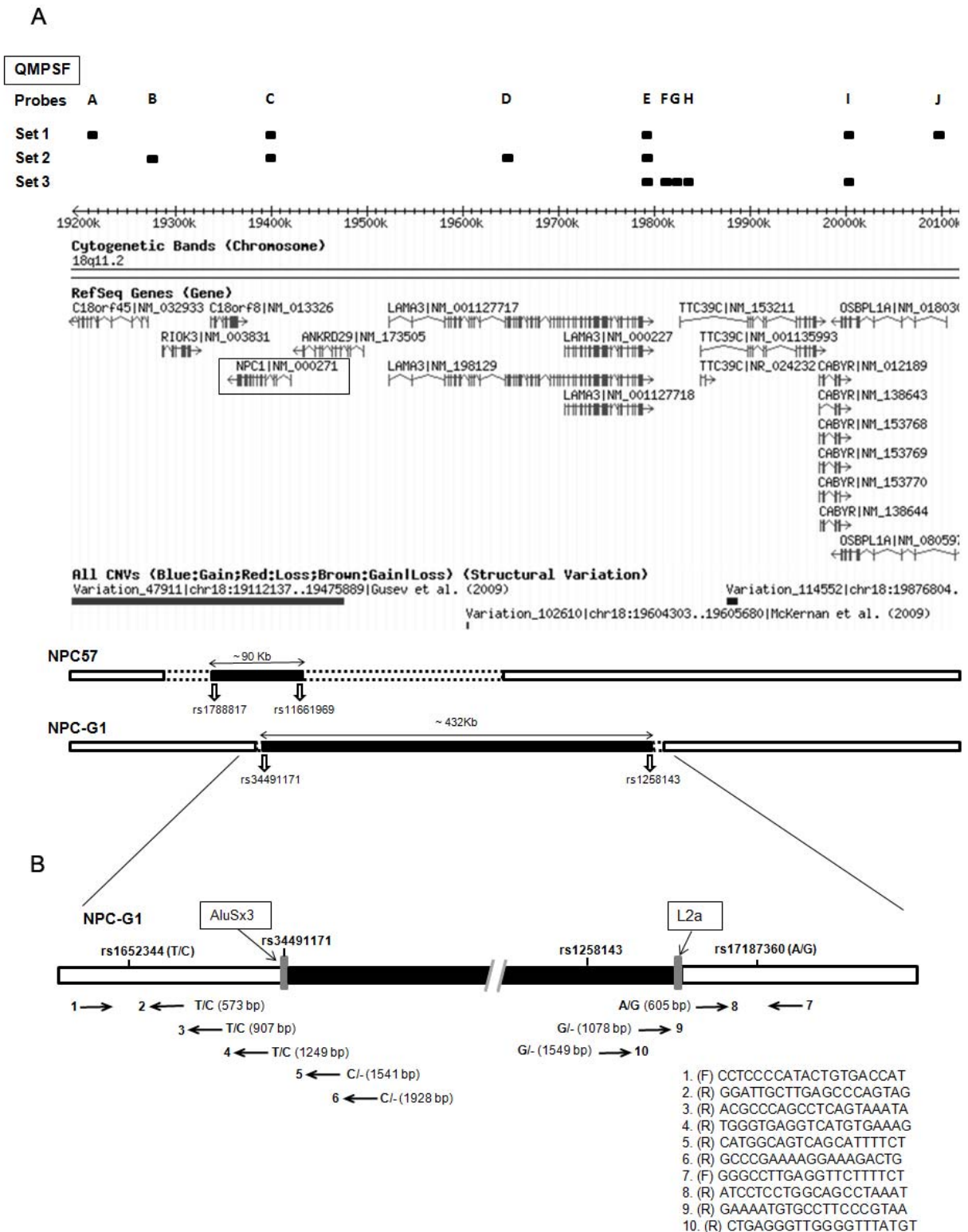


Fig. 2. A: Schematic representation of the deletions identified in the NPC57 and NPC-G1 patients in their genomic context. At the top, the QMPFSF probes designed for sets 1, 2 and 3 are shown as black bars. Genes in the region and CNVs from the Database of Genomic Variants (DGV) are depicted below. At the bottom: black and dashed boxes indicate the minimum and the maximum length of the deletions, respectively. The minimum length is

delimited by the SNP pair rs1788817 and rs11661969 in patient NPC57 and rs34491171 and rs1258143 in patient NPC-G1. **B:** Characterization of the candidate regions for proximal and distal breakpoints in patient NPC-G1. Alternative primers (1 to 10) used for the analysis of the loss of heterozygosity for SNP rs1652344 and rs17187360 are shown. The length of the amplified products and the patients' genotypes are indicated. Repetitive sequence elements possibly involved in the recombination event are shown as grey boxes.

Supplementary Table 1. Clinical features of patients NPC57 and NPC-G1.

Patient	Origin	Clinical phenotype	Biochemical phenotype	Age at diagnosis	Diagnosis method	Age of death	Clinical features
NPC57	Spain	Severe Infantile	Classical	3 years	Filipin test	6 years	Ascitis, neonatal jaundice, hepatosplenomegaly, hypotonia, delay in motor and mental development, vertical ophthalmoplegia, dystonia, dysarthria, cataplexy, dysphagia, respiratory failure and epilepsy
NPC-G1	Greece	Severe Infantile	Classical	7 months	Liver biopsy Filipin test	26 months	Foetal ascites resolved until birth, neonatal jaundice, hepatosplenomegaly, ascites, severe dystrophy and malnutrition, hypotonia, dystonia, developmental delay, able to sit at 18 months, unable to walk and sit up at 2 years, vertical gaze palsy, pulmonary alveolar proteinosis and respiratory failure

Supplementary Table 2. Allele segregation of 149 SNPs and QMPSF analyses for the NPC57 and NPC-G1 patients and their parents.

LOCUS	SNP ID	POSITION [#]	ALLELES	FAMILY NPC57				FAMILY NPC-G1			
				NPC57		FATHER NPC57		MOTHER NPC57		NPC-G1	
<i>CABLES1</i>	rs11082304	18,974,971	G/T	(G G)	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	rs56275796	19,025,268	T/C	(T T)	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	rs6507528	19,025,578	A/G	(G G)	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	rs2337030	19,025,642	A/T	(A A)	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	rs1968470	19,082,970	A/G	(A G)	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	rs12606304	19,083,173	T/C	(T T)	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	rs748717	19,083,582	C/A	(C A)	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	rs2164029	19,085,007	A/G	(A G)	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
<i>C18orf45</i>	rs12326518	19,139,126	C/T	(C T)	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	rs7238397	19,139,181	C/G	(C G)	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	rs6507580	19,139,219	C/T	(C T)	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
PROBE A QMPSF chr18:19,143,529				WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	
	rs11082402	19,144,716	G/T	T G	T T	G T	- -	- -	- -	- -	
	rs4800465	19,144,952	C/G	C G	C G	G G	- -	- -	- -	- -	
	rs4800466	19,145,025	C/T	C T	C T	T T	- -	- -	- -	- -	
	rs17259223	19,239,630	A/C	A A	A A	A A	- -	- -	- -	- -	
	rs4800158	19,239,786	A/G	G G	G G	G G	- -	- -	- -	- -	
PROBE B QMPSF chr18:19,255,342				WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	
<i>RIOK3</i>	rs1995330	19,291,468	T/C	C C	C C	C C	- -	- -	- -	- -	
	rs1995329	19,291,516	G/C	G G	G C	G C	- -	- -	- -	- -	
	rs12455007	19,291,806	C/T	T T	T C	T* C*	- -	- -	- -	- -	
	rs9957219	19,299,555	A/G	G ?	G G	? G	- -	- -	- -	- -	
	rs9967555	19,310,243	A/T	T ?	T T	? T	- -	- -	- -	- -	
	rs11663375	19,312,080	C/T	T ?	T T	? T	- -	- -	- -	- -	
<i>C18orf8</i>	rs1788817	19,351,458	A/G	G DEL	G G	DEL A	- -	- -	- -	- -	
	rs891387	19,357,907	T/C	C DEL	C C	DEL T	- -	- -	- -	- -	
	rs891386	19,357,969	T/G	G DEL	G G	DEL T	- -	- -	- -	- -	
<i>NPCI</i>	rs2510344	19,367,283	T/C	- -	- -	- -	T C	T T	C T		
	rs1621962	19,367,339	G/A	- -	- -	- -	G G	G G	G G		
	rs34624018	19,367,354	G/A	- -	- -	- -	G G	G G	G G		
	rs35248744	19,367,473	T/C	- -	- -	- -	T T	T T	T T		
	rs56003892	19,373,245	G/A	- -	- -	- -	G G	G G	G G		
	rs6507720	19,373,289	A/G	- -	- -	- -	A G	A A	G A		
	rs34084984	19,373,346	T/C	- -	- -	- -	T T	T T	T T		
	rs1140458	19,373,775	G/A	- -	- -	- -	G A	G G	A G		

rs28940897	19,373,785	T/G	-	-	-	-	-	-	T	T	T	T	T	T
rs34302553	19,373,837	C/T	-	-	-	-	-	-	C	C	C	C	C	C
rs9949660	19,373,907	C/T	-	-	-	-	-	-	C	C	C	C	C	C
rs1805082	19,374,442	T/C	-	-	-	-	-	-	T	C	T	T	C	T
rs1788799	19,378,943	C/G	-	-	-	-	-	-	C	G	C	G	G	G
rs2435307	19,381,908	C/T	-	-	-	-	-	-	C	T	C	C	T	C
rs1652344	19,382,855	T/C	-	-	-	-	-	-	T*	C*	T	T	C	T
rs34491171	19,383,872	T/A	-	-	-	-	-	-	DEL	T	DEL	A	T	A
rs2435305	19,384,211	G/A	-	-	-	-	-	-	DEL	G	DEL	G	G	G
rs4800491	19,384,475	A/G	-	-	-	-	-	-	DEL	G	DEL	A	G	A
rs1788763	19,384,632	C/T	-	-	-	-	-	-	DEL	T	DEL	T	T	T
rs10445476	19,384,761	T/C	-	-	-	-	-	-	DEL	T	DEL	T	T	T
rs7242568	19,384,838	C/T	-	-	-	-	-	-	DEL	C	DEL	C	C	C
rs72884600	19,385,190	C/T	-	-	-	-	-	-	DEL	C	DEL	C	C	C
rs7236499	19,385,339	G/A	-	-	-	-	-	-	DEL	G	DEL	G	G	G
rs9963518	19,385,531	A/G	-	-	-	-	-	-	DEL	A	DEL	A	A	A
rs1652343	19,385,927	T/C	-	-	-	-	-	-	DEL	C	DEL	T	C	T
rs35920065	19,386,145	G/A	-	-	-	-	-	-	DEL	G	DEL	A	G	A
rs28721396	19,386,159	G/A	-	-	-	-	-	-	DEL	G	DEL	A	G	A
rs1788762	19,386,569	G/C	-	-	-	-	-	-	DEL	C	DEL	C	C	C
rs11663558	19,387,935	G/A	-	-	-	-	-	-	DEL	A	DEL	G	A	G
rs1631685	19,388,237	C/T	-	-	-	-	-	-	DEL	T	DEL	C	T	C
rs1805081	19,394,430	T/C	-	-	-	-	-	-	DEL	C	DEL	T	C	T
PROBE C QMPF chr18:19,395,345			DEL		WT		DEL		DEL		DEL		WT	
rs56266324	19,402,685	A/G	-	-	-	-	-	-	DEL	A	DEL	A	A	A
rs17855819	19,402,797	T/C	-	-	-	-	-	-	DEL	T	DEL	T	T	T
rs12970899	19,402,861	A/G	-	-	-	-	-	-	DEL	A	DEL	G	A	G
rs7226548	19,407,940	G/T	G	DEL	G	G	DEL	G	-	-	-	-	-	-
rs1788826	19,408,022	G/A	A	DEL	A	A	DEL	A	-	-	-	-	-	-
rs1788783	19,415,132	C/T	T	DEL	T	T	DEL	C	-	-	-	-	-	-
rs1367084	19,418,992	G/C	C	DEL	C	C	DEL	G	-	-	-	-	-	-
rs1788781	19,419,078	C/A	A	DEL	A	A	DEL	C	-	-	-	-	-	-
rs1623003	19,419,161	C/T	T	DEL	T	T	DEL	T	-	-	-	-	-	-
rs2981422	19,421,192	G/A	G	DEL	G	A	DEL	G	DEL	A	DEL	G	A	G
rs1652354	19,421,331	A/C/G	A	DEL	A	C	DEL	A	DEL	C	DEL	A	C	A
rs1788774	19,421,491	G/A	A	DEL	A	G	DEL	A	DEL	G	DEL	A	G	A
rs1620047	19,422,287	T/C	T	DEL	T	C	DEL	T	DEL	C	DEL	T	C	T
<i>ANKRD29</i>	rs1788804	19,440,896	G/T	T	DEL	T	G	DEL	T	-	-	-	-	-
	rs11661969	19,441,165	G/A	A	DEL	A	G	DEL	G	-	-	-	-	-
	rs1629847	19,441,772	C/T	T	?	T	C	?	T	DEL	C	-	-	-

	rs34612679	19,446,012	A/T	A ?	A A	? A	- -	- -	- -	- -
	rs1652366	19,446,259	G/T	G ?	G T	? G	- -	- -	- -	- -
	rs12454237	19,446,307	T/A	T ?	T T	? T	- -	- -	- -	- -
	rs1711463	19,459,564	G/A	A ?	A G	? A	DEL A	- -	- -	- -
	rs1788758	19,459,945	T/C	C ?	C T	? C	DEL C	- -	- -	- -
	rs1629335	19,475,137	C/G	G ?	G C	? G	DEL G	- -	- -	- -
	rs55965189	19,475,253	C/T	C ?	C C	? C	DEL C	- -	- -	- -
<i>LAMA3</i>	rs2960586	19,524,169	C/A	C ?	C A	? C	DEL C	- -	- -	- -
	rs1711451	19,524,432	A/C	A ?	A C	? A	DEL A	- -	- -	- -
	rs11662720	19,556,089	A/G	G ?	G A	? G	- -	- -	- -	- -
	rs11659490	19,556,305	C/T	T ?	T C	? T	- -	- -	- -	- -
	rs1941518	19,662,746	A/G	A ?	A A	? A	- -	- -	- -	- -
	rs8099617	19,662,777	C/T	C ?	C T	? C	- -	- -	- -	- -
	rs8099763	19,663,062	A/G	G ?	G A	? G	- -	- -	- -	- -
PROBE D QMPSF chr18:19,668,054				WT *	WT	WT *	DEL	DEL	WT	
	rs4334381	19,686,447	A/C	C C	C A	C C	- -	- -	- -	- -
	rs4488534	19,686,448	C/G	C C	C G	C C	- -	- -	- -	- -
	rs12955083	19,686,964	A/T	A A	A T	A A	DEL T	DEL T	T T	T T
	rs17797660	19,687,036	G/T	T T	T G	T T	DEL G	DEL G	G G	G G
	rs12955347	19,687,194	A/T	A A	A T	A A	DEL T	DEL T	T T	T T
	rs56371680	19,687,240	A/T	- -	- -	- -	DEL T	DEL A	T A	T A
	rs12605892	19,687,322	G/A	- -	- -	- -	DEL G	DEL G	G A	G A
	rs57041936	19,687,467	T/C	- -	- -	- -	DEL C	DEL T	C T	C T
	rs11873358	19,785,904	C/T	T T	T C	T T	DEL C	DEL C	C C	C C
	rs72875945	19,786,431	C/T	C C	C C	C C	DEL C	DEL C	C T	C T
	rs4800171	19,786,457	C/T	T T	T C	T T	DEL T	DEL C	T T	T T
PROBE E QMPSF chr18:19,815,256				WT	WT	WT	DEL	DEL	WT	
<i>LAMA3-</i>										
<i>TTC39C</i>	rs1258143	19,815,788	G/A	- -	- -	- -	DEL G	DEL A	G G	G G
	rs17187360	19,817,426	A/G	- -	- -	- -	A* G*	A A	G A	G A
	rs12605741	19,817,824	C/G	- -	- -	- -	C G	C C	G C	G C
	rs28510619	19,818,110	C/G	- -	- -	- -	C C	C C	C C	C C
	rs1154246	19,818,204	G/C	- -	- -	- -	G G	G C	G G	G G
	rs1154247	19,818,414	A/C	- -	- -	- -	(C A)	(C A)	(C A)	(C A)
PROBE F QMPSF chr18:19,819,231				WT	WT	WT	WT	WT	WT	
PROBE G QMPSF chr18:19,828,521				WT	WT	WT	WT	WT	WT	
PROBE H QMPSF chr18:19,835,297				WT	WT	WT	WT	WT	WT	
<i>TTC39C</i>	rs1154248	19,844,104	G/T	G G	G G	G G	(G G)	- -	- -	- -
	rs73967651	19,844,131	G/A	G G	G G	G G	(G G)	- -	- -	- -
	rs1785958	19,844,193	G/C	G G	G G	G G	(G G)	- -	- -	- -

	rs1843839	19,844,234	G/A	A	A	A	A	A	A	(G A)	-	-	-	-
	rs1843840	19,844,324	G/A	G	G	G	G	G	G	(G A)	-	-	-	-
	rs1843841	19,844,344	C/T	T	T	T	T	T	T	(T T)	-	-	-	-
	rs1843842	19,844,368	C/T	T	T	T	T	T	T	-	-	-	-	-
	rs4800547	19,962,131	T/C	C	C	C	C	C	C	-	-	-	-	-
	rs11082962	19,968,789	A/C	A	A	A	A	A	A	(A A)	-	-	-	-
	rs34452859	19,968,932	C/T	T	T	T	T	T	T	(C T)	-	-	-	-
	rs12607257	19,969,082	A/C	C	C	C	C	C	C	(A C)	-	-	-	-
	rs1133162	19,969,160	C/T	T	T	T	T	T	T	(C T)	-	-	-	-
<i>OSBPL1A</i>	rs7242469	20,027,095	C/T	T	T	T	T	T	T	(T T)	-	-	-	-
	rs12456219	20,027,215	A/G	A	A	A	A	A	A	(A A)	-	-	-	-
	rs1822649	20,027,216	G/T	T	T	T	T	T	T	(T T)	-	-	-	-
	rs12458495	20,027,247	G/A	G	G	G	G	G	G	(G G)	-	-	-	-
PROBE I QMP5F chr18:20,073,091				WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	rs2588566	20,150,648	C/T/-	C	C	C	C	C	T	(C T)	-	-	-	-
	rs2848605	20,166,863	A/G	A	A	A	A	A	G	-	-	-	-	-
	rs34842395	20,166,975	T/C	T	T	T	T	T	T	-	-	-	-	-
	rs34907319	20,167,034	A/T	A	A	A	A	A	A	-	-	-	-	-
	rs55937820	20,167,167	C/T	C	C	C	C	C	C	-	-	-	-	-
PROBE J QMP5F chr18:20,211,469				WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	rs1612939	20,220,241	G/C	G	C	G	G	C	C	(C C)	-	-	-	-
	rs8086269	20,220,330	C/T	C	C	C	C	C	T	(C C)	-	-	-	-
	rs8086289	20,220,366	C/T	C	C	C	C	C	T	(C C)	-	-	-	-
	rs8085403	20,220,413	G/A	G	G	G	G	G	G	(G G)	-	-	-	-
	rs60178669	20,220,465	T/C	T	T	T	T	T	T	(T T)	-	-	-	-
<i>IMPACT</i>	rs7240651	20,271,021	A/G	(A A)	-	-	-	-	-	(G A)	-	-	-	-
	rs1941812	20,271,543	C/G	(G G)	-	-	-	-	-	(G G)	-	-	-	-
	rs1941813	20,271,560	A/G	(A A)	-	-	-	-	-	(A A)	-	-	-	-
	rs1941815	20,271,573	G/A	(G G)	-	-	-	-	-	(G G)	-	-	-	-
	rs45492905	20,271,734	C/T	(C C)	-	-	-	-	-	(C C)	-	-	-	-
	rs1941814	20,271,750	A/C	(A A)	-	-	-	-	-	(A A)	-	-	-	-
	rs4800185	20,282,411	A/G	(A G)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	rs1053474	20,287,259	A/G	(A G)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ZNF521</i>	rs8096570	20,921,753	C/G	(C C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	rs60833277	20,921,742	T/C	(T T)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	rs10401094	20,921,765	G/A	(G G)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	rs35171964	20,941,040	A/G	(A G)	-	-	-	-	-	(A G)	-	-	-	-
	rs12961566	20,941,095	A/T	(A T)	-	-	-	-	-	(A T)	-	-	-	-
	rs12965512	20,941,126	C/T	(C T)	-	-	-	-	-	(C T)	-	-	-	-
	rs12965520	20,941,148	C/T	(C T)	-	-	-	-	-	(C T)	-	-	-	-

rs9952584	20,941,315	C/T	(C T)	- -	- -	(C T)	- -	- -
rs9304475	21,039,352	C/T	(T T)	- -	- -	- -	- -	- -
rs4371236	21,175,528	C/T	(C T)	- -	- -	- -	- -	- -
rs4402647	21,175,600	G/T	(G T)	- -	- -	- -	- -	- -
rs4594329	21,175,713	C/T	(C T)	- -	- -	- -	- -	- -

The USCS build 36 was used for SNP position.

* Closest position unambiguously determined as not deleted.

Supplementary Table 3. QMPSF probes, features and results.

PROBES		PRIMERS (5'→ 3')	LOCUS ¹	AMPLICON SIZE	QMPSF RESULT	
					NPC57	NPC-G1
A	F R	GAGATACACAGCCAACGCAC AGCCCTGCTGGTATGATGAC	<i>C18orf45</i>	222	WT	WT
B	F R	TGATCTCTACCCAGCCCAGT GCTGGATGGTGTGGAGACT	<i>C18orf45</i>	127	WT	WT
C	F R	AAAGGTGCCTGTCCATTGTC TGGAGTTCGTGTTCCCTTC	<i>NPC1</i>	245	DEL	DEL
D	F R	GGCAGCTCTTGAAAACAAGC GCCATGTGAATCTGAACCAA	<i>LAMA3</i>	155	WT	DEL
E	F R	CTGTGGCAGATATGGTGGTG GTGGCTTCAAACAGCCTTTC	<i>LAMA3-TTC39C</i>	173	WT	DEL
F	F R	AACATTTGGCTTCCCACAAC GCCTCGATATTCTTATCTACTTTGA	<i>LAMA3-TTC39C</i>	229	WT	WT
G	F R	CCAGGGCTTACACAAACACA CAACAGCCGTCCAAGATACA	<i>LAMA3-TTC39C</i>	148	WT	WT
H	F R	CTAAGCCAAGGTCCGTGAAA GGCTGGGGAAAAGGTAAGAA	<i>LAMA3-TTC39C</i>	243	WT	WT
I	F R	GCTCTAAGGTGGTGGACTCA TGTCAGAAGCACTGGAGACG	<i>OSBPL1A</i>	208	WT	WT
J	F R	AAGCTGTTGCTCCGCTTCT TGAGGATTCTTTCCCCTTCT	<i>OSBPL1A</i>	122	WT	WT
CONTROL	F R	GAGACAGCCGAATCACGAGT CCCAAGGTGAGTCTTCCTGA	<i>RNF20</i>	193	WT	WT

¹ The probes are amplified from sequences within (or between) the indicated genes.