Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca

UNIÓ EUROPEA
Fons Social Europeu

Memòria justificativa de recerca de les beques predoctorals per a la formació de personal investigador (FI)

La memòria justificativa consta de les dues parts que venen a continuació:
1.- Dades bàsiques i resums
2.- Memòria del treball (informe científic)

Tots els camps són obligatoris

1.- Dades bàsiques i resums

Títol del projecte ha de sintetitzar la temàtica científica del vostre document.
Anàlisi genètica i molecular de les malalties Niemann-Pick tipus A/B i tipus C. Estratègies terapèutiques.

Dades de l'investigador (benficiari de l'ajut)

Nom: Laura
Cognoms: Rodríguez Pascau
Correu electrònic: lrodriguezpascau@gmail.com

Dades del director del projecte

Nom: **Daniel/ LLuïsa**
Cognoms: Grinberg Vaisman/ Vilageliu Arqués
Correu electrònic: **dgrinberg@ub.edu/ lvilageliu@ub.edu**

Dades de la universitat / centre al que s'està vinculat

Departament de Genètica
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona
Avd. Diagonal, 645, ed. annex, 3a planta
08028 Barcelona

Número d'expedient

Paraules clau: cal que esmenteu cinc conceptes que defineixin el contingut de la vostra memòria.
Malalties lisosòmiques; Niemann-Pick tipus A/B i tipus C; Caracterització mutacions; Oligonucleòtids antisentit; RNA interferència

Data de presentació de la justificació

03-02-2010

Resum en la llengua del projecte (màxim 300 paraules)

Aquest treball es basa en l'estudi de dues malalties lisosòmiques: la malaltia de Niemann-Pick A/B (NPAB) i la malaltia de Niemann-Pick tipus C (NPC). En relació a la malaltia de NPAB, s'ha realitzat l'expressió in vitro d'algunes de les mutacions de canvi d'aminoàcid trobades en pacients espanyols per tal de detectar les activitats enzimàtiques residuals. Totes les mutacions presenten una activitat molt baixa, gairebé nul•la, excepte la p.L225P i la R608del que tenen un 11% i 20% d'activitat respectivament. Els resultats obtinguts són coherents amb la severitat del fenotip que presenten els pacients. D'altra banda, s'ha caracteritzat un al•lel amb una mutació que afecta a una posició poc conservada d'un donador de splicing i que produeix la generació de trànscrits aberrants corresponents a trànscrits minoritaris de SMPD1, prèviament descrits, que no codifiquen per proteïna funcional. Respecte a malaltia de NPC, s'ha realitzat una anàlisi molecular de pacients espanyols prèviament estudiats identificant, en la majoria dels casos, la segona mutació responsable de la patologia. S'ha descrit per primer cop per aquesta malaltia una gran deleció que inclou el gen NPC1 i altres gens flanquejants i s'ha estudiat l'efecte que tenen les mutacions de splicing trobades a nivell de RNA. Per una d'aquestes mutacions, c.1554-1009G>A, s'ha assajat amb èxit una estratègia terapèutica basada en la utilització d'oligonuclèotids antisentit. D'altra banda, s'està desenvolupant un model cel•lular neuronal de la malaltia de Niemann-Pick tipus C, basat en la utilització de RNAs d'interferència, sobre el qual es podran assajar possibles estratègies terapèutiques en un futur.

Resum en anglès(màxim 300 paraules)

The present work is based on the study of two lysosomal storage disorders: Niemann-Pick types A/B (NPAB) and Niemann-Pick type C (NPC) disease. Regarding NPAB disease, several missense mutations found in Spanish patients were expressed in vitro in order to detect their residual enzymatic activities. All the mutations showed very low residual activity except for p.L225P and p.R608del that retained a residual activity of 11% and 20%, respectively. These results are consistent with the phenotype observed in the patients. Moreover, an allele with a mutation affecting a noncanonical donor splice site has been characterized. It produces only aberrant mRNAs, corresponding to previously reported nonfuntional SMPD1 minor transcripts. Concerning NPC disease, a molecular analysis has been carried out in several Spanish patients identifying the second mutation responsible for the disease in the majority of the cases. A large deletion which includes the NPC1 gene and other chromosome 18 flanking genes has been described for the first time in this disease and for all the splice site mutations, the formation of abnormal spliced transcripts has been confirmed by RNA analysis. An antisense therapeutics approach has been successfully used to correct aberrant splicing due to c.1554-1009G>A mutation. Furthermore, a neuronal cellular model is being developed for Niemann-Pick type C disease using RNA interference that might be used to assess the effectiveness of other possible treatments in the future.

2.- Memòria del treball (informe científic sense limitació de paraules). Pot incloure altres fitxers de qualsevol mena, no més grans de 10 MB cadascun d'ells.

Introducció i objectius

Els lisosomes són orgànuls subcel·lulars membranosos que contenen enzims hidrolítics, actius a pH àcid, encarregats de la degradació de les macromolècules que els hi arriben tant de l'exterior (endocitosi o fagocitosi) com de l'interior de la cèl·lula (autofàgia). Les malalties d'acúmul lisosòmic són un grup de més de 40 trastorns hereditaris (Neufeld, 1991), deguts a un defecte en l'activitat de proteïnes lisosòmiques que té com a resultat l'acúmul intralisosòmic de metabòlits no degradats. Les malalties lisosòmiques són poc freqüents tot i que, en conjunt, presenten una incidència global de 1:5000-1:10000 naixements (revisat a Aerts i col., 2003). Es classifiquen segons l'enzim o proteïna deficient o segons el material acumulat (revisat a Futerman i van Meer, 2004). Dintre de les malalties d'acúmul lisosòmic trobem la malaltia de Niemann-Pick A/B i la malaltia de Niemann-Pick tipus C que són objecte d'aquest estudi.

La malaltia de Niemann-Pick A/B és una patologia lisosòmica que presenta una herència autosòmica recessiva. Es caracteritza per l'acumulació de lípids, sobretot esfingomielina, en el fetge, melsa i medul·la òssia. Els pacients de Niemann-Pick tipus A i B presenten visceromegàlia detectable en els primers mesos de vida. El tipus A correspon a la forma greu de la malaltia i presenta neurodegeneració de curs ràpid. L'alteració neurològica es manifesta poc després de néixer i produeix una pèrdua progressiva de les funcions intel·lectuals i motores que porta a la mort cap als cinc anys de vida. Pel contrari, els afectes de tipus B no presenten afectació neurològica o és lleu i els pacients acostumen a arribar a la vida adulta. La malaltia de Niemann-Pick tipus A i B es deu a un dèficit de l'activitat de l'enzim esfingomielinasa àcida (ASM, E.C.3.1.4.12), una hidrolasa lisosòmica que catalitza la degradació de l'esfingomielina a ceramida i fosforilcolina. La causa molecular és la presencia de mutacions en el gen *SMPD1* que codifica aquest enzim.

La malaltia de Niemann-Pick tipus C és també un trastorn autosòmic recessiu que es caracteritza, en aquest cas, per l'acumulació de colesterol i d'altres lípids en els lisosomes degut a mutacions en el gen *NPC1* (95% dels casos) o *NPC2* (5% dels casos). Les manifestacions clíniques inclouen hepatoesplenomegàlia i disfunció neurològica progressiva. NPC1 és una proteïna amb 13 dominis transmembrana que resideix als endosomes tardans i lisosomes mentre que NPC2 és una proteïna lisosomal soluble. La funció de NPC1 encara no es coneix però NPC2 actua com a transportador de colesterol als lisosomes. Treballs actuals suggereixen que, possiblement, NPC2 transfereix colesterol a NPC1 i que, per tant, totes dues proteïnes podrien funcionar de forma cooperativa en una mateixa via.

No es disposa de tractament específic per a cap d'aquestes malalties. S'ha portat a terme trasplantament de fetge (Daloze i col., 1977; Gartner i col., 1986) i trasplantament de cèl·lules amniòtiques (Scaggiante i col., 1987) en pacients amb Niemann-Pick A/B sense gaire èxit. El trasplantament de medul·la òssia, tot i que no sembla millorar els símptomes neurològics (Bayever i col., 1992), podria ser útil en el tractament dels pacients amb NP-B (Vellodi i col., 1987). Els principals inconvenients d'aquesta teràpia són trobar donants que siguin compatibles per fer el trasplantament i el risc que comporta.

Actualment, s'estan desenvolupant diferents estratègies terapèutiques tant per a les malalties de Niemann-Pick tipus A/B i C com per a les malalties lisosòmiques en general entre les quals trobem la teràpia de reemplaçament enzimàtic (aprovada per altres malalties d'acúmul lisosòmic i de possible utilitat per pacients amb NPB) , la teràpia de reducció de substrat (recentment aprovada pel tractament de les manifestacions neurològiques en pacients de Niemann-Pick tipus C), la teràpia gènica i algunes teràpies específiques basades en la utilització de xaperones o oligonuclèotids antisentit.

Els objectius que es van plantejar en aquest treball són els següents:

Per la malaltia de Niemann-Pick A/B:

1- Expressió i caracterització de les mutacions de canvi d'aminoàcid trobades en pacients espanyols amb Niemann-Pick A/B .
2- Caracterització de la mutació c.1257+4_1257+7delAGGG trobada per primer cop en un pacient amb Niemann-Pick tipus B.

Per la malaltia de Niemann-Pick C:

3- Identificació i caracterització de mutacions en 7 pacients de Niemann-Pick tipus C pels qual s'havia trobat una de les mutacions però faltava per identificar la segona mutació responsable de la malaltia.
4- Caracterització de la mutació c.1554-1009G>A identificada en un d'aquests pacients i assaig d'una possible teràpia basada en la utilització d'oligonucleòtids antisentit.
5- Creació d'un model cel·lular de la malaltia de Niemann-Pick tipus C mitjançant la utilització de RNAs d'interferència sobre el qual poder assajar possibles estratègies terapèutiques.

Mètodes i resultats obtinguts

Malaltia de Niemann-Pick A/B:

1- Expressió i caracterització de les mutacions de canvi d'aminoàcid trobades en pacients espanyols de Niemann-Pick A/B .

Per realitzar aquest primer objectiu es va seguir la següent metodologia:

· Obtenció del c.DNA de l'esfingomielinasa àcida salvatge clonat en un vector.
· Mutagènesi dirigida per introduir els canvis desitjats.
· Clonatge al vector d'expressió pc.DNA 3.1.
· Transfecció transitòria a cèl·lules COS-7 del cDNA WT o els cDNAs portadors de les diferents mutacions: : p.V130A (c.389T>C), p.L225P (c.674T>C), p.R228C (c.682C>T), p.Y367C (c.1100A>G), p.Y467S (c.1400A>C), p.A482E (c.1445C>A), p.T486A (c.1456A>G) i p.R608del (c.1823_1825delGCC).
· Mesura de l'activitat enzimàtica de les proteïnes mutades respecte la proteïna salvatge.
· *Western blot* de les proteïnes mutades, mitjançant immunodetecció amb un anticòs policlonal contra l'esfingomielinasa humana, per posar de manifest si hi ha defectes en la síntesi o estabilitat de proteïna i/o en la seva maduració.

L'estudi d'expressió va mostrar una reducció significativa en l'activitat de l'enzim per totes les mutacions estudiades. Per tant, les noves mutacions poden ser considerades patogèniques. Els valors d'activitat enzimàtica obtinguts per a les diferents proteïnes mutades, expressats com a percentatge d'activitat respecte a la proteïna salvatge van ser: V130A 33,26%, L225P 11,03%, R228C 4,75%, Y367C 2,48%, Y467S 1,81%, A482E 1,83%, T486A 4,15% i R608del 20%. Només la mutació R608del presentava una activitat residual elevada consistent amb el fenotip de tipus B al qual està associada i a l'efecte neuroprotector atribuït per altres autors a aquesta mutació. En general, el resultats obtinguts es correlacionaven amb la gravetat del fenotip que presentaven els pacients. Els estudis de *Western blot* de les proteïnes mutades van donar com a resultat una única banda de la mida esperada en tots els casos, indicant una síntesi correcta de la proteïna en les cèl·lules COS-7.

2- Caracterització de la mutació c.1257+4_1257+7delAGGG trobada per primer cop en un pacient amb Niemann-Pick tipus B.

La metodologia emprada per portar a terme aquest objectiu va ser:

· Cultiu de fibroblasts del pacient i fibroblasts control amb i sense cicloheximida.
· Extracció de RNA a partir dels fibroblasts del pacient i dels fibroblasts control.
· Síntesi de cDNA.
· Amplificació per PCR dels fragments de c.DNA d'interès.
· Purificació i seqüenciació.

La mutació c.1257+4_1257+7delAGGG és una deleció a nivell del donador de *splicing* del intró 3 que no afecta als nucleòtids més conservats del donador. Per tant, per poder conèixer l'efecte d'aquesta mutació en el procés de *splicing* cal portar a terme una anàlisi de RNA. Prediccions *in silico* utilitzant la web http://rulai.cshl.edu/new_alt_exon_db2/HTML/score.html van mostrar una reducció del score del donador de 8 a 1,7 quan la mutació estava present, indicant un possible efecte dràstic en el procés de *splicing*. Per confirmar aquesta hipòtesi, es va realitzar una anàlisi de c.DNA. Els resultats van demostrar que no es produïa mRNA normal a partir de l'al·lel mutat. En canvi, dos tràscrits que no inclouen l'exó 3 van ser detectats, un d'ells incloent 40 pb de l'intró 2. Aquests mRNAs havien estat descrits prèviament com a tràscrits minoritaris del gen *SMPD1* que no codifiquen per enzims actius (Schuchman, 1991). Un d'aquests tràscrits és degradat pel mecanisme de *nonsense-mediated decay*, tal com van mostrar el tractament amb cicloheximida. Tots aquests resultats demostren la patogenicitat de la mutació c.1257+4_1257+7delAGGG.

Malaltia de Niemann-Pick C:

3- Identificació i caracterització de mutacions en 7 pacients de Niemann-Pick tipus C pels qual s'havia trobat una de les mutacions però faltava per identificar la segona mutació responsable de la malaltia.

El procediment emprat per la identificació de les mutacions va ser:

· Cultiu de les cèl·lules dels pacients.
· Extracció de DNA genòmic i obtenció de cDNA.
· Amplificació del DNA genòmic i del cDNA en diferents fragments.
· Purificació i seqüenciació dels fragments amplificats.
· Comprovació de l'absència del canvi en 50 individus control.
· Per tal de definir els límits de la gran deleció trobada en el pacient NPC57 es van analitzar 71 polimorfismes localitzats al gen *NPC1* i els gens flanquejants *CABLES1*, *C18orf45*, *C18orf8*, *ANKRD29*, *LAMA3*, *TTC39C*, *OSBPL1A*, *IMPACT*, *ZNF521* per amplificació mitjançant PCR i els productes resultants, un cop purificats, es van sotmetre a seqüenciació.

L'anàlisi del gen *NPC1* en els 7 pacients va permetre la identificació de la segona mutació responsable de la malaltia en 6 d'ells. Les mutacions identificades són: c.1554-1009G>A (r.1553_1554ins1553+1830_1554-1008), c.2604+5G>A (r.2515_2604del), c.2612A>G (p.Y871C), c.3236T>C (p.F1079S), c.3265G>T (p.E1089X) i una deleció d'aproximadament 1Mb que inclou el gen *NPC1*. Excepte la mutació c.2612A>G (Millat, 2005), la resta no havien estat descrites anteriorment.

La mutació c. 2604+5G>A està situada al donador de *splicing* de l'intró 17. L'estudi a nivell de RNA va permetre determinar que aquesta mutació té com a resultat el *skipping* de l'exó 17.

L'anàlisi de polimorfismes localitzats a *NPC1* i als gens flanquejants van permetre definir els límits de la deleció. El límit centromèric de la deleció està a l'intró 13 del gen *C18orf45* i el telomèric a l'intró 11 del gen *OSBPL1A* ja que, o bé el pacient o la mare (portadora de la deleció) eren heterocigots per polimorfismes situats en aquestes regions. Per tant, la deleció s'expandeix com a màxim 1 Mb aproximadament.

4- Caracterització de la mutació c.1554-1009G>A identificada en un d'aquests pacients i assaig d'una possible teràpia basada en la utilització d'oligonucleòtids antisentit.

Els passos seguits en aquest cas van ser els següents:

· Cultiu de les cèl·lules del pacient.
· Extracció de DNA genòmic i RNA.
· Anàlisi de l'intró 9 sobre DNA genòmic i estudi del cDNA.
· Construcció d'un minigen i anàlisi del procés de splicing *in vitro.*
· Tractament de les cèl·lules del pacient amb l'oligonucleòtid antisentit i anàlisi de l'efecte sobre cDNA.

Una de les mutacions identificades, c.1554-1009G>A afecta al procés de *splicing*. L'estudi realitzat ha permès conèixer que es tracta d'un canvi intrònic que té com a resultat la inclusió de tota una regió intrònica en el RNA missatger madur com si es tractés d'un exó. A aquest tipus d'insercions se les coneix amb el nom de pseudoexons. Al realitzar-se el *splicing* de forma aberrant, s'altera la pauta de lectura de la proteïna donant lloc a un codó d'aturada prematur que activa el procés de *nonsense-mediated-decay*.

L'obtenció d'un minigen que consisteix en una construcció en la que vam clonar la regió del pseudoexó en presència i absència del canvi va permetre comprovar *in vitro* l'efecte de la mutació sobre el procés de *splicing*.

Les mutacions que generen la introducció d'un pseudoexó són susceptibles a una forma de correcció terapèutica basada en la utilització d'oligonucleòtids antisentit que, unint-se a la regió per complementarietat de bases, eviten la generació del splicing aberrant, restaurant-se així el *splicing* normal. Aquesta estratègia s'ha utilitzat en aquest treball per intentar corregir l'efecte produït per la mutació c. 1554-1009G>A. Les cèl·lules del pacient van ser tractades amb un oligonucleòtid antisentit específic a diferents concentracions i es va analitzar l'efecte corrector a diferents temps. Després del tractament amb el oligonucleòtid antisentit, es va observar una desaparició de la banda corresponent al splicing aberrant tant a les 48 com a les 72 hores, indicant una correcció a favor del splicing normal. Aquest mateix resultat va ser comprovat realitzant l'experiment en presència de cicloheximida. També es va assajar l'efecte del oligonucleòtid antisentit sobre cèl·lules Hela transfectades amb el minigen en presència de la mutació. Un cop comprovat l'efecte corrector, s'ha estimat la duració del mateix, sent aquesta d'aproximadament 72 hores.

5- Creació d'un model cel·lular de la malaltia de Niemann-Pick tipus C mitjançant la utilització de RNAs d'interferència sobre el qual poder assajar possibles estratègies terapèutiques

La metodologia emprada per portar a terme aquest objectiu va ser:

· Optimització de la transfecció a cèl·lules neuronals (SHSY5Y)
· Disseny i síntesi de dos siRNAs contra el gen NPC1
· Transfecció dels dos siRNAs sintetitzats i d'un siRNA contra *NPC1* comercial a cèl·lules SHSY5Y
· Anàlisi del percentatge d'inhibició de l'expressió per PCR a temps real

S'ha optimitzat la transfecció a cèl·lules neuronals SHSY5Y. A través de la utilització de la tecnologia de nucleofecció d'*Amaxa* s'han obtingut nivells de transfecció del 70-80% pels siRNAs i 40-50% per shRNAs. Un cop optimitzada la transfecció, s'han analitzat tres siRNAs diferents contra el gen *NPC1*: dos d'ells (si73 i si105) dissenyats i sintetitzats mitjançant un kit al laboratori i un altre adquirit a la casa comercial *Applied Biosystems* (siNPC). El percentatge d'inhibició de l'expressió del gen *NPC1* per part dels tres siRNAs es va valorar per PCR a temps real, utilitzant diferents gens endògens com a normalitzadors (Actina y *HPRT*). Només es va detectar inhibició amb el siNPC, sent aquesta d'un 70% aproximadament, tant a concentració de 200 com de 300 pmols. No es van observar gaires diferències en el percentatge d'inhibició en funció del normalitzador. Actualment s'està intentant obtenir una inhibició estable del gen *NPC1* en cèl·lules neuronals mitjançant l'ús de shRNAs per tal d'obtenir un model neuronal de la malaltia de Niemann-Pick tipus C sobre el que es puguin assajar diferents aproximacions terapèutiques.

Conclusions

Malaltia de Niemann-Pick A/B:

En aquest treball s'ha portat a terme la caracterització d'algunes de les noves mutacions trobades en pacients espanyols de Niemann-Pick A/B a nivell d'activitat enzimàtica o processament del RNA. S'han pogut establir correlacions genotip-fenotip per la majoria de les mutacions i, en particular, l'associació R608del-Tipus B ha estat confirmada. Aquests resultats proporcionen informació útil per la gestió dels pacients de Niemann-Pick A/B i a més, poden ajudar a establir els criteris per a la selecció d'individus amb els genotips idonis per sotmetre's a una teràpia de reemplaçament enzimàtic en un futur.

Aquesta part del treball ha estat publicada a la revista Human Mutation: "Identification and characterization of *SMPD1* mutations causing Niemann-Pick types A and B in Spanish patients**"** Rodríguez-Pascau, L et al. Hum Mutat. 2009 Jul;30(7):1117-22.

Malaltia de Niemann-Pick C:

S'ha realitzat un anàlisi molecular exhaustiu sobre pacients espanyols amb Niemann-Pick tipus C identificant, en la majoria dels casos, la segona mutació responsable de la malaltia. Les mutacions identificades són dues mutacions de canvi d'aminoàcid (p.Y871C i p.F1079S), una mutació que introdueix un codó stop (p.E1089X), dues mutacions que afecten al procés de *splicing* (c.1554-1009G>A i c.2604+5G>A) i una gran deleció d'aproximadament 1 Mb que inclou el gen *NPC1.* Totes les mutacions són noves excepte la p.Y871C que ja havia estat descrita anteriorment.

L'anàlisi de polimorfismes localitzats a *NPC1* i als gens flanquejants han permès definir els límits de la deleció, sent el límit centromèric de la deleció a l'intró 13 del gen *C18orf45* i el telomèric a l'intró 11 del gen *OSBPL1A*.

S'ha estudiat l'efecte de les mutacions de *splicing* i, en el cas de la mutació c.1554-1009G>A, aquest ha estat confirmat mitjançant la utilització d'un minigen. Per tal de corregir el *splicing* aberrant degut a aquesta mutació s'ha portat a terme una estratègia terapèutica basada en la utilització d'oligonuclèotids antisentit dirigits contra el donador críptic creat per la mutació. Els resultats són prometedors i, juntament amb els obtinguts per altres malalties, recolzen l'ús d'aquesta estratègia terapèutica per la correcció de mutacions generadores de pseudoexons. No obstant, abans d'arribar a aplicar aquesta teràpia sobre pacients s'han de tenir em compte aspectes com els possibles efectes secundaris, el desenvolupament de mètodes

d'administració idonis i la necessitat d'assolir un efecte a llarg termini. Tot i així, aquest tipus de tractament presenta alguns avantatges importants: es pot aplicar per qualsevol gen i malaltia en la que la mutació responsable sigui una mutació generadora d'un pseudoexó i la petita mida dels oligonucleòtids els permetria creuar la barrera hematoencefàlica, permetent el tractament de malalties neurològiques.

Aquesta part del treball ha estat publicada a la revista Human Mutation: "Antisense oligonucleotide treatment for a pseudoexon-generating mutation in the NPC1 gene causing Niemann-Pick type C disease" Rodríguez-Pascau, L et al. Hum Mutat. 2009 Nov;30(11):E993-E1001.

D'altra banda, s'han posat a punt les tècniques pel desenvolupament d'un model cel·lular neuronal de la malaltia de Niemann-Pick tipus C basat el la utilització de RNAs d'interferència. Aquest model permetrà un cop creat, l'assaig de futures estratègies terapèutiques per aquesta greu malaltia que fins el moment no té cura.

Bibliografia

Malaltia de Niemann-Pick A/B:

Dardis A, Zampieri S, Filocamo M, Burlina A, Bembi B, Pittis MG. 2005. Functional in vitro characterization of 14 SMPD1 mutations identified in Italian patients affected by Niemann Pick Type B disease. Hum Mutat 26(2):164.

Ferlinz K, Hurwitz R, Vielhaber G, Suzuki K, Sandhoff K. 1994. Occurrence of two molecular forms of human acid sphingomyelinase. Biochem J 301 (Pt 3):855-62.

Fernández-Burriel M, Pena L, Ramos JC, Cabrera JC, Martí M, Rodríguez-Quinones F, Chabás A. 2003. The R608del mutation in the acid sphingomyelinase gene (SMPD1) is the most prevalent among patients from Gran Canaria Island with Niemann-Pick disease type B. Clin Genet 63(3):235-6.

He X, Miranda SRP, Xiong X, Dagan A, Gatt S, Schuchman EH. 1999. Characterization of human acid shingomyelinase purified from the media overexpressing Chinese hamster ovary cells. Biochim Biophys Acta 1432:251-264

Jones I, He X, Katouzian F, Darroch PI, Schuchman EH. 2008. Characterization of common SMPD1 mutations causing types A and B Niemann-Pick disease and generation of mutation-specific mouse models. Mol Genet Metab 95(3):152-162

Levran O, Desnick RJ, Schuchman EH. 1991. Niemann-Pick type B disease. Identification of a single codon deletion in the acid sphingomyelinase gene and genotype/phenotype correlations in type A and B patients. J Clin Invest 88(3):806-10.

McGovern MM, Aron A, Brodie SE, Desnick RJ, Wasserstein MP. 2006. Natural history of Type A Niemann-Pick disease: possible endpoints for therapeutic trials. Neurology 66(2):228-32.

Muntaner L, Galmés A, Chabás A, Herrera M. 1997. Imaging features of type-B Niemann-Pick disease. Eur Radiol 7(3):361-4.

Pavlu-Pereira H, Asfaw B, Poupctova H, Ledvinova J, Sikora J, Vanier MT, Sandhoff K, Zeman J, Novotna Z, Chudoba D and others. 2005. Acid sphingomyelinase deficiency. Phenotype variability with prevalence of intermediate phenotype in a

series of twenty-five Czech and Slovak patients. A multi-approach study. J Inherit Metab Dis 28(2):203-27.

Pittis MG, Ricci V, Guerci VI, Marcais C, Ciana G, Dardis A, Gerin F, Stroppiano M, Vanier MT, Filocamo M and others. 2004. Acid sphingomyelinase: identification of nine novel mutations among Italian Niemann Pick type B patients and characterization of in vivo functional in-frame start codon. Hum Mutat 24(2):186-7.

Ricci V, Stroppiano M, Corsolini F, Di Rocco M, Parenti G, Regis S, Grossi S, Biancheri R, Mazzotti R, Filocamo M. 2004. Screening of 25 Italian patients with Niemann-Pick A reveals fourteen new mutations, one common and thirteen private, in SMPD1. Hum Mutat 24(1):105.

Rodríguez-Pascau L, Gort L, Schuchman EH, Vilageliu L, Grinberg D, Chabas A (2009) Identification and characterization of SMPD1 mutations causing Niemann-Pick types A and B in Spanish patients. Hum Mutat 30: 1117-22

Schuchman EH. 1995. Two new mutations in the acid sphingomyelinase gene causing type a Niemann-pick disease: N389T and R441X. Hum Mutat 6(4):352-4.

Schuchman EH, Desnick RJ. 2001. Niemann-Pick disease types A and B: acid sphingomyelinase deficiencies. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York: McGraw-Hill. p 3589-3610.

Schuchman EH, Suchi M, Takahashi T, Sandhoff K, Desnick RJ. 1991. Human acid sphingomyelinase. Isolation, nucleotide sequence and expression of the full-length and alternatively spliced cDNAs. J Biol Chem 266(13):8531-9.

Simonaro CM, Desnick RJ, McGovern MM, Wasserstein MP, Schuchman EH. 2002. The demographics and distribution of type B Niemann-Pick disease: novel mutations lead to new genotype/phenotype correlations. Am J Hum Genet 71(6):1413-9.

Vanier MT, Ferlinz K, Rousson R, Duthel S, Louisot P, Sandhoff K, Suzuki K. 1993. Deletion of arginine (608) in acid sphingomyelinase is the prevalent mutation among Niemann-Pick disease type B patients from northern Africa. Hum Genet 92(4):325-30.

Wan Q, Schuchman EH. 1995. A novel polymorphism in the human acid sphingomyelinase gene due to size variation of the signal peptide region. Biochim Biophys Acta 1270(2-3):207-10.

Malaltia de Niemann-Pick C:

Aouadi M, Tesz GJ, Nicoloro SM, Wang M, Chouinard M, Soto E, Ostroff GR, Czech MP. 2009. Orally delivered siRNA targeting macrophage Map4k4 suppresses systemic inflammation. Nature 458:1180-4.

Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, Loftus SK, Zhang D, Cummings C, Gu J, Rosenfeld MA, Pavan WJ, Krizman DB and others. 1997. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. Science 277:228-31.

Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. Nat Rev Genet 3:285-98.

Davis RL, Homer VM, George PM, Brennan SO. 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. Hum Mutat 30:221-7.

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. Hum Mutat 24:440.

Fernandez-Valero EM, Ballart A, Iturriaga C, Lluch M, Macias J, Vanier MT, Pineda M, Coll MJ. 2005. Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: genotype-phenotype correlations. Clin Genet 68:245-54.

Friedland N, Liou HL, Lobel P, Stock AM. 2003. Structure of a cholesterol-binding protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease. Proc Natl Acad Sci U S A 100:2512-7.

Friedman KJ, Kole J, Cohn JA, Knowles MR, Silverman LM, Kole R. 1999. Correction of aberrant splicing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by antisense oligonucleotides. J Biol Chem 274:36193-9.

Guo DC, Gupta P, Tran-Fadulu V, Guidry TV, Leduc MS, Schaefer FV, Milewicz DM. 2008. An FBN1 pseudoexon mutation in a patient with Marfan syndrome: confirmation of cryptic mutations leading to disease. J Hum Genet 53:1007-11.

Gurvich OL, Tuohy TM, Howard MT, Finkel RS, Medne L, Anderson CB, Weiss RB, Wilton SD, Flanigan KM. 2008. DMD pseudoexon mutations: splicing efficiency, phenotype, and potential therapy. Ann Neurol 63:81-9.

Higgins ME, Davies JP, Chen FW, Ioannou YA. 1999. Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network. Mol Genet Metab 68:1-13.

Ko DC, Binkley J, Sidow A, Scott MP. 2003. The integrity of a cholesterol-binding pocket in Niemann-Pick C2 protein is necessary to control lysosome cholesterol levels. Proc Natl Acad Sci U S A 100:2518-25.

Michel-Calemard L, Dijoud F, Till M, Lambert JC, Vercherat M, Tardy V, Coubes C, Morel Y. 2009. Pseudoexon activation in the PKHD1 gene: a French founder intronic mutation IVS46+653A>G causing severe autosomal recessive polycystic kidney disease. Clin Genet 75:203-6.

Millat G, Marcais C, Tomasetto C, Chikh K, Fensom AH, Harzer K, Wenger DA, Ohno K, Vanier MT. 2001. 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 68:1373-85.

Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H, Fensom A, Vanier MT, Wattiaux R, Jadot M, Lobel P. 2000. Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. Science 290:2298-301.

Neufeld EB, Wastney M, Patel S, Suresh S, Cooney AM, Dwyer NK, Roff CF, Ohno K, Morris JA, Carstea ED and others. 1999. The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. J Biol Chem 274:9627-35.

Park WD, O'Brien JF, Lundquist PA, Kraft DL, Vockley CW, Karnes PS, Patterson MC, Snow K. 2003. 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 22:313-25.

Patterson MC, Vanier MT, Suzuki K, Morrris JA, Carstea E, Neufeld EB, Blanchette-Mackie JE, Pentchev P. 2001. Niemann-Pick Disease type C: a lipid trafficking disorder. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease 8th Ed. New York: McGraw-Hill. p 3611-3633.

Raponi M, Upadhyaya M, Baralle D. 2006. Functional splicing assay shows a pathogenic intronic mutation in neurofibromatosis type 1 (NF1) due to intronic sequence exonization. Hum Mutat 27:294-5.

Ribeiro I, Marcao A, Amaral O, Sa Miranda MC, Vanier MT, Millat G. 2001. Niemann-Pick type C disease: NPC1 mutations associated with severe and mild cellular cholesterol trafficking alterations. Hum Genet 109:24-32.

Rincon A, Aguado C, Desviat LR, Sanchez-Alcudia R, Ugarte M, Perez B. 2007. Propionic and Methylmalonic Acidemia: Antisense Therapeutics for Intronic Variations Causing Aberrantly Spliced Messenger RNA. Am J Hum Genet 81:1262-1270.

Rodríguez-Pascau L, Coll MJ, Vilageliu L, Grinberg D. 2009. Antisense oligonucleotide treatment for a pseudoexon-generating mutation in the *NPC1* gene causing Niemann-Pick type C disease. Hum Mutat 30:E993-E1001.

Santamaria R, Vilageliu L, Grinberg D. 2008. SR proteins and the nonsense-mediated decay mechanism are involved in human GLB1 gene alternative splicing. BMC Res Notes 1:137.

Sleat DE, Wiseman JA, El-Banna M, Price SM, Verot L, Shen MM, Tint GS, Vanier MT, Walkley SU, Lobel P. 2004. Genetic evidence for nonredundant functional cooperativity between NPC1 and NPC2 in lipid transport. Proc Natl Acad Sci U S A 101:5886-91.

Steinberg SJ, Ward CP, Fensom AH. 1994. Complementation studies in Niemann-Pick disease type C indicate the existence of a second group. J Med Genet 31:317-20.

Sun X, Marks DL, Park WD, Wheatley CL, Puri V, O'Brien JF, Kraft DL, Lundquist PA, Patterson MC, Pagano RE and others. 2001. Niemann-Pick C variant detection by altered sphingolipid trafficking and correlation with mutations within a specific domain of NPC1. Am J Hum Genet 68:1361-72.

Vanier MT, Duthel S, Rodriguez-Lafrasse C, Pentchev P, Carstea ED. 1996. Genetic heterogeneity in Niemann-Pick C disease: a study using somatic cell hybridization and linkage analysis. Am J Hum Genet 58:118-25.

Vega AI, Perez-Cerda C, Desviat LR, Matthijs G, Ugarte M, Perez B. 2009. Functional analysis of three splicing mutations identified in the PMM2 gene: toward a new therapy for congenital disorder of glycosylation type Ia. Hum Mutat 30:795-803.

Vetrini F, Tammaro R, Bondanza S, Surace EM, Auricchio A, De Luca M, Ballabio A, Marigo V. 2006. Aberrant splicing in the ocular albinism type 1 gene (OA1/GPR143) is corrected in vitro by morpholino antisense oligonucleotides. Hum Mutat 27:420-6.