ESTUDIO MOLECULAR EN DOS HERMANAS AFECTADAS POR ICTIOSIS CONGÉNITA AUTOSÓMICA RECESIVA: DESCRIPCIÓN DE UNA NUEVA MUTACIÓN CAUSAL EN *TGM1*

MEYID BERNARDO MORENO SABOYA

COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD FACULTAD DE MEDICINA MAESTRÍA GENÉTICA HUMANA BOGOTÁ, D.C. NOVIEMBRE DE 2016

ESTUDIO MOLECULAR EN DOS HERMANAS AFECTADAS POR ICTIOSIS CONGÉNITA AUTOSÓMICA RECESIVA: DESCRIPCIÓN DE UNA NUEVA MUTACIÓN CAUSAL EN *TGM1*

MEYID BERNARDO MORENO SABOYA

Trabajo de tesis como requisito parcial para optar el título de MAGISTER EN GENÉTICA HUMANA

> DIRECTOR PAUL LAISSUE MD, MSc, PhD.

CO-DIRECTORA

DORA FONSECA PhdD.

COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD FACULTAD DE MEDICINA MAESTRÍA GENÉTICA HUMANA BOGOTÁ, D.C. NOVIEMBRE DE 2016 Línea de Investigación: Genética Humana

Instituciones Participantes:

Unidad de Genética, Facultad de Medicina, Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario -Grupo CIGGUR, centro de Investigación en Genética y Genómica Universidad del Rosario. Bogotá, Colombia.

Unidad de Dermatología, Clínica Carlos Ardila Lule, Bucaramanga, Colombia.

Tipo de Investigación: Postgrado Tesista: Meyid Bernardo Moreno Saboya. MD. Director: Paul Laissue. MD, MSc, PhD. Co-directora: Dora Fonseca PhD.

Nota de Aceptación

Director

Co-Directora

Jurado

Jurado

Bogotá D. C., noviembre de 2016

"La Universidad del Rosario no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velara por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia"

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la vida y la capacidad de pensamiento, de análisis y la salud para poder afrontar los diversos retos que encuentro diariamente. A mi familia que siempre está pendiente y me da todo el apoyo necesario en cada una de mis actividades y por el gran esfuerzo que realizan en obsequiarme su tiempo valioso para otros objetivos personales y académicos. A la dedicación, el asesoramiento, los aportes y la transmisión de conocimiento que ha ofrecido el Dr. Paul Laissue y la Dr. Dora Fonseca para poder culminar este trabajo. Al Dr. Oscar Ortega por su experiencia, conocimientos y virtud de guiar y enseñar las técnicas de laboratorio y de bioinformática que se requirieron para esta tesis. Al grupo de docentes de la maestría por el apoyo académico. A mis compañeros de maestría que con su carisma y esfuerzos logramos formar un excelente grupo de estudio y de trabajo que nos permitió ampliar nuestras capacidades y lograr alcanzar nuevas metas. A la universidad por la oportunidad de dar estos espacios de investigación y de formación personal y grupal. Cada día estamos más cerca de comprender lo que no podemos ver a través de los muros y la esperanza está en lograr traspasar esas murallas para entender y utilizar cada nuevo conocimiento en favor de las personas y de la sociedad. Meyid Moreno. MD.

CONTENIDO

RESUMEN I. MARCO TEÓRICO 1. INTRODUCCIÓN A. DEFINICIÓN DE ICTIOSIS	Pág. 14 15 15 15
B. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ICTIOSIS	15
C. SEVERIDAD CLÍNICA DE LA ICTIOSIS	15
D. GENERALIDADES DE LA CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LAS ICTIOSIS	17
2. ICTIOSIS ADQUIRIDAS	18
3. ICTIOSIS CONGÉNITAS	19
A. LAS ICTIOSIS SINDROMÁTICAS	19
i. ICTIOSIS SINDROMÁTICAS LIGADAS AL X	20
1) ICTIOSIS LIGADAS AL X – FORMAS SINDROMÁTICAS	20
a) Síndrome de Kallmann ligado al X asociado con ictiosis ligado al X	20
b) Síndrome de Asperger ligado al X tipo 2 asociado a ictiosis ligado al X	21
c) Condrodisplasia punctata recesiva ligada al X tipo 1 asociada a ictiosis	
ligada al X	21
2) SÍNDROME IFAP / BRESHECK	22
3) CONDRODISPLASIA PUNTACTA DOMINANTE LIGADA AL X TIPO	2 23
ii. ICTIOSIS AUTOSÓMICAS SINDROMÁTICAS	24
1) ICTIOSIS AUTOSÓMICAS SINDROMÁTICAS ASOCIADAS A	
TRASTORNOS DEL PELO	25
a) Sindrome Netherton	25
2) ICTIOSIS AUTOSÓMICAS SINDROMÁTICAS ASOCIADAS A	
TRASTORNOS NEUROLÓGICOS	26
a) Síndrome Sjögren-Larsson	26
3) ICTIOSIS AUTOSÓMICAS SINDROMÁTICAS ASOCIADAS A	
ENFERMEDADES LETALES	28
a) Enfermedad de Gaucher tipo 2	28

4) ICTIOSIS AUTOSÓMICAS SINDROMÁTICAS ASOCIADAS A OTROS	
SIGNOS	29
a) Síndrome KID	29
B. ICTIOSIS NO-SINDROMÁTICAS	31
i. ICTIOSIS COMUNES	31
1) ICTIOSIS VULGAR	31
2) ICTIOSIS RECESIVA LIGADA AL X NO-SINDROMÁTICA	32
ii. ICTIOSIS QUERATINOPÁTICAS	33
1) ICTIOSIS EPIDERMOLÍTICA	33
iii. ICTIOSIS CONGÉNITAS AUTOSÓMICAS RECESIVAS	35
1) FORMAS MAYORES	35
a) Ictiosis arlequín	35
b) Ictiosis laminar	36
c) Eritrodermia ictiosiforme congénita	37
2) HETEROGENEIDAD GENETICA DE LA ARCI	37
C. LA FAMILIA DE LAS TRANSGLUTAMINASAS	41
i. EL GEN <i>TGM1</i>	41
1) EXPRESIÓN DE <i>TGM1</i>	42
2) LOCALIZACIÓN DE LA PROTEINA TGM1	42
3) DOMINIOS DE TGM1	43
4) MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE TGM1	43
5) ACTIVIDAD CATALÍTICA DE TGM1	44
6) CICLO CATALÍTICO DE LAS TGM	44
7) RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO DE LAS MUTACIONES DE TGMI	46
II. PREGUNTA CIENTÍFICA	48
III. OBJETIVO GENERAL	48
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
V. MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. PACIENTE	49
2. EXTRACCIÓN DE ADN DE SANGRE PERIFÉRICA	50
3. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DE LA BIOPSIA DE PIEL DE P1	51

4. SÍNTESIS DE ADNc TOTAL DE PIEL	52
5. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACION DEL GEN <i>TGMI</i>	52
A. DISEÑO DE <i>PRIMERS</i> DE <i>TGM1</i>	52
B. AMPLIFICACIÓN DE <i>TGM1</i>	52
C. SECUENCIACIÓN DE <i>TGMI</i>	54
6. RT-PCR DE <i>TGM1</i>	55
A. DISEÑO DE <i>PRIMERS</i> DE RT-PCR DE <i>TGMI</i>	55
B. RT-PCR DE <i>TGM1</i>	56
7. CLONAJE DE LOS PRODUCTOS DE RT-PCR DE <i>TGM1</i> DE P1 Y	
SECUENCIACIÓN	57
A. EL VECTOR $PCR^{TM}4$ -(TOPO)®	57
B. CLONAJE EN EL VECTOR PCR TM 4-(TOPO)®	58
C. TRANSFORMACIÓN EN CELULAS QUIMIOCOMPETENTES Y SIEMBRA	4
EN PLACAS DE AGAR LB	58
D. SELECCIÓN DE LAS COLONIA Y CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO LB	59
E. PCR A PARTIR DE CULTIVOS LÍQUIDOS BACTERIANOS	59
F. SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN¢ DE <i>TGM1</i> DE P1	60
8. PREDICCIONES <i>IN SILICO</i> DE LOS TRANSCRITOS GENERADOS	
POR LA VARIANTE INTRÓNICA c.320-2A>G DE <i>TGM1</i> 61	
9. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE LOS TRANSCRITOS GENERADOS POR LA	
VARIANTE c.320-2A>G DE TGM1	62
VI. RESULTADOS	63
1. TIPO DE ICTIOSIS Y MODO DE HERENCIA DE LA ENFERMEDAD	63
2. SECUENCIACIÓN DE ADN GENÓMICO DE <i>TGMI</i>	63
3. RT-PCR DE <i>TGM1</i>	66
4. SECUENCIACIÓN DE LOS TRANSCRITOS GENERADOS POR LA	
VARIANTE INTRÓNICA c.320-2A>G DE <i>TGM1</i> DE P1	68
5. PREDICCIONES <i>IN SILICO</i> DE LA VARIANTE INTRÓNICA c.320-2A>G	70
A. CRYP-SKIP	70
B. NNSPLICE SCORE v.0.9	70
C. SPLICE SITE SCORE CALCULATION Y MAXENTSCAN	71

6. ALINEAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS TGM1 MUTANTES GENERADAS	
POR LA VARIANTE c.320-2A>G DE <i>TGM1</i>	73
VII. DISCUSIÓN	75
VIII. PERPECTIVAS	80
BIBLIOGRAFÍA	82
ANEXOS	97
Anexo 1. Artículo "A NOVEL <i>TGM1</i> MUTATION, LEADING TO MULTIPLE	
SPLICING REARRANGEMENTS, IS ASSOCIATED WITH AUTOSOMAL	
RECESSIVE CONGENITAL ICHTHYOSIS"	97

FIGURAS

Figura 1. Escala Likert de Ictiosis	Pág. 16
Figura 2. Formas de ictiosis. Clasificación de Sorèze, 2009.	17
Figura 3. Genes de las TGM humanas y dominios proteicos.	41
Figura 4. Las TGM catalizan varias reacciones postraduccionales.	45
Figura 5. Ciclo enzimático de las transglutaminasas.	45
Figura 6. Características clínicas de la paciente P1 con ARCI.	49
Figura 7. Familiograma de las pacientes.	50
Figura 8. Mapa del vector pCR TM 4-TOPO®	58
Figura 9. Verificación de PCR de TGM1 en gel de agarosa 1%.	64
Figura 10. Electroforetogramas de la secuenciación de Sanger de TGM1 de P1 e identifica	ción
de las tres variantes homocigotas.	64
Figura 11. Electroforetogramas de la secuenciación de Sanger del amplicón correspondier	nte
al exón 3 de TGM1 en P1 y familiares.	66
Figura 12. Segregación de la variante c.320-2A>G de TGM1	66
Figura 13. Verificación de RT-PCR de TGM1 en gel de agarosa al 1%.	68
Figura 14. Secuenciación de RT-PCR de la variante intrónica c.320-2A>G de TGM1 clona	ado
en la colonia 7.	69
Figura 15. Secuenciación de RT-PCR de la variante intrónica c.320-2A>G de TGM1 clona	ado
en la colonia 10.	69
Figura 16. Secuenciación de RT-PCR de la variante intrónica c.320-2A>G de TGM1 clona	ado
en la colonia 15.	70
Figura 17. Predicción de sitio críptico aceptor de splicing realizado con CRYP-SKIP con	la
secuencia del exón 3 de TGM1.	71
Figura 18. Predicciones del programa NNSplice Score v0.9 para los posibles sitios críptic	os
aceptores de <i>splicing</i> causado por la variante c.320-2A>G de TGM1.	71
Figura 19. Alineamiento múltiple de las proteínas TGM1 WT y las proteínas TGM1 gener	adas
por la mutación intrónica c.320-2A>G de TGM1.	74

TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Primers de amplificación del gen TGM1	53
Tabla 2. Reactivos de PCR de TGM1	53
Tabla 3. Programación del termociclador para la amplificación de TGM1	54
Tabla 4. Programación del termociclador Para la amplificación del exón 7 de TGM1	54
Tabla 5. Primers internos para la secuenciación del gen TGM1	55
Tabla 6. Primers de RT-PCR de TGM1	56
Tabla 7. Reacción de RT-PCR de TGM1	57
Tabla 8. Programación del termociclador para RT-PCR de TGM1	57
Tabla 9. Primers de amplificacion de PCR de cultivos de bacterias transformadas60	
Tabla 10. Reactivos de PCR de cultivo de bacterias transformadas	60
Tabla 11. Programación del termociclador para PCR de cultivo de bacterias transformada	s 60
Tabla 12. Resumen de las variantes homocigotas de TGM1 de P1	65
Tabla 13. Predicciones de sitios crípticos para la variante c.320-2A>G de <i>TGM1</i>	72
Tabla 14. Variantes de ARNm y de proteínas generados por la mutación intrónica c.320-2	A>G
de TGM1	73

RESUMEN

En esta tesis se describen dos hermanas colombianas afectadas por ictiosis, con una forma de ictiosis congénita autosómica recesiva (ARCI). Las ARCI presentan heterogeneidad genética y al menos 9 genes han sido asociados a su etiología: TGM1, ALOX12B, ALOX3, ABCA12, CYP4F22, NIPAL4, LIPN, CERS y PNPLA1. En esta tesis, la secuenciación directa del gen TGM1 del grupo familiar estudiado permitió identificar la variante intrónica c.320-2A>G de TGM1 que modifica el sitio consenso aceptor de *splicing* del intrón 2. Teóricamente las mutaciones en sitios consenso de splicing pueden generar varios transcritos alternativos. El clonaje del cDNA (RT-PCR) de *TGM1* de una biopsia de piel de una de las pacientes permitió confirmar la presencia de al menos tres diferentes tipos de transcritos generados por la variante en estudio. Se identificaron tres mecanismos moleculares relacionados con la mutación: el salto del exón 3, la activación de un sitio críptico y la inclusión (retención) del intrón 2. Se identificaron los siguientes ARNm de TGM1 generados por la variante en estudio: r.320 508del, r.320 330del y r.[319 320ins320-150 320-17. En los dos primeros, los ARNm identificados teóricamente traducen una proteína mutante con deleciones en la estructura β -sandwich que podrían presentar cambios importantes en el plegamiento de la estructura terciaria. El tercer ARNm identificado teóricamente traduce una proteína con un codón de parada prematuro con la abolición de la función enzimática o podría ser eliminado por el sistema NMD. Estos hallazgos, que fueron publicados en la revista Clinical and experimental Dermatology, explicarían la causa molecular del fenotipo de las pacientes estudiadas.

I. MARCO TEÓRICO

1. INTRODUCCIÓN

A. DEFINICIÓN DE ICTIOSIS

En la India en 250 A.C., se le denominaba "Ekakushtha" a las dermatosis secas que asemejan a las escamas del pez (Menon and Hoberman, 1969). La palabra ictiosis deriva de la raíz griega *Ichthys* que significa pez, término utilizado desde el siglo XIX por la medicina occidental para referirse al aspecto de la piel con descamación severa que simulan las escamas como principal signo clínico (Willan, 1808; Booth, 1999).

Actualmente las ictiosis pueden definirse como un grupo heterogéneo de disfunciones de la queratinización que se caracterizan por presentar piel seca (xerosis), áspera y con descamación marcada sin signos de inflamación (Hunter *et al.*, 2002).

B. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ICTIOSIS

La ictiosis tiene una incidencia baja, aproximadamente 17.000 personas nacen cada año con algún tipo de ictiosis en los Estados Unidos. En orden de prevalencia, la ictiosis vulgar es la más común de las formas hereditarias y afecta 1:250-1000 personas, seguida por la ictiosis recesiva ligada al X (con una prevalencia de 1:2.000-6.000 hombres). Las siguientes formas con frecuencias bajas son las ictiosis congénitas autosómicas recesivas (1:200.000-300.000) y la ictiosis epidermolítica (1:200.000-300.000) (Bale and Doyle, 1994; Hernandez-Martin *et al.*, 2012; Kent *et al.*, 2008). Otras formas de ictiosis son reportadas como casos únicos en la literatura científica.

C. SEVERIDAD CLÍNICA DE LA ICTIOSIS

En el momento no existe un consenso sobre la severidad de los casos de ictiosis y este aspecto depende de la experiencia clínica del examinador. En 2010, Kamalpour et al., propone el índice de severidad de ictiosis congénita o "Escala de Likert" en el cual se

utilizan 3 variables que permiten medir el grado de hiperqueratosis, eritema y alopecia con la asistencia de fotos ilustrativas en cada grado de severidad de algunos tipos de ictiosis (Kamalpour *et al.*, 2010). Así, se propone un método fiable, válido y reproducible entre clínicos e investigadores que incluso puede ser utilizado y modificado según las necesidades en reportes científicos o en estudios clínicos. (Figura 1).



Figura 1. Escala Likert de Ictiosis (Kamalpour et al., 2010).

D. GENERALIDADES DE LA CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LAS ICTIOSIS

En 1808 en Londres, Robert Willan utilizó la palabra "ichtyosis" en su clasificación básica de las enfermedades dermatológicas para referirse a las alteraciones estructurales profundas de la piel (Willan, 1808; Booth, 1999). Desde entonces, se han realizado múltiples clasificaciones clínicas de esta patología con una gran variedad en la terminología y solo hasta el año 2009 en Sorèze (Francia), en la primera conferencia internacional de ictiosis se unificaron términos redundantes y criterios clínicos basándose en el conocimiento clínico, fisiopatológico y molecular acumulado hasta el momento. Se publicó entonces el primer consenso de la clasificación clínica de las ictiosis hereditarias definiendo dos grandes formas principales: las ictiosis sindromáticas y las ictiosis no-sindromáticas (Oji *et al.*, 2010). (Figura 2).



Figura 2. Formas de ictiosis. Clasificación de Sorèze, 2009.

Esta clasificación permite realizar un abordaje clínico inicial de los pacientes con ictiosis. En primer lugar, se inicia con una aproximación de la categorización clínica del fenotipo de la piel, la edad de inicio de las lesiones, la presencia de membrana colodión congénita o de eritrodermia congénita, las características de la descamación (el tipo, el color y la distribución corporal), si hay compromiso de palmo-plantar y de otras características como la liquenificación, la formación de ampollas o erosiones, la presencia de hipohidrosis, las infecciones cutáneas frecuentes o el prurito. En segundo lugar, se realiza una adecuada

anamnesis indagando los signos clínicos extracutáneos característicos de las formas sindromáticas y una adecuada construcción del familiograma para determinar el posible modo de herencia del síndrome. Por último, son necesarios los análisis de los paraclínicos en la búsqueda de otros hallazgos extracutáneos, de los estudios histopatológicos e inmunohistoquímica en biopsias de piel. Todo lo anterior se efectúa para realizar un acercamiento al diagnóstico molecular para ofrecer una adecuada asesoría genética.

2. ICTIOSIS ADQUIRIDAS

Desde principios del siglo XIX existen reportes de casos clínicos de ictiosis adquirida por exposición a sustancias específicas (Little, 1929). En 1943 Ronchese, reporta por primera vez la ictiosis adquirida asociada a la enfermedad de Hodgkin, la principal causa neoplásica asociada a ictiosis adquiridas (Ronchese, 1943; Webster *et al.*, 1952; Sneddon, 1955). Posteriormente, se publicaron nuevos casos de ictiosis adquirida asociados a otros tipos de neoplasias como los linfomas no-Hodgkin y otros linfomas, el sarcoma de Kaposi, el mieloma múltiple, las micosis fungoides, los carcinomas de ovario, seno, pulmón y cérvix, los melanomas, los leiomiosarcoma y otras condiciones neoplásicas (Paramsothy *et al.*, 1987; Tamura *et al.*, 1994; Reiches, 1950; Krakowski *et al.*, 1973; Brooks and Harrington, 1977; Donsky, 1978; Kutting *et al.*, 1996; DiGiovanna and Robinson-Bostom, 2003; Patel *et al.*, 2006).

La ictiosis adquirida también puede indicar enfermedades autoinmunes subyacentes. Se presenta en algunos casos del lupus eritematoso sistémico, en la dermatomiositis, en la fascitis eosinofílica, en la sarcoidosis y en la enfermedad de injerto contra huésped (Humbert and Agache, 1991; de la Cruz-Alvarez *et al.*, 1996; Spelman *et al.*, 1996; DiGiovanna and Robinson-Bostom, 2003; Patel *et al.*, 2006). Igualmente, puede indicar enfermedades metabólicas subyacentes como la enfermedad celíaca, las hepatopatías crónicas, la falla renal crónica, la deficiencia de ácidos grasos esenciales, la insuficiencia pancreática y los trastornos de mala-absorción (Vergnat *et al.*, 1978; Menni *et al.*, 2000; DiGiovanna and Robinson-Bostom, 2003; Patel *et al.*, 2006). Además, los trastornos endocrinos como el hiperparatiroidismo, el hipotituitarismo, el hipotiroidismo y la diabetes pueden ser la causa

subyacente de ictiosis adquirida (Scheinfeld *et al.*, 2001; DiGiovanna and Robinson-Bostom, 2003; Patel *et al.*, 2006).

Algunos casos de enfermedades infecto-contagiosas se han asociado con ictiosis adquirida como el HIV, los virus linfotrópicos humanos y la lepra (Shah *et al.*, 1973; Kaplan *et al.*, 1993; Moulick *et al.*, 2013). Los medicamentos como el alopurinol, la butiropenona, la cimetidina, la clofazimina, la hidroxiuria, el ácido nicotínico, la hidroclorotiazida y las sales de litio también puede causar ictiosis adquirida (DiGiovanna and Robinson-Bostom, 2003; Patel *et al.*, 2006).

En resumen, las ictiosis adquiridas son un grupo de disfunciones cutáneas no-hereditarias caracterizadas por xerosis y descamación prominente que pueden comprometer amplias áreas corporales. Se asocia a una historia clínica que sugiera alguna condición subyacente como las neoplasias, las enfermedades autoinmune-inflamatorias, las enfermedades metabólicas, endocrinas, e infecciosas, los trastornos de mala-absorción y manifestaciones por efecto adversos a medicamentos. La severidad de la ictiosis puede depender de la agudeza y de la gravedad de la causa subyacente. Tiende a desaparecer si es corregida la causa subyacente y puede haber recaídas al concurrir la reincidencia de la causa (Patel *et al.*, 2006).

3. ICTIOSIS CONGÉNITAS

El consenso internacional de Sorèze, 2009, definió la clasificación de la ictiosis congénita fundamentada en las características clínicas, la fisiopatología y la etiología molecular. Se delimitaron dos grandes formas o grupos de clasificación: las ictiosis sindromáticas y las nosindromáticas (Oji *et al.*, 2010).

A. LAS ICTIOSIS SINDROMÁTICAS

Las formas sindromáticas agrupan las ictiosis que se asocian con otros síntomas extracutáneos. Este grupo se divide principalmente según el tipo de herencia y según el órgano preferentemente afectado.

i. ICTIOSIS SINDROMÁTICAS LIGADAS AL X

1) ICTIOSIS LIGADAS AL X – FORMAS SINDROMÁTICAS

Este grupo reúne varios síndromes causados por la deleción intersticial del gen *STS* (Xp22.31) con el compromiso de otros *loci* contiguos (Langlois *et al.*, 2009). La deleción del gen *STS* produce el fenotipo de la ictiosis ligada al X mientras que la deleción de los otros *loci* contiguos resulta en los fenotipos de los síndromes adyacentes correspondientes.

La ictiosis ligada al X se caracteriza principalmente por el inicio de las descamaciones antes de los 6 meses de vida, de color café oscuro, de formas gruesas e irregulares en el tronco y las extremidades, sin incluir los pliegues antecubitales y las fosas poplíteas (Webster *et al.*, 1978b; Oji *et al.*, 2010). Los distintos síndromes adyacentes se describen a continuación:

a) Síndrome de Kallmann ligado al X asociado con ictiosis ligado al X.

Se caracteriza por los signos clínicos de la ictiosis ligada al X, hipogonadismo hipogonadotrópico causado por la deficiencia de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y anosmia o hiposmia (Maya-Nunez *et al.*, 1998). En pocos casos se asocia a aplasia renal unilateral (Kirk *et al.*, 1994; Martul *et al.*, 1995). Rara vez, se presenta con un síndrome nefrótico (Krishnamurthy *et al.*, 2007).

El síndrome es causado por la deleción intersticial del brazo corto del cromosoma X que compromete los genes *STS* (Xp22.31) y *KAL1* (Xp22.31). El gen *KAL1* mide aproximadamente 203 kb, tiene 12 exones que codifican una proteína de 680 aminoácidos llamada KAL1 (anosmina-1). Se expresa principalmente en el pulmón, la corteza cerebral y la glándula tiroidea (Soussi-Yanicostas *et al.*, 2002). Esta proteína tiene un papel fundamental en la migración neuronal de la GnRH y de los nervios olfatorios hacia el hipotálamo (Soussi-Yanicostas *et al.*, 2002; Cariboni *et al.*, 2004).

b) Síndrome de Asperger ligado al X tipo 2 asociado a ictiosis ligado al X.

Se caracteriza por los signos clínicos de la ictiosis ligada al X y la presencia de espectro autista con o sin retardo mental (Laumonnier *et al.*, 2004; Jamain *et al.*, 2003; Macarov *et al.*, 2007; Langlois *et al.*, 2009).

El síndrome es causado por la deleción intersticial del brazo corto del cromosoma X que compromete a los genes *STS* (Xp22.31) y *NLGN4* (Xq22.32). El gen *NLGN4* mide aproximadamente 338 kb y tiene 6 exones que codifican una proteína de 816 aminoácidos llamada NLGN4X (neuroligina-4 ligada al X). Se expresa principalmente en el corazón y en niveles menores en el hígado, el músculo esquelético, el páncreas y el cerebro (Bolliger *et al.*, 2001). Pertenece a la familia de adhesión celular sináptica neuronal neuroligina. Las mutaciones en algunos de los miembros de la familia neuroligina pueden abolir la formación, la estabilización o el reconocimiento de las sinapsis específicas y esenciales de los procesos de comunicación que son deficientes en los individuos con espectro autista (Jamain *et al.*, 2003).

c) Condrodisplasia punctata recesiva ligada al X tipo 1 asociada a ictiosis ligada al X.

Se caracteriza por los signos clínicos de la ictiosis ligada al X, facies inusuales por hipoplasia nasal severa, displasia congénita de diferentes huesos, hipoplasia de falanges distales y talla baja. Las principales características radiológicas son las calcificaciones puntiformes en los cartílagos de las epífisis (Curry *et al.*, 1984; Brunetti-Pierri *et al.*, 2003; Langlois *et al.*, 2009). En algunos casos se presenta con letalidad temprana por trastornos respiratorios severos secundarios a las alteraciones del desarrollo de la vía área superior con obstrucción nasal y laringomalacia (Brunetti-Pierri *et al.*, 2003).

El síndrome es causado por la deleción intersticial del brazo corto del cromosoma X con compromiso de los genes *STS* (Xp22.31) y *ARSE* (Xp22.33). El gen *ARSE* mide aproximadamente 29 kb, tiene 12 exones que codifican una proteína de 614

aminoácidos denominada ARSE (arilsulfatasa E). Se expresa principalmente en el páncreas, el hígado y el riñón. Pertenece a la familia de las sulfatasas que hidrolizan las uniones ester-sulfato de los glicosaminoglicanos, los sulfolípidos, los sulfatos esteroideos y otros compuestos. La ARSE tiene gran similitud con la sulfatasa esteroidea pero no tiene actividad con los sulfatos esteroideos y se desconoce su sustrato fisiológico. Se considera que es esencial para la correcta composición del cartílago y de la matriz ósea durante el desarrollo (Faustino and Cooper, 2003).

2) SÍNDROME IFAP / BRESHECK

El síndrome IFAP, OMIM #308205, es un trastorno oculocutáneo recesivo ligado al cromosoma X que presenta la triada clásica de ictiosis folicular, atríquia (alopecia total incluyendo cejas y pestañas) y fotofobia. La alopecia y la ictiosis están presentes desde el nacimiento y pueden presentarse con grados variables de membrana colodión y fotofobia intensa causada por una vascularización corneal progresiva, cicatricial y formación de ulceras superficiales que conllevan a la disminución de la visión y la ceguera en los lactantes o en la infancia temprana (Traboulsi *et al.*, 2004).

Otras características son la queilitis angular recurrente, la formación de pápulas y las placas disqueratósicas en áreas extensoras de las extremidades y en el cuero cabelludo, los eczemas atópicos y las placas psoriasiformes, las uñas distróficas, la hipohidrosis, la talla baja, el déficit cognitivo y las convulsiones en los primeros años de vida (Eramo *et al.*, 1985; Megarbane and Megarbane, 2011). El cuadro clínico puede presentarse desde formas leves de la triada hasta manifestaciones severas con defectos graves de discapacidad intelectual y del desarrollo psicomotor, e incluso, la muerte temprana (Oeffner *et al.*, 2009). Las mujeres portadoras pueden desarrollar alguna de las características clínicas (Megarbane and Megarbane, 2011).

El síndrome de BRESHECK, OMIM #308205, se caracteriza por múltiples malformaciones congénitas como las anomalías cerebrales, oculares, auditivas y renales, discapacidad intelectual, displasia ectodérmica, deformidades esqueléticas, paladar hendido y/o criptorquidia con o sin enfermedad de Hirschsprung (Naiki *et al.*,

2012). Los hallazgos ultraestructurales en la piel no son específicos. Se ha reportado obstrucción folicular con epidermis infundibular acantósica e hipoplasia pilosebácea (Kamo *et al.*, 2011; Megarbane and Megarbane, 2011).

El síndrome IFAP / BRESHECK es causado por mutaciones en el gen *MBTPS2* (Xq22.11) (Oeffner *et al.*, 2009; Naiki *et al.*, 2012). El gen *MBTPS2* mide aproximadamente 45 kb, tiene 11 exones que codifican una proteína de 519 aminoácidos denominada MBTPS2 (proteasa del factor de transcripción del sitio-2 de unión a membrana). Se expresa en una gran cantidad de tejidos. Esta enzima es una metaloproteinasa de zinc intramembrana requerida para la proteólisis de proteínas de unión al elemento regulador del esterol (SREBPs) en el sitio 2 intramembranoso. Los SREBPs son factores de transcripción unidos a la membrana del retículo endoplasmático y de la envoltura nuclear que activan los genes que regulan el metabolismo del colesterol y la capacidad de respuesta al estrés del retículo endoplasmático (Rawson *et al.*, 1997).

La severidad clínica se relaciona con la actividad enzimática residual de la proteasa MBTPS2 mutada. En los casos leves se evidencia una actividad enzimática residual de aproximadamente un 80% y en los casos severos de un 15% (Oeffner *et al.*, 2009; Naiki *et al.*, 2012). En los casos muy severos de déficit enzimático se correlaciona con el síndrome de BRESHECK (Naiki *et al.*, 2012).

3) CONDRODISPLASIA PUNTACTA DOMINANTE LIGADA AL X TIPO 2 (SÍNDROME CONRADI-HUNERMANN-HAPPLE).

La condrodisplasia puntacta dominante ligada al X 2 (CDPX2), OMIM #302960, se caracteriza por anomalías esqueléticas, cutáneas y oculares. Se presentan calcificaciones puntiformes de los cartílagos epifisiarios distróficos, principalmente en la columna vertebral, la pelvis y los huesos largos y en algunos otros cartílagos como la laringe. Se observa acortamiento rizomélico asimétrico de las extremidades, escoliosis, defectos craneofaciales y talla baja.

Las lesiones en la piel se inician en la mayoría de los casos como placas escamosas eritematosas que siguen las líneas de Blaschko (estas líneas representan un perfil de

desarrollo no-aleatorio de la piel dado por la migración y la proliferación de las células del ectodermo) que desvanecen en las primeras semanas de vida. Se encuentran igualmente lesiones pigmentarias, la atrofodermia folicular (queratosis y atrofias lineales o en parches), el pelo grueso sin brillo, las áreas de alopecia y las cataratas son frecuentes (Derry *et al.*, 1999; Kelley *et al.*, 1999; Happle, 1979; Canueto *et al.*, 2012). En algunos casos hay malformaciones renales, cardiacas y del sistema nervioso central (Herman, 2000).

Esta enfermedad tiene herencia dominante ligada al X y todas las mujeres presentan las características clínicas. Se considera letal en el hombre hemicigoto (Kelley *et al.*, 1999; Derry *et al.*, 1999; Happle, 1979). Existe una varianza fenotípica entre los afectados de una misma familia (Herman, 2000; Canueto *et al.*, 2012). Los hallazgos ultraestruturales en la piel son inespecíficos como por ejemplo la hiperqueratosis, las láminas ortoqueratósicas, las dilataciones de unidades pilosebáseas y las calcificaciones distróficas en el estrato córneo. La epidermis presenta acantosis leve y la capa granular es normal (Hoang *et al.*, 2004).

La CDPX2 es causada por mutaciones en el gen *EBP* (Xp11.23) (Derry *et al.*, 1999; Braverman *et al.*, 1999). Dos tercios de los casos son por mutaciones *de novo* (Canueto *et al.*, 2012). El gen *EBP* mide aproximadamente 7 kb, tiene 5 exones que codifican una proteína de 230 aminoácidos denominada proteína de unión a emopamil (3-betahidroxiesteroide-delta-8,delta-7-isomerasa). Se expresa en varios tejidos y se localiza en la membrana del retículo endoplasmático. Esta enzima cataliza la conversión de los delta-8-esteroles intermedios a sus correspondientes delta-7-isómeros en la vía de síntesis del colesterol y de la vitamina D (Paik *et al.*, 1986; Derry *et al.*, 1999). La pérdida de función o la deficiencia de esta enzima conduce a la elevación en plasma y en los tejidos de la 8-dehidrocolesterol y de la 8(9)-colestenol (Kelley *et al.*, 1999).

ii. ICTIOSIS AUTOSÓMICAS SINDROMÁTICAS

Las ictiosis autosómicas sindromáticas se clasifican en cuatro grupos según los signos extracutáneos afectados. A continuación se describirá una forma de ictiosis de cada uno de estos grupos. Las otras formas de ictiosis autosómicas sindromáticas por su gran

extensión no se tendrán en cuenta en este escrito.

1) ICTIOSIS AUTOSÓMICAS SINDROMÁTICAS ASOCIADAS A TRASTORNOS DEL PELO

a) Síndrome Netherton

El síndrome Netherton, OMIM #26500, fue descrito por el Dr. Netherton en 1958 (Netherton, 1958). Se caracteriza por ictiosis lineal circunfleja (descamaciones serpintiginosas con bordes dobles) o por ictiosis laminar, tricorrexis invaginata bambú (pelo en cabello invaginado), síntomas atópicos 0 e hiperinmunoglobulinemia E (IgE >1000 IU/ml) (Smith *et al.*, 1995). La dermatitis atópica y la eritrodermia generalizada con descamaciones finas, largas y de color blanco están presentes desde el nacimiento. Con la edad la eritrodermia disminuve y se instaura el fenotipo de ictiosis lineal circunfleja generalizada que puede comprometer las regiones palmo-plantares. El cabello es corto, frágil y quebradizo, la tricorrexis invaginata, la pili torti (cabello torcido) y la tricorrexis nodosa (cabello fracturado) se exhiben hacia el año de edad. La alopecia y las anormalidades en la implantación del cabello son frecuentes (Smith *et al.*, 1995; Oji et al., 2010).

La diátesis atópica severa (tendencia a desarrollar eczema, asma y rinitis alérgica por hiperreactividad anormal a irritantes y alérgenos) se asocia a prurito severo, eosinofília e hiperinmunoblobulinemia E. Los pacientes son propensos a sufrir infecciones bacterianas y virales en la piel con alta tasa de mortalidad neonatal por deshidratación hipernatrémica, sepsis y trastornos del desarrollo (Smith *et al.*, 1995; Chavanas *et al.*, 2000; Oji *et al.*, 2010). Los hallazgos ultraestructurales en la piel no son específicos. La ausencia de las capas córnea y de la granulosa, la hiperqueratosis y la paraqueratosis (el corneocito conserva un núcleo picnótico), las fisuras profundas intercorneales y la disminución de los corneodesmosomas han sido reportados (Smith *et al.*, 1995; Oji *et al.*, 2010).

El síndrome Netherton es una rara enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen SPINK5 (5q32) (Chavanas et al., 2000). El gen SPINK5

mide aproximadamente 73 kb, tiene 34 exones que codifican una proteína de 1094 aminoácidos denominada SPINK5 (Inhibidor de proteasa serina Kazal tipo 5) (Chavanas *et al.*, 2000). Se expresa principalmente en el timo, el estrato córneo de la piel y en otros epitelios y glándulas (Magert *et al.*, 1999). SPINK5 inhibe principalmente a las calicreínas KLK5, KLK7, KLK14, a la CASP14 y a la tripsina (Deraison *et al.*, 2007; Bennett *et al.*, 2010; Magert *et al.*, 1999). La deficiencia de SPINK5 conduce a la escisión anormal de los desmosomas de la capa granular superior de la epidermis por degradación de la desmogleina 1 secundaria a la hiperactividad de las KLK5 y KLK7 interrumpiendo la función normal de barrera de la piel (Yang *et al.*, 2004).

2) ICTIOSIS AUTOSÓMICAS SINDROMÁTICAS ASOCIADAS A TRASTORNOS NEUROLÓGICOS

a) Síndrome Sjögren-Larsson (SLS)

Fue descrito por los médicos Sjögren y Larsson con la triada de discapacidad intelectual, diplejía o tetraplejia espástica e ictiosis congénita con un patrón de herencia autosómico recesivo (Sjogren and Larsson, 1957). El síndrome SLS, OMIM #270200, es una trastorno neurocutáneo secundario a un error innato del metabolismo de los lípidos. La eritrodermia generalizada se presenta en el neonato y progresa a ictiosis hiperqueratósica generalizada con compromiso de las áreas de flexión y palmo-plantares. Las descamaciones son finas y de color café o gris oscura. El prurito es severo con áreas de liquenificación y lesiones por rascado. La hipohidrosis y la intolerancia al calor son frecuentes (Fuijkschot *et al.*, 2012; Oji *et al.*, 2010).

Las alteraciones neurológicas se presentan desde la infancia temprana con un retraso del desarrollo psicomotor. En algunos casos los pacientes pueden caminar con o sin apoyo con posterior deterioro progresivo que inicia con una paresia espástica bilateral de predominio en miembros inferiores, disartria pseudobulbar, retraso del desarrollo del lenguaje, discapacidad intelectual y en un 40% de los casos se presentan convulsiones (Fuijkschot *et al.*, 2012; Oji *et al.*, 2010;

Fuijkschot *et al.*, 2009; Rizzo, 1999). La disminución de la agudeza visual y la fotofobia son causados por la distrofia macular cristalina secundaria al depósito anormal de lípidos en la capa interna plexiforme y en la capa celular ganglionar perimacular de la retina. La degeneración foveal quística y microquística se han descrito (Fuijkschot *et al.*, 2008). Otros signos menos frecuentes son la microcefalia, la estatura baja, la neuropatía periférica, los dientes diastasados, la hipoplasia del esmalte dental y el hipertelorismo.

En la RM cerebral se evidencian alteraciones leves o moderadas de la sustancia blanca periventricular hacia el segundo o tercer año de edad, la mielinización es lenta y después de los diez años de edad se observa atrofia cerebral leve. La espectroscopia de resonancia magnética de protones (H-MRS) muestra cambios moderados de metabolitos cerebrales por aumento de la colina, la creatina y el mioinositol. El N-acetil aspartato y la glutamina/glutamato son normales. Lo anterior evidencia gliosis de la sustancia blanca sin pérdida axonal significativa. En la MRS un hallazgo frecuente son las anormalidades en los espectros de 1.3 y 0.8 ppm en la sustancia blanca cerebral sin alteraciones en los espectros de la sustancia gris (Willemsen *et al.*, 2004). En la sangre hay una elevación de alcoholes grasos de cadena larga y en la orina se pueden encontrar metabolitos de los leucotrienos B4 (Fuijkschot *et al.*, 2012). Los hallazgos ultraestructurales en la piel no son específicos. Los cuerpos laminares son anormales, hay vacuolas lipídicas citoplasmáticas y se evidencia una separación de las capas laminar y no-laminar (Oji *et al.*, 2010).

El síndrome de SLS tiene herencia autosómica recesiva y es causado por mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas en el gen *ALDH3A2* (17p11.2) (De Laurenzi *et al.*, 1996; Sillen *et al.*, 1998). El gen *ALDH3A2* mide aproximadamente 29 kb, tiene 10 exones que codifican una proteína de 485 aminoácidos denominada FALDH (aldehído graso deshidrogenasa) (De Laurenzi *et al.*, 1996). Se expresa en varios tejidos como en la epidermis, los epitelios, las glándulas, el sistema nervioso central y el músculo cardiaco. FALDH cataliza la oxidación de los aldehídos alifáticos a ácidos grasos y también actúa en un paso intermedio en la vía de la degradación de la esfingosina 1-fosfato (S1P) a

glicerolípidos (Nakahara *et al.*, 2012). El diagnóstico se realiza por confirmación del déficit enzimático en cultivos de fibroblastos de la piel o en leucocitos PMN de sangre periférica.

3) ICTIOSIS AUTOSÓMICAS SINDROMÁTICAS ASOCIADAS A ENFERMEDADES LETALES

a) Enfermedad de Gaucher tipo 2

La enfermedad de Gaucher es la disfunción más común de almacenamiento lisosomal. El primer caso fue reportado por el dermatólogo francés Philippe Charles Ernest Gaucher en su tesis doctoral (Gaucher, 1882). La presentación más frecuente es la esplenomegalia y/o la trombocitopenia. Puede acompañarse de alteraciones de las pruebas de función hepática con elevación de la fosfatasa ácida sérica, dolor óseo, fracturas patológicas, necrosis avasculares, osteopenia e hipertensión pulmonar. En algunos casos se asocia con formas neuropáticas por apraxia ocular, discapacidad intelectual, demencia, trastornos de la conducta, movimientos coreoatetósicos, calambres, hipertonías y apneas. Por las características clínicas heterogéneas se clasifica en tres tipos: la enfermedad de Gaucher tipo 1 es la forma más frecuente (incidencia de 1:60.000 y en la población judía ashkenazi de 1:850 a 1:950). Los signos clínicos no incluye características neuropáticas (Beutler *et al.*, 1993). La enfermedad de Gaucher tipo 3 se caracteriza por una enfermedad neuropática crónica.

La enfermedad de Gaucher tipo 2, OMIM #230900, es la menos frecuente (<1:1.000.000) y se caracteriza por complicaciones neurológicas severas agudas por espasticidad y parálisis de la musculatura ocular, caquexia, contracturas articulares. La muerte se presenta hacia los 2 años de edad por neumonía u otras infecciones. En las formas más severas se presenta con ictiosis congénita o incluso hidrops fetalis y muerte perinatal (Stone *et al.*, 2000a). En el neonato se evidencia eritrodermia ictiosiforme generalizada y rara vez membrana colodión. Las descamaciones son finas y puede comprometer regiones palmo-plantares y áreas de flexión que desaparecen en unas pocas semanas. La hipohidrosis y la

dismorfia facial son frecuentes (Tayebi *et al.*, 1998; Oji *et al.*, 2010). Los hallazgos ultraestructurales en la piel no son específicos. La bicapa laminar extracelular epidérmica es anormal con un aumento de la proporción de glicosilceramida epidérmica/ceramidas e incrementos de la pérdida de agua transepidérmica han sido reportados (Holleran *et al.*, 1994; Sidransky *et al.*, 1996).

La enfermedad de Gaucher tipo 2 tiene herencia autosómica recesiva y es causada por mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas en el gen *GBA* (1q22) (Ginns *et al.*, 1984; Choy and Wei, 1995).

El gen *GBA* mide aproximadamente 10 kb, tiene 12 exones que codifican una proteína de 536 aminoácidos denominada GBA (glucosilceramidasa) y se expresa en numerosos tejidos. Su función es catalizar la hidrolisis de la D-glucosil-N-acilesfingosina a N-acilesfingosina más D-glucosa en la vía de hidrolisis de la glucosilceramidas para formar ceramidas lisosomales (Kitatani *et al.*, 2009). Existe una pobre correlación genotipo-fenotipo y se han descrito al menos 33 mutaciones distintas para el tipo 2 (Stone *et al.*, 2000b).

El abordaje de los pacientes es interdisciplinario. La terapia de reemplazo enzimático es segura y eficaz principalmente en el tipo 1 debido a que se logra la estabilización y la disminución de la progresión de la afectación visceral y es poco efectiva en las manifestaciones neurológicas para los tipos 2 y 3 debido a que no atraviesa la barrera hemato-encefálica (Vellodi *et al.*, 2009). Otros tratamiento específicos son la terapia de reducción de sustrato (inhibición de la síntesis de glucosilceramidas), la terapia farmacológica de chaperonas, la terapia génica y el transplante de médula ósea (Cassinerio *et al.*, 2014).

4) ICTIOSIS AUTOSÓMICAS SINDROMÁTICAS ASOCIADAS A OTROS SIGNOS

a) Síndrome KID (queratodermia, ictiosis y sordera)

El síndrome KID, OMIM #148210, es una rara disfunción congénita autosómica dominante que afecta los tejidos de origen ectodérmico como son la epidermis, la

cóclea y la córnea. El primer caso fue descrito por el dermatólogo Frederick Burns en un paciente con eritrodermia hiperqueratósica difusa, hipoacusia neurosensorial y lesiones de membranas inusuales en los ojos, orejas y en las mucosas oral y nasal (Burns, 1915). Desde el año 1981 se utiliza el acrónimo KID que describe la hiperqueratosis difusa con predominio en las palmas y la región de los sóleos, la ictiosis y la sordera neurosensorial bilateral. Otras características variables son las alteraciones en la córnea (queratitis vascularizantes, abrasiones corneales, leucomas y fotofobia), en las uñas (distrófías, hipoplásias o leuconíquias), en el cabello (quebradizo, seco, delgado, corto, alopecia cicatricial e incluso atríquia) y alteraciones en la dentición. Las alteraciones cognitivas solo se presentan en algunos casos (Skinner *et al.*, 1981; Hazen *et al.*, 1989).

La ictiosis se presenta en el primer año de vida en forma de eritrodermia ictiosiforme generalizada o localizada que evoluciona al desarrollo de lesiones en placas verrugosas y áreas hiperqueratósicas bien delimitadas de color café, amarillo o gris. En algunos casos son serpentinosas o en forma de ictiosis hystrix. La agenesia del cuerpo calloso puede presentarse. Los casos neonatales severos presentan alta mortalidad. Los hallazgos ultraestructurales de la piel no son específicos. Se han reportado hiperqueratosis, epidermis ondulante o papilomatosa y alteraciones en los tonofilamentos y en la capa granular (Skinner *et al.*, 1981; Oji *et al.*, 2010).

El síndrome KID es causado por mutaciones heterocigotas en el gen *GJB2* (13q12.11) (Richard *et al.*, 2002). El gen *GJB2* mide aproximadamente 2 kb, es monoexónico y codifica para una proteína de 226 aminoácidos denominada GJB2 (proteína de unión Gap beta-2 también conocida como conexina 26). Se expresa en las células glandulares del tracto gastrointestinal, la vesícula biliar, el seno, el sistema urinario, el testículo, las células basales de las glándulas prostáticas, la capa basal del epitelio escamoso y en el oído interno. La proteína GJB2 pertenece a la familia de las conexinas que forman canales intercelulares en las uniones Gap al ensamblarse varias conexinas similiares (homoméricas) o diferentes (heteroméricas) con el objetivo de controlar el intercambio de iones pequeños, metabolitos y moléculas de señalización intercelular (Bevans *et al.*, 1998).

B. ICTIOSIS NO-SINDROMÁTICAS

Las ictiosis autosómicas no-sindromáticas se clasifican en cuatro grupos según el modo de herencia, las características clínicas y la severidad de las lesiones de la piel. A continuación se describirán las formas más representativas de cada uno de estos grupos.

i. ICTIOSIS COMUNES

1) ICTIOSIS VULGAR

La ictiosis vulgar, OMIM #146700, es la forma congénita más frecuente con una prevalencia de 1:250-1000 (Bale and Doyle, 1994; Oji *et al.*, 2010). La ictiosis se presenta en el primer año de vida con descamaciones finas y distribución generalizada de color gris o blanco, no compromete los pliegues poplíteos y antecubitales, el cuero cabelludo y el rostro. En las áreas palmo-plantares y sóleos hay hiperlinearidad marcada. Los síntomas atópicos se presentan en un 50% al 60% de los casos por dermatitis atópica leve (eczemas y prurito) y conjuntivitis alérgica. Otros síntomas son la queratosis pilaris, la hipohidrosis y el prurito. No se asocia a eritrodermia (Oji *et al.*, 2009; Akiyama, 2010). Los hallazgos ultraestructurales en la piel se caracterizan por disminución o ausencia de gránulos de queratohialina. Las técnicas de inmunohistoquímica para filagrina son negativas o están disminuidas y se presenta un estrato granuloso rudimentario o disminuido (Sybert *et al.*, 1985; Oji *et al.*, 2010).

La ictiosis vulgar tiene una herencia autosómica semi-dominante causada por mutaciones heterocigotas u homocigotas en el gen *FLG* (1q21.3) (Smith *et al.*, 2006). El gen *FLG* mide aproximadamente 23 kb, contiene 3 exones que codifican para una proteína de 4061 aminoácidos denominada FLG (filagrina). Los pacientes portadores de mutaciones heterocigotos tienen una deficiencia parcial de filagrina (*FLG*^{+/-}) y presentan un fenotipo leve mientras que los pacientes portadores de mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas tienen una deficiencia completa de filagrina (*FLG*^{-/-}) un fenotipo severo. Esta condición es predisponente para la dermatitis atópica y condiciones alérgicas secundarias (Irvine and McLean, 2006; Irvine, 2007; Oji *et al.*, 2009). La filagrina se expresa en la epidermis y en algunos otros epitelios (Presland *et al.*, 1992). La función principal de la filagrina es la formación del estrato córneo durante la diferenciación epidérmica (Dale *et al.*, 1985; Steinert *et al.*, 1981). En los gránulos de queratohialina en la capa granular de la epidermis se sintetizan los polímeros de profilagrina en un estado fosforilado. En la diferenciación terminal de las células granulares, la profilagrina es desfosforilada y se escinde por proteólisis en monómeros de filagrina que se agregan al citoesqueleto de queratina. Se presenta además, el colapso de las células granulares en escamas planas por la intensa reticulación de las proteínas estructurales, de las proteínas de unión y de otros componentes de las membranas (Candi *et al.*, 2005).

2) ICTIOSIS RECESIVA LIGADA AL X NO-SINDROMÁTICA

La ictiosis recesiva ligada al X (XLI), OMIM #300747, tiene una prevalencia de 1:2000-6000 (Jobsis *et al.*, 1980; Lykkesfeldt *et al.*, 1984; Oji *et al.*, 2010). En los hombres afectados en los primeros 6 meses de vida pueden presentarse membrana colodión leve o descamación y eritema generalizado. La ictiosis mejora con la edad y las descamaciones son finas, largas y gruesas, de color café o gris con distribución generalizada que comprometen principalmente el rostro en partes laterales, el cuello y las axilas sin eritema. No compromete las fosas antecubitales o poplíteas, las palmas, plantas y el rostro medio y por lo general el cuero cabelludo es normal. La hipohidrosis puede estar presente (Kubilus *et al.*, 1979; Oji *et al.*, 2010; Elias *et al.*, 2014).

En los embarazos de fetos con XLI se presenta el síndrome de deficiencia de sulfatasa placentaria que se manifiesta por falta de trabajo de parto, defecto en la maduración cervical y pobre respuesta a la oxitocina exógena. Este síndrome puede sospecharse por niveles bajos de estriol en sangre y orina materna dado por la falta de desulfatación del sulfato de estrógeno que conlleva a un aumento de la excreción urinaria materna de androstenetriol, 16 α -hidroxi-dehidroepiandrosterona y la 16 α -hidroxi-pregnenolona en el tercer trimestre del embarazo (Lykkesfeldt *et al.*, 1984). Los hallazgos ultraestructurales de la piel no son específicos. La hiperqueratosis es moderada con acantosis leve y acentuación parcial de la capa granulosa (Elias *et al.*, 2014). Se

observa la acumulación de sulfatos de colesterol en la epidermis o en la sangre y se confirma el diagnóstico con pruebas de actividad enzimática de la sulfatasa esteroidea en el estrato córneo o en los cultivos de leucocitos o de fibroblastos (Kubilus *et al.*, 1979; Jobsis *et al.*, 1980; Elias *et al.*, 1984; Elias *et al.*, 2014).

La XLI es causada por mutaciones en el gen en el gen *STS* (Xp22.31) (Basler *et al.*, 1992). El gen *STS* mide aproximadamente 135 kb, contiene 10 exones que codifican para una proteína de 583 aminoácidos denominada STS o SSase (Sulfatasa esteroidea microsomal). Se expresa en células trofoblásticas, en células neuronales y en otros tipos de tejidos epiteliales. El 90% de los casos de XLI se produce por deleciones intersticiales que conducen a una deficiencia de la STS (Ballabio *et al.*, 1987). Esta enzima tiene una función fundamental en la desulfatación del sulfato de colesterol en un paso crítico en el metabolismo de la piel y está involucrada en la producción placentaria de estriol durante las últimas semanas de la gestación (Webster *et al.*, 1978a).

ii. ICTIOSIS QUERATINOPÁTICAS

Las ictiosis queratinopáticas agrupan las formas causadas por mutaciones de los genes de las queratinas cutáneas. Estos trastornos se caracterizan por citolisis, formación de ampollas intra-epidermicas, hiperqueratosis y acumulación de filamentos de queratina en los tejidos afectados (Oji *et al.*, 2010). A continuación se describirá la forma más representativa de este grupo.

1) ICTIOSIS EPIDERMOLÍTICA

La ictiosis epidermolítica (EI), OMIM #113800, fue descrita histológicamente por Nikolski (Nikolski, 1897) y en 1902 fue descrita clínicamente por Brocq (Brocq, 1902) y se le denominó inicialmente como eritrodermia ictiosiforme congénica bulosa de Brocq. La EI es una forma de ictiosis congénita rara (con una prevalencia de 1:200.000 – 350.000 personas) (Bale and Doyle, 1994; Bygum *et al.*, 2013). La eritrodermia generalizada con formación de ampollas severas, erosiones eritematosas y desprendimiento de la piel con traumas mínimos se presentan desde el nacimiento. Las úlceras se forman en áreas de flexión de la piel. Las erosiones eritematosas al sanar rápidamente son remplazadas por descamaciones hiperqueratósicas en los primeros meses y a lo largo de la vida se presentan episodios recurrentes de ampollas. La formación de placas de hiperqueratosis verrugosas compromete principalmente áreas de flexión e intertriginosas. El cuero cabelludo y el cuello pueden estar comprometidos (Mondal *et al.*, 2011). Las hiperqueratosis palmo-plantares se presentan en algunos pacientes (Oji *et al.*, 2010). Estos pacientes tienen alto riesgo de desarrollar desequilibrios electrolíticos, infecciones graves, sepsis e incluso la muerte neonatal (Oji *et al.*, 2010; Kurosawa *et al.*, 2013). Los hallazgos ultraestructurales de la piel lesionada evidencian hiperqueratosis, acantosis, aglutinación de tonofilamentos de queratina en células suprabasales, vacuolización intracelular y ampollas intraepiteliales (Frost and Van Scott, 1966; Oji *et al.*, 2010; Bygum *et al.*, 2013).

La El tiene una herencia dominante causada por mutaciones heterocigotas en los genes *KRT1* y *KRT10*. Sin embargo, hay reportes de herencia autosómica recesiva por mutaciones en el gen *KRT10*, por lo cual, recientes publicaciones han postulado que tiene herencia semi-dominante (Muller *et al.*, 2006; Nousbeck *et al.*, 2013; Virtanen *et al.*, 2003). En un 50% de los casos se presenta por mutaciones *de novo* (Williams and Elias, 1987; Ammirati and Mallory, 1998; Shimomura *et al.*, 2006).

El gen *KRT1* (12q13.13) mide aproximadamente 5 kb, contiene 9 exones que codifican para una proteína de 644 aminoácidos denominada KRT1 (queratina tipo II citoesquelética 1), se expresa en diferentes tejidos epiteliales escamosos y tejido especifico de la piel en la diferenciación epidérmica. Una de las funciones de la KRT1 es la regulación de la actividad de varias quinasas como la PKC y SRC en la vía de unión a la integrina beta-1 y del receptor de la PKC activado (RACK1/GNB2L1) (Chuang and Huang, 2007). Además, puede formar complejos con la C1QBP y tiene una alta afinidad por el receptor para la kininogen-1/HMWK (Pixley *et al.*, 2011).

El gen *KRT10* (17q21.2) mide aproximadamente 4 kb, contiene 8 exones que codifican para una proteína de 584 aminoácidos denominada KRT10 (queratina tipo I citoesquelética 10). Se expresa selectivamente en el epitelio escamoso en la piel. La KRT10 es un constituyente estructural de la epidermis e interactúa con la KRT1.

iii. ICTIOSIS CONGÉNITAS AUTOSÓMICAS RECESIVAS

Las ictiosis congénitas autosómicas recesivas (ARCI) no-sindromáticas reúnen un grupo de enfermedades con herencia autosómica recesiva sin compromiso extracutáneo. La prevalencia del grupo de ARCI se estima entre 7.2-16.2 casos por millón en la población general (Hernandez-Martin *et al.*, 2012; Dreyfus *et al.*, 2014). Este grupo se divide en formas mayores y en formas menores según la severidad y la extensión de las lesiones. A continuación se abordarán las formas mayores.

1) FORMAS MAYORES

a) Ictiosis arlequín

La ictiosis arlequín (HI), OMIM #242500, es la forma más severa de las ictiosis congénitas en el neonato. El recién nacido se encuentra cubierto de gruesas membranas colodión severas con aspecto de placas dérmicas escamosas de color gris o amarillo separadas por fisuras profundas. La piel se asemeja a una armadura de arlequín en todo el cuerpo. La hiperqueratosis cutánea es severa lo que favorece el ectropión y el eclabium, la anteversión de las fosas nasales, la ausencia de pliegues y sinéquias auriculares. Las extremidades presentan bandas y contracturas cutáneas que impiden la movilidad, las bandas en los dedos pueden originar necrosis o autoamputaciones digitales. La barrera de la piel se encuentra severamente comprometida con un alto riesgo de presentar deshidratación, trastorno de la termorregulación, sepsis y mortalidad neonatal temprana (Rajpopat *et al.*, 2011; Oji *et al.*, 2010).

Otros síntomas y signos frecuentes son la hipohidrosis, la intolerancia al calor y al frío, el prurito, el pobre crecimiento del cabello con alopecia cicatricial, uñas pequeñas, gruesas y dismorficas, las alteraciones de la deglución, la desnutrición, la talla baja y el déficit nutricional por presentar alto gasto calórico (Rajpopat *et al.*, 2011).

Los lactantes que sobreviven presentan hiperqueratodermia palmo-plantar y con la

edad pueden desarrollar un fenotipo de eritrodermia ictiosiforme congénita o de ictiosis laminar. Los hallazgos ultraestructurales de la piel se han descrito cuerpos laminares vesiculares fantasmas y ausencia de las estructuras laminares en el estrato córneo (Oji *et al.*, 2010).

Más del 90% de los casos de HI es causado por mutaciones homocigotas o heterocigotos compuestas en el gen *ABCA12* (2q35) (Rajpopat *et al.*, 2011; Richard and Bale, 1993-2014). El gen *ABCA12* mide aproximadamente 206 kb, contiene 53 exones que codifican para una proteína de 2595 aminoácidos denominada ABCA12 (cassette de unión al ATP - subfamilia A, miembro 12). Se expresa principalmente en el estómago, la placenta, los testículos, las glándulas mamarias, las trompas de Falopio, el riñón, el pulmón, las glándulas endocrinas, el tracto gastrointestinal, en el cerebro fetal y en otros tejidos (Annilo *et al.*, 2002). ABCA12 se localiza en los gránulos laminares de la epidermis superficial del queratinocito y su función principal es transportar las glucosilceramidas hacia el interior del gránulo laminar. La fusión de los gránulos laminares con la membrana celular conduce a la exocitosis de las glucosilceramidas, de otras sustancias y de enzimas para la formación de la lámina lipídica extracelular del estrato córneo (Akiyama *et al.*, 2005).

b) Ictiosis laminar

La ictiosis laminar (LI) se caracteriza por descamaciones laminares extensas y gruesas generalizadas de color marrón o gris oscuro. La mayoría de los pacientes nacen con un fenotipo de bebé colodión, ectropión y eclabium. La eritrodermia es poco frecuente y los neonatos presentan alto riesgo de mortalidad. El fenotipo evoluciona a la forma de LI desde la lactancia temprana. La queratodermia palmoplantar y la hipohidrosis son frecuentes. Las deformidades en las uñas y la alopecia cicatricial se presentan en algunos pacientes. Las características de la LI persisten a lo largo de la vida y puede mejorar con la edad (Williams and Elias, 1985; Akiyama *et al.*, 2003a; Akiyama *et al.*, 2003b; Oji *et al.*, 2010). Los hallazgos ultraestructurales de la piel incluyen cristales de colesterol, vacuolas de lípidos en células de la córnea, malformación de la envoltura celular cornificada y
gránulos laminares anormales (Niemi et al., 1991; Ghadially et al., 1992).

La LI tiene una herencia autosómica recesiva con heterogeneidad genética y en un 80% al 85% de los casos son por mutaciones en el gen *TGM1* (Pigg *et al.*, 1998; Rodriguez-Pazos *et al.*, 2011). El gen *TGM1* por su importancia en este trabajo se abordará más adelante en un capítulo adicional. Los otros genes serán descritos en el capítulo de la "heterogeneidad genética de las ARCI".

c) Eritrodermia ictiosiforme congénita

Anteriormente se conocía como eritrodermia ictiosiforme congénita no bulosa (NBCIE) y desde el año 2009 con la clasificación de Sorèze, se utiliza el nombre de eritrodermia ictiosiforme congénita (CIE). Se caracteriza por descamación severa generalizada y eritrodermia sin formación de vesículas. Desde el nacimiento se presenta con eritrodermia generalizada o con un fenotipo de bebé colodión y al deprenderse las membranas de la piel se instaura la eritrodermia generalizada pronunciada con finas escamas de color blanco o gris. El eclabium y el ectropión están presentes. Las palmas y las manos son hiperqueratósicas. La hipohidrosis es moderada o severa. La eritrodermia y las descamaciones persisten a lo largo de la vida y pueden mejorar con la edad (Williams and Elias, 1985; Akiyama *et al.*, 2003a; Oji *et al.*, 2010). Los hallazgos ultraestructurales de la piel no son específicos. Se ha reportado un engrosamiento anormal de la envoltura celular de cornificación, gotas lipídicas y residuos de organelas celulares en la capa córnea (Ghadially *et al.*, 1992).

La CIE tiene herencia autosómica recesiva y heterogeneidad genética con al menos 9 genes identificados hasta la fecha que se abordarán en el siguiente capítulo.

2) HETEROGENEIDAD GENETICA DE LA ARCI

Las causas moleculares de la LI y de la CIE implican los mismos genes. En el año de 1995 las primeras mutaciones causales de las ARCI fueron identificados. Hasta el día de hoy, mutaciones en 9 genes se han asociado a estos trastornos: *TGM1, ALOX12B, ALOXE3, ABCA12, NIPAL4, CYP4F22, LIPN, PNPLA1* y *CERS3* (Huber *et al.*, 1995;

Russell *et al.*, 1995; Jobard *et al.*, 2002; Lefevre *et al.*, 2003; Lefevre *et al.*, 2004; Lefevre *et al.*, 2006; Israeli *et al.*, 2011; Grall *et al.*, 2012; Radner *et al.*, 2013; Eckl *et al.*, 2013).

Las mutaciones en el gen *TGM1* son la causa más frecuente de las ARCI (30%-55% de los casos) (Fischer, 2009; Eckl *et al.*, 2009; Farasat *et al.*, 2009; Rodriguez-Pazos *et al.*, 2011; Israeli *et al.*, 2013). Le siguen en su orden las mutaciones de los genes *ALOX12B* (7-20%), *CYP4F22* (8-10%), *ALOXE3* (5%-10%), *NIPAL4* (5-16%), *ABCA12* (5%) y *LIPN* (5%) (Eckl *et al.*, 2009; Fischer, 2009; Rodriguez-Pazos *et al.*, 2011; Israeli *et al.*, 2013). Las mutaciones en *PNPLA1* y *CERS3* se han descrito en casos aislados (Grall *et al.*, 2012; Radner *et al.*, 2013; Eckl *et al.*, 2013). Existe un locus candidato en el cromosoma 12p11.2-q13 identificado en dos familias israelitas consanguíneas (Mizrachi-Koren *et al.*, 2005; Israeli *et al.*, 2013). Aproximadamente en un 15% al 30% de los casos las causas moleculares aún son desconocidas (Fischer, 2009; Eckl *et al.*, 2009; Israeli *et al.*, 2013).

- El gen *TGM1* por su importancia en esta tesis se analizará en un capítulo adicional. A continuación se abordarán los otros genes asociados a estos trastornos.
- El gen ALOX12B (17p13.1) mide aproximadamente de 15 kb, contiene 15 exones que codifican una proteína de 701 aminoácidos llamada ALOX12B (Araquidonato 12 lipoxigenasa, tipo 12R). Se expresa en las células B, en el folículo piloso y en los queratinocitos (Boeglin *et al.*, 1998). ALOX12B es una enzima dioxigenasa que contiene hierro y cataliza la estéreo peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados libres y esterificados sintetizando varios mediadores lipídicos bioactivos. Principalmente convierte el ácido araquidónico en ácido 12R-hidroperoxieicosatetraenoico y en esteroisomeros menores. En la piel actúa en la vía de la síntesis de la envoltura lipídica de los corneocitos (Zheng *et al.*, 2011; Boeglin *et al.*, 1998).
- El gen ALOXE3 (17p13.1) mide aproximadamente 22 kb, contiene 16 exones que codifican para una proteína de 711 aminoácidos denominada ALOXE3 (Hidroperóxido isomerasa ALOXE3). Se expresa ampliamente en los tejidos de origen neuroectodérmico. Cataliza la isomerización de los hidroperóxidos

derivados del ácido araquidónico y linoléico por la ALOX12B en epoxialcoholes para la producción de los hidroperóxidos de ácidos grasos. En la piel actúa en la vía del linoleato de ceramidas omega-hidroxiacil-esfingosina esterificado para la producción de la epoxicetona en un paso crucial para la conjugación de los ácidos grasos omega-hidroxiceramida de las proteínas de la membrana celular esenciales en la síntesis de los lípidos de los corneocitos y en la formación de la barrera de la piel (Yu *et al.*, 2003; Zheng and Brash, 2010; Zheng *et al.*, 2011).

- El gen *NIPAL4* (5q33.3) mide aproximadamente 14 kb, contiene 6 exones que codifican para una proteína de 466 aminoácidos denominada NIPAL4 (transportadora de magnesio NIPA 4) también conocida como ichthyin. Se expresa en el cerebro, el estómago, el queratinocitos, los leucocitos y en otros tejidos (Lefevre *et al.*, 2004). NIPAL4 pertenece a la familia DUF803, un grupo de proteínas de membrana. NIPAL4 tiene varios dominios transmembrana y se ha propuesto que es una proteína transportadora o un receptor de un ligando aún desconocido.
- El gen CYP4F22 (19p13.12) mide aproximadamente 43 kb, contiene 14 exones que codifican para una proteína de 531 aminoácidos denominada CYP4F22 (citocromo P450 4F22). Se expresa en el esófago, la piel, el intestino delgado, el hígado, el riñón y otros tejidos. Pertenece a la superfamilia del citocromo P450, factores que actúan como oxidasas terminales en la cadena de transferencia de electrones de varias sustancias o compuestos o como monooxigenasas implicadas en el metabolismo de una gran cantidad de compuestos exógenos y endógenos (Nelson *et al.*, 2004). La CYP4F22 se localiza a nivel citoplasmático y es altamente homólogo al leucotrieno B4-ω-hidroxylasa (CYP4F2). Lefevre et al., propone que la CYP4F22 podría catalizar la 20-hidroxilación de la trioxilina A3 por la vía del 12(R)-lipoxigenasa y que debe ser confirmada experimentalmente (Lefevre *et al.*, 2006).
- El gen *LIPN* (10q23.31) mide aproximadamente 16 kb, contiene 9 exones que codifican para una proteína de 398 aminoácidos denominada LIPN (lipasa N), anteriormente conocido como LIPL4 (proteína con dominio abhidrolasa similar a

la lipasa 4). Se expresa altamente en los queratinocitos en la capa granular de la epidermis y en las neuronas, el riñón, el intestino, los miocitos esqueléticos y cardiacos, los pulmones, en el plasma y en otros tejidos (Israeli *et al.*, 2011). La LIPN pertenece al grupo de las lipasas ácidas epidérmicas conformado por otras dos lipasas ácidas, la LIPK y la LIPM (Toulza *et al.*, 2007). La LIPN tiene una función importante en la maduración del epitelio estratificado y está involucrada en el metabolismo de los lípidos. La función de la LIPN aún es desconocida (Israeli *et al.*, 2011).

- El gen PNPLA1 (6p21.31) mide aproximadamente 65 kb, contiene 8 exones que codifican una proteína de 437 aminoácidos denominada PNPLA1 (proteína con dominio fosfolipasa similar a la patatina 1). Se expresa en las glándulas sudoríparas ecrinas de la piel, la epidermis, las glándulas digestivas, los ductos seminíferos, los riñones y los miocitos (Wilson *et al.*, 2006; Grall *et al.*, 2012). La PNPLA1 pertenece a la familia de proteína PNPLA (Wilson *et al.*, 2006). Esta familia es importante en el metabolismo de lípidos por su actividad aciltransferasa y lipolítica (Kienesberger *et al.*, 2009). PNPLA1 tiene un papel importante en la síntesis o en el remodelamiento de los glicerofosfolípidos en el metabolismo de la barrera epitelial en los procesos de queratinización y en la diferenciación epitelial terminal (Grall *et al.*, 2012).
- El gen *CERS3* (15q26.3) mide aproximadamente 144 kb, contiene 13 exones que codifican para una proteína de 383 aminoácidos denominada CERS3 (ceramida sintetasa 3), anteriormente conocida como LASS3 (aseguramiento de longevidad homólogo 3). Se expresa en la epidermis y se localiza en la interface del estrato granuloso y el estrato córneo y a nivel citoplasmático y nuclear en otros tejidos (Radner *et al.*, 2013). CERS3 actúa en la vía de la síntesis de ceramidas y cataliza la reacción N-acilación de la (dihidro)esfingosina con Acil-CoAs de cadenas alifáticas largas a muy largas (C18-C28) para la síntesis de las (dihidro)ceramidas de cadenas largas a muy largas. Un paso esencial en la síntesis de las ceramidas y las glucosilceramidas de cadenas largas específicas para el mantenimiento de la homeostasis de los lípidos en la epidermis y en la diferenciación epidérmica

terminal (Mizutani et al., 2006; Jennemann et al., 2012).

• El gen *ABCA12* (2q25) fue descrito previamente en el capítulo de Ictiosis Arlequín.

C. LA FAMILIA DE LAS TRANSGLUTAMINASAS

Las TGM humanas agrupan la *TGM1* (14q11.2), *TGM2* (20q11.23), *TGM3* (20p13), *TGM4* (3p21.31), *TGM5* (15q15.2), *TGM6* (20p13), *TGM7* (15q15.2-q15.3), *F13A1* (6p25.1) y *EPB42* (15q15.2) (Korsgren *et al.*, 1990). Los genes *TGM2-7* y *EPB42* contienen 13 exones mientras que los genes *F13A1* y *TGM1* contienen 15 exones. El exón 9 de las *TGM2-7* y *EPM42* tiene secuencias homólogas con los exones 10 y 11 de los genes *F13A1* y *TGM1*. El exón 1 de la *F13A1* y de la *TGM1* no son codificantes y el exón 2 codifica la región propeptídica amino terminal (Figura 3).



Figura 3. Genes de las TGM humanas y dominios proteicos. Las líneas cortadas indican la codificación de los exones correspondiente a los dominios de la proteína. Dominios de las transglutaminasas: PRO = secuencia pro-peptídica. E- β = Estructura β -Sandwich. CORE = Centro o núcleo catalítico. B β 1 y B β 2 = estructuras barriles β 1 y β 2 respectivamente. Imagen modificada de la publicación de Lorand et al., 2003.

i. EL GEN TGM1

El gen *TGM1* (transglutaminasa 1) se localiza en el cromosoma 14 en el brazo largo en la banda 11.2 (14q11.2), mide 14 kb y tiene 15 exones (NCBI Reference Sequence: NC 000014.9 chromosome 14 reference GRCh38 Primary Assembly; Ensembl:

ENST00000206765). Transcribe un ARNm de 2777 bases nitrogenadas que incluye una región 5'UTR de 124 bases y la región 3'UTR de 198 bases. La región de poliadenilización AATAAA se encuentra a 178 bases posterior al codón de parada (NM_000359.2; ENST00000206765) y traduce una proteína de 817 aminoácidos (NP_000350.1; CCDS9622) denominada transglutaminasa K o proteína de glutamina gamma-glutamiltransferasa K (TGK o TGase K). Esta enzima es conocida con otros nombres como transglutaminasa 1 (TGM1, TGase 1 o TG1) o transglutaminasa epidérmica (ExPASy: EC 2.3.2.13; UniProt: P22735).

1) EXPRESIÓN DE TGM1

La *TGM1* se expresa en el esófago y en menores niveles en la mucosa oral, la vagina, las amígdalas y en la piel. Se expresa en los epitelios escamosos estratificados. La TGM1 se tiñe fuertemente con métodos de inmunohistoquímica en los estratos de la granulosa, el estrato espinoso superior y el estrato córneo (Goldsmith *et al.*, 1974; Parenteau *et al.*, 1986; Thacher and Rice, 1985).

2) LOCALIZACIÓN DE LA PROTEINA TGM1

La TGM1 se localiza en el compartimiento intracelular, anclada en la membrana celular interna (Steinert *et al.*, 1996) y en el citosol se localiza en varias formas solubles (Thacher, 1989; Thacher and Rice, 1985; Chakravarty and Rice, 1989; Chakravarty *et al.*, 1990; Rice *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1995). En la epidermis se encuentra como un zimógeno inactivo de 106 kDa anclada a la membrana celular. Las formas solubles son producidas por proteólisis del zimógeno conduciendo a los fragmentos NH2-terminal de 10 kDa, 67 kDa y 33 KDa COOH-terminal. El fragmento NH2-terminal de 10 kDa, 67 kDa y 33 kDa COOH-terminal. El fragmento NH2-terminal de 10 kDa, 67 kDa y 33 kDa COOH-terminal no tienen actividad enzimática. La formación del complejo 67/33/10 kDa anclado en la membrana celular del queratinocito es la forma con mayor actividad enzimática conocida (Steinert *et al.*, 1996). Las formas solubles con actividad enzimática son las de 106 kDa, de 67 kDa y un complejo activo formado por los fragmentos 67/33 kDa. Estas formas solubles representan únicamente un tercio de la actividad total de la TGM1 en cultivos y en biopsias de queratinocitos epiteliales (Kim *et al.*, 1995).

3) DOMINIOS DE TGM1

La TGM1 consta de 5 dominios: la secuencia pro-peptídica (residuos Met1 a Arg92) que contiene la región de anclaje de membrana de 10 kDa (entre los residuos Asp66 a Leu109). El dominio β -sandwich (Ser94 a Phe246) y el dominio del núcleo catalítico α/β (Asn247 a Arg572) que corresponde al fragmento de 67 kDa. Los dominios barril β 1 (Gly573 a Val688) y barril β 2 (Thr689 a Ala817) que conforman el fragmento de 33 kDa (Boeshans *et al.*, 2007). Los sitios de proteólisis se encuentran en los residuos Gly93 (región NH₂-terminal) y Gly573 (región COOH-terminal) y son clivados por la proteasa Dispasa (*in vitro*) para la liberación de los fragmentos de 10 kDa, 33 kDa y 67 kDa (Kim *et al.*, 1995). Se desconoce si existen otras proteasas que activen la TGM1 *in vivo*.

4) MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LA TGM1

TGM1 es activada por el gradiente de flujo de Ca²⁺ citoplasmático durante las fases de maduración del queratinocito (Sarkar *et al.*, 1957; Clarke *et al.*, 1957; Tu and Bikle, 2013). Los sitios de unión al ión Ca²⁺ en la TGM1 se encuentran en los residuos Trp341, Trp432 y Tyr620 (Boeshans *et al.*, 2007). La interacción de los iones Ca²⁺ con TGM1 producen cambios conformacionales de la estructura terciaria de la enzima al movilizar un *boucle* que permite la apertura de un canal en la superficie de la TGM1 y expone los residuos Trp341 y Trp432 involucrados en los mecanismos de la actividad enzimática en conjunto con los residuos de la triada nuclear catalítica localizados en Cys376, His435 y Asp458 (Ahvazi and Steinert, 2003; Boeshans *et al.*, 2007; Ahvazi *et al.*, 2003).

Otras modificaciones postraduccionales se encuentran en el dominio de anclaje a la membrana por la acilación de ácidos grasos por los ácidos miristoil o palmitoil en la región NH₂-terminal lo que contribuye con el anclaje del zimógeno a la membrana (Chakravarty and Rice, 1989). Adicionalmente, la región NH₂-terminal es rica en prolina, serina y en residuos con carga como la arginina pero sin la presencia de residuos de lisina. Se ha postulado que los residuos serina y arginina pueden ser fosforilados por la proteína C quinasa o por otras quinasas secundarias aún

desconocidas (House *et al.*, 1987; Choi and Toscano, 1988). Estos procesos de fosforilación pueden alterar la interacción entre la enzima y sus sustratos y representar sitios potenciales de regulación fisiológica (Chakravarty *et al.*, 1990).

5) ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA TGM1

La actividad catalítica de la TGM1 es el entrecruzamientos o la reticulación peptídica N ϵ -(γ -glutamil)-lisina entre diferentes sustratos polipeptídicos lo que permite la formación de polímeros proteicos estables e insolubles que contribuyen con la formación de la envoltura de cornificación del queratinocito maduro en el estrato córneo (Goldsmith *et al.*, 1974; Goldsmith and Martin, 1975; Peterson and Wuepper, 1984). El núcleo catalítico contiene la triada catalítica Cys376, His435 y Asp458 y adicionalmente, se requiere de al menos un residuo de triptófano (Trp341 y Trp432) involucrado en la formación de los oxianiones intermedios 1 y 2 del ciclo catalítico de la TGM (Folk and Cole, 1966; Iismaa *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 1993; Murthy *et al.*, 2002; Pedersen *et al.*, 1994; Micanovic *et al.*, 1994) (Figura 5).

Los sustratos conocidos de la TGM1 son la loricrina, las proteínas pequeñas ricas en prolina (SPRs), la involucrina y proteínas ricas en lisina y glutamina. Estos a su vez, son componentes de la envoltura celular (Candi *et al.*, 1995; Steinert *et al.*, 1998; Simon and Green, 1985; Nemes *et al.*, 1999).

6) CICLO CATALÍTICO DE LAS TGM

Las TGM dependen de un grupo tiol y de Ca^{2+} para la catalisis de varias reacciones de entrecruzamiento entre proteínas con funciones pleiotrópicas como la coagulación, la formación de la matriz extracelular y de la barrera de la piel, la estabilización de las uniones intercelulares y de las membranas. Además, puede contribuir en la fisiopatología de diversas enfermedades inflamatorias, autoinmunes y degenerativas (Iismaa *et al.*, 2009).

Se conocen 3 tipos principales de reacciones enzimáticas de las transglutaminasas: la transamidación, la esterificación y la hidrólisis (Sarkar *et al.*, 1957; Clarke *et al.*, 1957; Neidle *et al.*, 1958; Mycek *et al.*, 1959; Pisano *et al.*, 1969; Lorand and Graham, 2003) (Figura 4).



Figura 4. Las TGM catalizan varias reacciones postraduccionales. En la imagen la elipse morada simboliza una proteína con un residuo de lisina (Lys) y el rectángulo azul corresponde a una proteína con un residuo de glutamina (Gln). Imagen modificada de la publicación de Lorand et al., 2003.



Figura 5. Ciclo enzimático de las transglutaminasas. Imagen modificada de la publicación de lismaa et al., 2009.

Todas las reacciones comparten un ciclo enzimático dividido en dos etapas. La acilación, en la cual un primer sustrato peptídico o un acilo, reacciona con el grupo tiol del residuo de cisteína de la triada catalítica y se forma una unión covalente γ -glutamiltioester con el grupo amino (NH₂) del sustrato. El amoníaco (NH₃) es liberado como un subproducto. La segunda etapa es de desacilación, en la cual, se escinde el enlace tioéster a través de la unión de un segundo sustrato que puede ser una amina, un alcohol o una molécula de H₂O. Así, se genera un producto de transamidación o de reticulación, de esterificación y de hidrólisis respectivamente (Iismaa *et al.*, 2009). (Figuras 4 y 5).

7) RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO DE LAS MUTACIONES DE *TGM1*

En modelos murinos knockout de Tgm1, los ratones al nacer presentan una piel eritematosa, brillante, tensa, gruesa y arrugada similares a la apariencia de la membrana colodión. Además se encuentran cubiertos con una membrana transparente e inelástica. Los ratones $Tgm1^{-/-}$ sufren letalidad neonatal temprana a las 4-5 horas al nacer secundaria a la deshidratación y la imposibilidad para comer. Los injertos de piel de ratones $Tgm1^{-/-}$ en ratones *nude* a las 2 semanas desarrollan descamaciones gruesas e histológicamente la epidermis muestra hiperplasia e hiperqueratosis similares a las características de la LI (Will and Luhrmann, 2011).

En la especie humana, las mutaciones en el gen TGM1 son la causa más frecuente de las ARCI (30%-55%). Un 80%-85% de los casos de LI son causados por mutaciones en el gen TGM1 (Pigg *et al.*, 1998; Fischer, 2009; Eckl *et al.*, 2009; Farasat *et al.*, 2009; Rodriguez-Pazos *et al.*, 2011; Israeli *et al.*, 2013). No existe una clara correlación genotipo-fenotipo en los casos de LI y CIE causadas por mutaciones en TGM1 o por otras mutaciones en los 9 genes causales de ARCI. Además, los fenotipos de las ARCI y la severidad pueden variar entre individuos afectados de una misma familia y las características clínicas pueden cambiar parcialmente según la edad del paciente afectado. En varias publicaciones se propone que estas formas podrían ser consideradas como variantes de un único trastorno de queratinización de las ARCI y que la clasificación fenotípica se debería fundamentar en la evaluación dermatológica, con el objetivo de definir un pronóstico y un manejo clínico del paciente más preciso (Akiyama *et al.*, 2003a; Farasat *et al.*, 2009; Vahlquist *et al.*, 2010; Oji *et al.*, 2010; Richard and Bale, 1993-2014).

Por otro lado, los fenotipos menores que corresponden a un 10% de los casos de ARCI, son causados principalmente por mutaciones heterocigotas compuestas y por mutaciones *missense* específicas de *TGM1* que resultan en una disminución de la actividad enzimática (Raghunath *et al.*, 2003; Jacyk, 2005; Oji *et al.*, 2006; Reese *et al.*, 1997; Aufenvenne *et al.*, 2009; Mazereeuw-Hautier *et al.*, 2009; Hackett *et al.*, 2010; Sorek *et al.*, 2004; Dror *et al.*, 2005; Bai *et al.*, 2015; Washio *et al.*, 2014).

II. PREGUNTA CIENTÍFICA

¿Cuál es el origen molecular del fenotipo de ARCI identificado en dos hermanas colombianas? ¿Cuáles transcritos son generados por la variante c.320-2A>G de *TGM1*?

¿Podrían existir otros transcritos aberrantes generados por la variante c.320-2A>G de *TGM1* diferentes a los identificados en este estudio?

III. OBJETIVO GENERAL

1. Identificar la causa molecular de ictiosis en dos hermanas afectadas de una misma familia.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar y definir el tipo clínico de ictiosis y el modo de herencia que se presenta en una mujer con ARCI y su hermana afectada.

2. Determinar si existe un gen candidato inicial para la identificación de la posible causa molecular del caso clínico.

3. Secuenciar el gen TGM1 del caso índice.

4. Identificar las variantes de secuencia de TGM1 en P1.

5. Clonar y secuenciar los transcritos generados por la variante c.320-2A>G homocigota de *TGM1*.

6. Predecir *in silico* los posibles rearreglos transcripcionales generados por la variante intrónica c.320-2A>G homocigota de *TGM1*.

7. Predecir *in silico* las traducciones de los transcritos causados por la variante c.320-2A>G homocigota de *TGM1*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. PACIENTE

Una paciente de 33 años de edad (P1) asistió a consulta en la unidad de dermatología del hospital Carlos Ardila Lule de Bucaramanga. Presentaba xerosis y descamaciones eritematosas leves desde el nacimiento. Las lesiones han aumentado progresivamente en número durante su vida adulta. Presentó fisuras palmo-plantares dolorosas, ectropión recurrente y lesiones ulcerativas de la córnea. Al examen físico se identificaron placas descamativas eritematosas de color gris y blancas, generalizadas con compromiso en los pliegues en las extremidades, alopecia cicatrizal frontal, temporal y occipital, eclabium, ectropión, cejas delgadas y escasas, orejas con sobreplegamiento del hélix, queratodermia palmo-plantar, uñas distróficas, hipohidrosis e intolerancia al calor (Figura 6). Su hermana (P2) presentó características clínicas similares. Los padres, dos hermanas y un hermano no se encontraron afectados (Figura 7). Los individuos afectados son producto de una unión consanguínea. Además, tanto los abuelos maternos como los abuelos paternos, también presentaron uniones consanguíneas.



Figura 6. Características clínicas de la paciente P1 con ARCI. Alopecia frontal, cabello quebradizo y fino, cejas y pestañas escasas, ectropión, eclabium, piel con eritema moderado y descamaciones finas. En la mano se observa queratodermia palmar con fisuras, hiperlinearidad y descamaciones blancas.



Figura 7. Familiograma de las pacientes en estudio. P1 es III:3.

2. EXTRACCIÓN DE ADN DE SANGRE PERIFÉRICA

Se obtuvo una muestra de sangre (10 mL con anticoagulante EDTA) de cada individuo participante. Se tomaron alícuotas de 2 mL que fueron tratadas con 6 mL de solución de lisis de glóbulos rojos (Tris-HCl 10mM pH 8, NaCl 400 mM y EDTA 2 mM) mezclando suavemente para posteriormente centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se adicionó nuevamente 4 mL de solución de lisis de glóbulos rojos. Se sometió a vórtex hasta desprender el pellet, se mezcló suavemente durante 10 minutos, se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y se descartó nuevamente el sobrenadante. Consecutivamente, se adicionó 4 mL de solución de lisis de glóbulos blancos 1X (NH4Cl 0.15 M, KHCO3 10 mM, EDTA 0.1 mM pH 8) y 10 µL de solución de proteinasa K (proteinasa K 1 mg/ml, SDS 1%, EDTA 2 mM). Se mezcló suavemente y se sometió a vórtex hasta obtener una mezcla homogénea. Se incubó a 56°C durante 4 horas. Se adicionó 800 µL de solución precipitante de proteínas (acetato de amonio 2.5 M) y se sometió a vórtex hasta obtener una mezcla homogénea. Se congeló a -20°C por 5 minutos y posteriormente se centrifugó a 4500 rpm durante 20 minutos a 4°C. Seguidamente, el sobrenadante se pasó a un tubo Eppendorf con 3 mL de isopropanol frío. Se mezcló suavemente y se obtuvo un precipitado de ADN. Se pasó a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 16.000 rpm durante 4 minutos. Se dejó secar por evaporación el remanente de isopropanolol y se adicionó 200 µL de solución TE 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM). Se almacenó en el congelador a -20°C. Por último, se cuantificó la concentración de ADN en un espectofotómetro NanoDrop 2000c de ThermoScientific.

3. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DE LA BIOPSIA DE PIEL DE P1

Se obtuvieron biopsias de piel del antebrazo izquierdo del caso índice (P1) y de una persona sana no emparentada (C1). Se homogenizaron y conservaron en 1 mL de trizol (Invitrogen) por cada 0.1 g de tejido de piel obtenido y se almacenaron a -80°C. Posteriormente, se incubaron las mezclas a temperatura ambiente durante 5 minutos y se realizaron la homogeneización de los tejidos separadamente con un rotor eléctrico manual. Se agregaron 0.2 mL de cloroformo por cada mL de volumen homogeneizado, se agitaron vigorosamente durante 15 minutos y se incubaron a temperatura ambiente por 2-3 minutos. Se centrifugaron a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C y se removieron 400 μ L de la fase acuosa de cada muestra por medio de aspiración a un tubo libre de ARNasas. En cada tubo se adicionó 400 μ L de etanol al 70% y se sometieron a vórtex.

Se utilizó el método de columnas de membrana según el protocolo PureLink RNA Mini Kit (Ambion) para obtener el ARN total. De cada muestra suspendida en etanol se transfirieron 700 µL a una columna de membrana respectivamente. Se centrifugaron a 12.000 g durante 15 segundos, se descartaron los líquidos obtenidos y se reutilizaron los mismos tubos de recolección. Se repitieron los mismos pasos en varias ocasiones hasta procesar la totalidad de las muestras suspendidas en etanol. Seguidamente, se adicionaron 700 μ L de *buffer* de lavado I a cada columna de membrana, se centrifugaron a 12.000 g durante 15 segundos, se descartaron los tubos de recolección con los líquidos obtenidos y se reemplazaron por tubos de recolección nuevos. Consecutivamente, se adicionaron 500 µL de buffer de lavado II con etanol en cada columna. Se centrifugaron a 12.000 g durante 15 segundos y se descartaron los líquidos obtenidos. Se repitió una sola vez los pasos de lavado II con etanol. A continuación, se centrifugaron a 12.000 g por 1 minuto para secar las membranas. Se descartaron los tubos de recolección y se pasaron las columnas de membrana a cada tubo de recuperación. Se adicionaron 100 μ L de agua libre de ARNasas en el centro de las columnas de membrana y se incubaron durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 12.000 g durante 2 minutos para eluir el ARN total aislado en las membranas hacia los tubos de recolección. Se pasaron los tubos de recolección en hielo. Se cuantificaron las concentraciones de ARN total en un espectofotómetro NanoDrop 2000c de ThermoScientific y se almacenaron a -80°C.

4. SÍNTESIS DE ADNC TOTAL DE PIEL

Se sintetizó ADNc a partir del ARN total obtenidos de P1 y C1. Se utilizó el protocolo *Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen). Se realizaron las mezclas de los reactivos en dos tubos Eppendorf. En cada tubo se mezclaron 1 μ L de oligo(dT)₂₀, 1 μ L de dNTP mix, ARN total (500 ng de P1 o de C1 respectivamente) y agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) hasta completar 10 μ L. Se incubaron a 65°C durante 5 minutos y se mantuvieron en hielo por 1 minuto. Posteriormente, a cada tubo se añadió 10 μ L de *cDNA Synthesis Mix* (2 μ L de buffer RT 10X, 4 μ L de MgCl2 25 nM, 2 μ L DTT 0.1 M, 1 μ L *RNAase out* y 1 μ L de *Superscript III*) preparada previamente según las indicaciones del fabricante. Se mezclaron de forma manual y suavemente. Se llevaron a incubación a 50°C durante 50 minutos, seguidamente a 85°C durante 5 minutos y se mantuvieron en hielo. A cada uno de los tubos se les adicionó 1 μ L de *RNAase H*. Se incubaron a 37°C durante 20 minutos y se pasaron a hielo. Se cuantificaron las concentraciones de ADNc en un espectofotómetro NanoDrop 2000c de ThermoScientific y se almacenaron a -20°C.

5. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACION DEL GEN TGM1

A. DISEÑO DE *PRIMERS* DE *TGM1*

Se utilizó el programa primer-BLAST para el diseño de los diferentes pares de oligonucleótidos para la amplificación del gen *TGM1* a partir de ADN genómico. Adicionalmente, se diseñaron *primers* internos para la secuenciación de los fragmentos amplificados de *TGM1*.

B. AMPLIFICACIÓN DE *TGM1*

La amplificación de las regiones codificantes del gen *TGM1* se realizó en P1, II:3, II:4 y III:2 (Figura 7). Se utilizaron pares de *primers* diseñados por fuera de la región codificante para amplificar todo el marco abierto de lectura y las uniones intrón-exón del gen *TGM1* (Tabla 1). Los fragmentos amplificados esperados tenían una longitud de entre 472 y 1018 pb. La reacción de PCR se realizó según especificaciones de las Tablas 2 y 3. El exón 7 de *TGM1* se amplificó nuevamente disminuyendo la temperatura de anillamiento a 60°C y con las especificaciones del termociclador incluida en la tabla 4. Las amplificaciones se confirmaron analizando 5 µL del producto de cada reacción de PCR en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se utilizó el marcador de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) para establecer la talla de los fragmentos.

		SECUENCIA DEL PRIMER	Producto WT esperado (bp)	
Exón	6n Forward 5'ACTGAATCAGCTGTCTGGATC		025	
2 y 3	Reverse HuTGM1ex2-3-1R	5'ACACCAAGACCCTCTCTGAGACAC3'	723	
Exón	Forward HuTGM1ex4-1F	5'ACTGTGATAGTCAGGCAGGCAGA3'	600	
4	Reverse HuTGM1ex4-1R	5'CCCTGTCTTTCCCTCCCATCTAC3'	000	
Exón	Forward HuTGM1ex5-6-1F	5'GCATTTTCTTCTGTGGACATGAGT3'	555	
5 y 6	Reverse HuTGM1ex5-6-1R	5'GGTTCTTGAGGAATCCAGAAAGG3'	555	
Exón	Forward HuTGM1ex7-1F	5'ATCCTGAGGCATTTAGGGGTAAG3'	472	
7	Reverse HuTGM1ex7-1R	5'CCCTTAGGCCTCTCTCTGTTGTTA3'	472	
Exón	Forward HuTGM1ex8-9-1F	5'ATACTCCTGACACGATGCCTCACT3'	510	
8 y 9	Reverse HuTGM1ex8-9-1R	5'GTGTTAATCAGGTGGGGGGAGATAA3'	518	
Exón	Forward HuTGM1ex10-1F	5'TGAAAGAGTATGTCAGGGACTTGG3'	564	
10	Reverse HuTGM1ex10-1R	5'TATCCCCTTTTACAGGTGAGGAAA3'	504	
Exón	Forward HuTGM1ex111213-1F	5'AGACCCTCTGGCTCACTCATTC3'	1019	
y 13	Reverse HuTGM1ex111213-1R	5'CTTCTCCTACAAAGGCTCATCAGG3'	1018	
Exón	Forward HuTGM1ex14-1F	5'TCTTCTCTGACTTCTGGGGAATCT3'	5(1	
14	Reverse HuTGM1ex14-1R	5'TAATGATTCCTATGTGGGCCTTCT3'	501	
Exón	Forward HuTGM1ex15-1F	5'TGAGATGAGGATGTTCTGTCTGG3'	762	
15	Reverse HuTGM1ex15-1R	5'TTTATTAGCATCTGTTCCCCCAGT3'	/03	

TABLA 1. PRIMERS DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN TGMI

 TABLA 2. REACTIVOS DE PCR DE TGM1

	VOLUMEN
Master Mix 2X (Promega)	12,5 μL
Primer Forward (10 μM)	1,0 μL
Primer Reverse (10 µM)	1,0 μL
H2O destilada	8,5 μL
ADN a amplificar (≈200 ng)	2,0 μL
Total	25,0 μL

TABLA 3. PROGRAMACIÓN DEL TERMOCICLADOR

	T°	TIEMPO	
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos	
No. de ciclos	(1)	35 ciclos	
Desnaturalización	95°C	1 minuto	
		40	
Anillamiento	62°C	segundos	
		50	
Elongación	72°C	segundos	
Elongación final	72°C	10 minutos	
Conservación	4°C		

PARA LA AMPLIFICACIÓN DE TGM1

TABLA 4. PROGRAMACIÓN DEL TERMOCICLADOR

	Т°	TIEMPO
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos
No. de ciclos	35 ciclos	
Desnaturalización	95°C	1 minuto
		40
Anillamiento	60°C	segundos
		40
Elongación	72°C	segundos
Elongación final	72°C	10 minutos
Conservación	4°C	

PARA LA AMPLIFICACIÓN EXÓN 7 DE TGM1

C. SECUENCIACIÓN DE *TGM1*

Para la secuenciación directa de los exones de TGM1 se utilizó un secuenciador de capilares (Applied Biosystems). Las reacciones se efectuaron con primers internos (Tabla 5). El análisis de las secuencias fue realizado a través de alineamientos múltiples y análisis de los electroforetogramas usando los programas geneious 6.1.4 y clustalW. Todas las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia wild type de TGM1 obtenida de la base de datos Ensembl (Transcript: TGM1-001 ENST00000206765).

Una vez se identificó la variante intrónica c.320-2A>G de TGM1 en P1 se realizó la secuenciación por Sanger con los primers internos HuTGM1ex3-Seq1F y HuTGM1ex3-Seq1R correspondiente a los productos obtenidos de las PCR del exón 2-3 de TGM1 de II:3, II:4 y III:2. Adiciónalmente, se realizó PCR en III:5 (hermana menor afectada) con los primers HuTGM1ex2-3-1F y HuTGM1ex2-3-1R con los reactivos y la programación del termociclador especificados en las tablas 2 y 3. La secuenciación de Sanger se realizó con los *primers* internos HuTGM1ex3-Seq1F y HuTGM1ex3-Seq1R. Los individuos III:4 y III:6 no autorizaron los estudios moleculares.

		SECUENCIA DEL PRIMER
Exón 2	Reverse HuTGM1ex2-Seq1R	5'CAGCAAGTCCACACCGTTCACTAC3'
Eván 2	Forward HuTGM1ex3-Seq1F	5'CGCCGGCCTGTATCCCGGGGCAG3'
Exoli 5	Reverse HuTGM1ex3-Seq1R	5'CCAGGGGCACACCCACACACTTG3'
Exón 4	Forward HuTGM1ex4-Seq1F	5'GAGAATAAGGTGATGGCCCAACG3'
Exón 5	Reverse HuTGM1ex5-Seq1R	5'GTATAAGCAGGCATCCAGCACCC3'
Exón 6	Forward HuTGM1ex6-Seq1F	5'CTACGGGACCGAAGCACAGATTGG3'
Evén 7	Forward HuTGM1ex7-Seq1F	5'GCAGGATCGGGGCCCGGCTGGTC3'
Exon /	Reverse HuTGM1ex7-Seq1R	5'CACTGTAGCCACATCTGGGCAGG3'
Exón 8	Reverse HuTGM1ex8-Seq1R	5'CCTCTTCATCCAGCAGTCGTTCC3'
Exón 9	Forward HuTGM1ex9-Seq1F	5'CCATGGACATCTACTTCGACGAG3'
Exón 10	Forward HuTGM1ex10-Seq1F	5'GTCAGGGCTGATGACCTTGTTCC3'
Exón 11	Reverse HuTGM1ex11-Seq1R	5'GCATGGCCACATCCTCCGCTGAG3'
Erán 12	Forward HuTGM1ex12-Seq1F	5'GAGGACATCACCTACCTCTATAAG3'
Exon 12	Reverse HuTGM1ex12-Seq1R	5'CCTTGTAGGCCACTGGCATGGTC3'
Exón 13	Forward HuTGM1ex13-Seq1F	5'CAAGGAGACCAAGAAGGAAGTGG3'
Exón 14	Reverse HuTGM1ex14-Seq1R	5'CATAGCACCAGGTGCCCAAGAGG3'
Erán 15	Forward HuTGM1ex15-Seq1F	5'GCAGAGGCGCCCTGGGGATCCTG3'
EXUII 13	Reverse HuTGM1ex15-Seq1R	5'GTGAAGACTGACTCCCTCTCCGGG3'

TABLA 5. PRIMERS INTERNOS PARA LA SECUENCIACIÓN DEL GEN TGMI

6. RT-PCR DE *TGM1*

A. DISEÑO DE PRIMERS DE RT-PCR DE *TGM1*

Se diseñaron diferentes pares de oligonucleótidos para la amplificación de ADNc de *TGM1* con el programa Primer-BLAST.

B. RT-PCR DE TGM1

Para la amplificación de los transcritos de TGM1 se utilizaron varios juegos de pares de primers diseñados entre los exones 1 y 4 para la amplificación de productos esperados entre 512 bp y 778 bp (Tabla 6). En paralelo se amplificó un fragmento de ADNc del gen β -ACTINA (un gen house keeping) para un producto de PCR esperado de 859 bp. La reacción de RT-PCR y la programación del termociclador utilizados se describen en las tablas 7 y 8 respectivamente. Las amplificaciones de los productos se confirmaron analizando 5 µL del producto de cada reacción de RT-PCR en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Adicionalmente, en 2 tubos se realizó una RT-PCR de P1 con los pares de primers hTGM1 cDNA-1F y hTGM1 cDNA-1R para amplificar los fragmentos de ADNc correspondientes a los transcritos entre los exones 1 y 4 de TGM1 (RT-PCR1). Por otro lado, en otros 2 tubos se realizó una RT-PCR de TGM1 con los pares de primers hTGM1cr F2a y hTGM1cr R2a para amplificar fragmentos de ADNc correspondientes a los transcritos entre los exones 1 y 3 de TGM1 (RT-PCR3). Seguidamente, se sembraron 40 µL de cada producto de RT-PCR1 y de RT-PCR3 en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para verificar los diferentes transcritos generados por la c.320-2A>G de TGM1. Se utilizó el marcador de peso molecular el 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) en todos los geles de agarosa utilizados

		SECUENCIA DEL PRIMER	Producto WT esperado (bp)
RT- PCR1	Forward hTGM1_cDNA-1F	5'TCCATCCTGACCTGTTCCATCTC3'	729
	Reverse hTGM1_cDNA-1R	5'ACTGTGAACTGAAACTTGCCGAT3'	738
RT- PCR2	Forward hTGM1_cDNA-2F	5'CATGATGGATGGGCCACGTTC3'	778
	Reverse hTGM1_cDNA-2R	5'GTCCACGTACACAATGTCCTCTG3'	778
RT- PCR3	Forward hTGM1cr_F2a	5'CCTGACCTGTTCCATCTCAGC3'	512
	Reverse hTGM1cr_R2a	5'GAGCATATGGAAAGGCTGCCC3'	312

TABLA 6. PRIMERS DE RT-PCR DE TGM1

	VOLUMEN
Master Mix 2X (Promega)	12,5 μL
Primer Forward (10 μM)	1,0 μL
Primer Reverse (10 μM)	1,0 μL
H2O destilada	9,0 μL
cDNA a amplificar (≈200 ng)	1,5 μL
Total	25,0 μL

TABLA 7. REACCIÓN DE RT-PCR DE TGM1

TABLA 8. PROGRAMACIÓN DEL TERMOCICLADOR PARA RT-PCR DE TGM1

	T°	TIEMPO
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos
No. de ciclos	35 ciclos	
Desnaturalización	95°C	40 segundos
Anillamiento	59°C	40 segundos
Elongación	72°C	1 minuto
Elongación final	72°C	10 minutos
Conservación	4°C	

7. CLONAJE DE LOS PRODUCTOS DE RT-PCR DE *TGM1* DE P1 Y SECUENCIACIÓN

Se utilizó el protocolo de *TOPO*® *TA Cloning*® *kit for Sequencing* (Invitrogen) para el clonaje inmediato de los diferentes fragmentos generados por la RT-PCR de *TGM1*.

A. EL VECTOR PCRTM4-(TOPO®)

El vector pCRTM4-TOPO® (Invitrogen), de 3956 bp, es un plásmido usado para el clonaje y la secuenciación de fragmentos de ADN. El principio de clonaje en este vector aprovecha la actividad transferasa terminal no-dependiente de un templado de la *taq* polimerasa que adiciona una desoxiadenosina (A) en el extremo 3' final del producto de PCR formando extremos cohesivos. El plásmido pCRTM4-TOPO® lineal tiene un residuo desoxitimidina en ambos extremos 3' que se puede sobrelapar por complementaridad de bases con la desoxiadenosina del extremo 3' de los productos de PCR. A su vez, ambas desoxitimidinas de los extremos 3' se encuentran unidas por medio de un enlace covalente fosfotirosil con la topoisomerasa I del virus *Vaccinia* (entre el fosfato 3' y la Tyr-274 de la topoisomerasa I). La energía conservada en la unión fosfotirosil subsecuentemente ataca el hidroxilo 5' del correspondiente nucleótido del extremo cohesivo del producto fresco de PCR y se cataliza la unión fosfodiéster en una cadena de la doble hélice resultando en el cierre del

vector pCRTM4-(TOPO)® (Numata et al., 2015; Esposito et al., 2007) (Figura 8).



Figura 8. Mapa del vector pCRTM4-TOPO® (Invitrogen).

B. CLONAJE EN EL VECTOR PCRTM4-(TOPO)®

Se realizó el clonaje de los fragmentos de cDNA de los RT-PCR de P1. Estos productos correspondieron a la amplificación de varios transcritos a los cuales no se les realizó extracción de bandas en el gel de agarosa. Se repitieron las RT-PCR con los *primers* hTGM1_cDNA-1F y hTGM1_cDNA-1R y una segunda RT-PCR con los pares de *primers* hTGM1cr_F2b y hTGM1cr_R2b. Inmediatamente después de terminar las RT-PCR, se transfirió 1 μ L del volumen de cada RT-PCR correspondiente en tubos Eppendorf por separado. En cada tubo se adicionaron los siguientes reactivos del kit en orden: 1 μ L de solución salina, 3 μ L de agua y 1 μ L de vector pCR4-TOPO® para un volumen total de 6 μ L en cada tubo. Se mezclaron los reactivos suavemente y se llevaron a incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se mantuvieron en hielo.

C. TRANSFORMACIÓN EN CELULAS QUIMIOCOMPETENTES Y SIEMBRA EN PLACAS DE AGAR LB

Para cada transformación se utilizó un vial de bacterias de Escherichia coli químicamente

competentes One Shot®TOP10 (Invitrogen). A cada uno de los viales se les agregó 2 μ L del volumen de la reacción de clonaje. Se mantuvieron en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se colocaron en un baño serológico a 42°C durante 30 segundos para generar un choque térmico, en el cual, el ADN plasmídico debe ingresar en las bacterias quimiocompetentes. Nuevamente se mantuvieron los tubos en hielo. Seguidamente, se adicionó 250 μ L de medio S.O.C. (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 10 mM, MgCl2 10 mM, MgSO4 10 mM y glucosa 20 mM) para optimizar la eficiencia de la transformación de las bacterias quimiocompetentes (medio de recuperación). Se pasó a un agitador horizontal a 300 r.p.m. a 37°C durante una hora. Por último, se sembraron 50 μ L de cada transformación en placas de agar LB (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, pH 7 y agar 15g/L) con ampicilina (50 μ g/mL) y se incubó a 37°C toda la noche.

D. SELECCIÓN DE LAS COLONIAS Y CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO LB

A partir de las placas de agar LB con TOP10 *E. coli* transformadas. Se seleccionaron 10 colonias correspondientes a los productos clonados con los pares de *primers* hTGM1cr_F2b y hTGM1cr_R2b y 7 colonias correspondientes a los productos clonados con los pares de *primers* hTGM1_cDNA-1F y hTGM1_cDNA-1R. Se picaron y fueron extraídas cada una de estas colonias. Se sembraron en diferentes tubos Falcon que contenían 5 mL de medio LB líquido (triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1% pH 7) con ampicilina (50 μ g/mL). Se incubaron a 37°C en agitación horizontal a 150 r.p.m. durante 16 horas.

E. PCR A PARTIR DE CULTIVOS LÍQUIDOS BACTERIANOS

A partir de los cultivos líquidos LB de bacterias transformadas se realizó la amplificación por PCR con los *primers* T7 (forward) y M13 (reverse) correspondientes al kit del VECTOR pCR4-TOPO (tabla 9). Los reactivos de PCR y la programación del termociclador utilizados se describen en las tablas 10 y 11 respectivamente. Cabe anotar que esta amplificación no es específica de *TGM1*. Los *primers* se encuentran sobre el plásmido.

TABLA 9. PRIMERS DE AMPLIFICACION DE PCR DE CULTIVOS

DE BACTERIAS TRANSFORMADAS

	SECUENCIA DEL PRIMER	
Forward T7	5'TAATACGACTCACTATAGGG3	
Reverse M13	5'CAGGAAACAGCTATGAC3'	

TABLA 10. REACTIVOS DE PCR DE CULTIVO

VOLUMENMaster Mix 2X (Promega)12,5 μLPrimer Forward T72,0 μLPrimer Reverse M132,0 μLH2O destilada7,5 μLCultivo liquido LB con *E. coli*
competentes transformadas1,0 μLTotal25,0 μL

DE BACTERIAS TRANSFORMADAS

TABLA 11. PROGRAMACIÓN DEL TERMOCICLADOR PARA PCR

	Т°	TIEMPO
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos
No. de ciclos	35 ciclos	
Desnaturalización	95°C	40 segundos
Anillamiento	59°C	40 segundos
Elongación	72°C	1 minuto
Elongación final	72°C	10 minutos
Conservación	4°C	

DE CULTIVO DE BACTERIAS TRANSFORMADAS

F. SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADNC DE TGM1 DE P1

La secuenciación directa de los fragmentos de ADNc de P1 clonados se realizó en un secuenciador de capilares (Applied Biosystems). En las reacciones se utilizaron los *primers* forward T7 y reverse M13. Se excluyeron del análisis los electroforetogramas que presentaron ruido de fondo elevado. A cada secuencia obtenida se les realizó BLASTN (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch& LINK_LOC=blasthome) para excluir los amplicones no específicos de *TGM1*. Las secuencias que correspondieron a los amplicones de ADNc de *TGM1* se alinearon con las secuencia del transcrito de *TGM1* publicada en las base de datos Ensembl (*Transcript: TGM1-001 ENST00000206765*). Se utilizaron los programas Geneious 6.1.4 y ClustalW.

8. PREDICCIONES *IN SILICO* DE OTROS POSIBLES TRANSCRITOS GENERADOS POR LA VARIANTE INTRÓNICA c.320-2A>G DE *TGM1*

Se realizaron simulaciones *in silico* para predecir otros los diferentes transcritos generados por la variante intrónica c.320-2A>G de *TGM1* y poder comprar estos resultados con los transcritos identificados *in vitro*. Se utilizaron los siguientes programas:

Cryp-Skip emplea un algoritmo de regresión logística múltiple basado en un modelo de entropía para predecir los posibles rearreglos transcripcionales generados por áreas de splicing 3' o 5' diferentes a los sitios de *splicing* consenso. Asigna un puntaje de 0 a 1 para la activación de un sitio críptico de *splicing* alternativo. Un puntaje cercano a 0 predice un *exon skipping*, mientras que, si es cercano a 1 predice una activación de un sitio críptico (Divina *et al.*, 2009) (http://cryp-skip.img.cas.cz/).

NNSplice Score v0.9 fue desarrollado por *Genome Informatics Group* basado en un algoritmo desarrollado por Brunakc et al., en 1991 y se fundamenta en un método denominado "reconocimiento de redes neuronales". Utiliza la base de datos de GenBank, Este programa reconoce sitios aceptores y donadores de *splicing* probables y los reporta con un puntaje de 0 a 1 (Brunak *et al.*, 1991; Reese *et al.*, 1997) (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

Splice Site Score Calculation publicado por *Cold Spring Harbor Laboratory*. Utiliza un algoritmo que identifica la homología de los sitios de *splicing* crípticos de interés con los sitios de *splicing* consenso de mamíferos compilados en la base de datos del programa GENIE (Campos, 1976). Este programa se fundamente en el modelo de reconocimiento de redes neuronales y de comparación de secuencias homólogas contiguos a los sitios de *splicing* consensos 5' y 3'. El puntaje medio de corte recomendado por los autores para predecir los sitios de splicing 3' es de 7,9 (http://rulai.cshl.edu/new_alt_exon_db2/HTML/score.html).

MaxEntScan utiliza un algoritmo enfocado en el modelado de los motivos de las secuencias cortas correspondientes a los complejos nucleares del espliceosoma y simultáneamente, utiliza un cálculo de "posiciones adyacentes y no-adyacentes". Se fundamenta en el principio de máxima entropía. Además, compara los puntajes obtenidos con otros modelos probabilísticos de secuencias de motivos como el de matrices de peso y el de Markov no homogéneo (Yeo and Burge, 2004) (<u>http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq_acc.html</u>).

9. ANÁLISIS *IN SILICO* DE LOS TRANSCRITOS GENERADOS POR LA VARIANTE c.320-2A>G DE *TGM1*

A los transcritos generados por la variante intrónica c.320-2A>G de *TGM1* se les realizó, *in silico*, las correspondientes traducciones utilizando los programas ExPASy Translate Tool (<u>http://web.expasy.org/translate</u>) y Geneious 6.1.4 para determinar los cambios en la secuencias de aminoácidos en la estructura primaria de la proteína.

VI. RESULTADOS

1. TIPO DE ICTIOSIS Y MODO DE HERENCIA DE ENFERMEDAD

Las pacientes presentaron ictiosis generalizada desde el nacimiento con descamaciones finas de color gris y eritema, alopecia cicatricial, eclabium, ectropión e hipohidrosis (Figura 6). Estos datos clínicos sugieren una ictiosis congénita autosómica recesiva (ARCI). La ausencia de síntomas y signos extra-cutáneos clasifican la enfermedad en las formas de ictiosis nosindromáticas. Otras características del cuadro clínico ayudaron a descartar otros tipos de ictiosis no-sindromáticas dentro del diagnóstico diferencial inicial. La distribución generalizada del fenotipo con compromiso de los pliegues cubitales y poplíteos y la ausencia de diátesis ectópica permitió excluir la ictiosis vulgar. La ausencia de lesiones cutáneas de aspecto ampolloso, de erosiones cutáneas y de hiperqueratosis severas sobre las grandes superficies articulares y de las áreas de fricción o de las extremidades permitió excluir las ictiosis queratinopáticas. La genealogía familiar y la anamnesis permitieron determinar que los padres de las pacientes eran sanos con antecedentes de consanguinidad (Figura 7). El fenotipo de las pacientes y la genealogía familiar sugirieron una ARCI no-sindromática. La subclasificación del tipo de ARCI correspondió a la eritrodermia ictiosiforme congénita (CIE) por las descamaciones finas, de color blanco o gris y con un grado moderado de eritrodermia brillante (Figura 6). El gen candidato inicial para el inicio de los estudios moleculares fue TGM1. Las mutaciones en este gen son la causa más frecuente de la ARCI (se cumplen los objetivos específicos 1 y 2).

2. SECUENCIACIÓN DE ADN GENÓMICO DE *TGM1*

En la figura 9 se muestran las amplificaciones de *TGM1* realizados a partir de ADN genómico en P1, II:3, II:4 y III:2 (Figura 7). El análisis de los electroforetogramas de la secuenciación de Sanger de cada amplicón y la alineación con la secuencia genómica de *TGM1* WT permitió identificar las siguientes 3 variantes homocigotas en P1: c.320-2A>G, c.1146C>A y c.2454+C>T (Figura 10). Las características de cada una de las variantes encontradas se resumen en la tabla 12 (Se cumple el 3^{er} y 4° objetivo específico).



Figura 9. Verificación de PCR de *TGM1* en gel de agarosa 1%. a) Amplificación de las regiones codificantes de *TGM1* sin obtener amplificación del fragmento del exón 7. b) Amplificación del exón 7 de *TGM1* (imagen en formato negativo). A = III:3 (P1); B = II:4; C = II:3; D = III:2; 0 = Blanco.



Figura 10. Electroforetogramas de la secuenciación de Sanger de *TGM1* de P1 e identificación de las tres variantes homocigotas.

VARIANTE HOMOCIGOTA	LOCALIZACIÓN	PROTEÍNA	IDENTIFICACIÓN DE LA VARIANTE (ENSEMBL)
c.320-2A>G	Intrón 2: Sitio consenso aceptor de <i>splicing</i>	Formas mutantes en estudio.	No hay ID reportado ni publicaciones relacionadas.
c.1146C>A	Exón 7	p.Gly382Gly	rs1126432 MAF: 0.16 (A)
c.2454+4C>T	3'UTR		rs2748536

TABLA 12. RESUMEN DE LAS VARIANTES HOMOCIGOTAS DE TGM1 DE P1

NA = No aplica/No hay información.

La interpretación de la función potencial de la variante intrónica c.320-2A>G de *TGM1* se abordará en los próximos capítulos. Las otras dos variantes no se tuvieron en cuenta como etiológicas debido a que han sido ya identificadas en la literatura científica y no tienen reportes asociados a ARCI. La variante c.1146C>A (p.Gly382Gly) de *TGM1* corresponde a una mutación sinónima, la cual, no representa un cambio en la secuencia proteica. La variante c.2454+4C>T de *TGM1* localizada en la región 3'UTR ha sido identificada en diferentes estudios poblacionales.

La secuenciación de Sanger de los exones 2 y 3 en los individuos II:3, II:4, III:2 y III:5 permitió identificar que los individuos II:3, II:4 y III:2 eran portadores de la variante intrónica c.320-2A>G de *TGM1* en estado heterocigoto. En la hermana afectada (III:5) se identificó la variante c.320-2A>G de *TGM1* en estado homocigoto (Figura 11 y 12).



Figura 11. Electroforetogramas de la secuenciación de Sanger del amplicón correspondiente al exón 3 de *TGM1* en P1 y familiares. Identificación de la variante heterocigota c.320-2A>G de *TGM1* en II:3, II:4 y III:2. Variante homocigota c.320-2A>G de *TGM1* en III:3 y III:5.



3. RT-PCR DE TGM1

En la figura 13 se muestran las verificaciones en geles de agarosa al 1% de las correspondientes RT-PCR de *TGM1* realizados en P1 y C1. En las figuras 13a, se observa un

amplicón de RT-PCR1 generados por la variante c.320-2A>G de P1 correspondiente a una talla de entre 500 bp a 650 bp. La RT-PCR1 de TGM1 de C1 genera un amplicón con una talla de entre 650 bp a 850 bp y se correlaciona con un amplicón esperado de 738 bp. En la figura 13b, se observaron dos amplicones generados por la variante c.320-2A>G de TGM1 de P1 en la reacción de RT-PCR2. La de menor talla se encuentra entre los 500 bp a 650 bp y es la que se tiñe mejor con el bromuro de etidio y se señala con una flecha blanca en la correspondiente figura. El amplicón de mayor talla se tiñe tenuemente con el bromuro de etidio y se señala con la cabeza de flecha blanca, tiene una talla ubicada entre 650 bp a 850 bp. La RT-PCR2 de TGM1 de C1 evidencia un solo amplicón con una talla entre los 650 bp a 850 bp y se correlaciona a un amplicón esperado de 778 bp. En la figura 13c, la RT-PCR3 se verificaron dos amplicones generados por la variante c.320-2A>G de TGM1, el de menor talla es 500 pb aproximadamente y el de mayor talla es de 650 pb aproximadamente. Los dos amplicones se señalan con cabeza de flechas amarillas. La RT-PCR3 de TGM1 de C1 solo evidencia un amplicón esperado de 512 pb. En la figura 13d, Se observan varios transcritos amplificados en la RT-PCR1 de P1. Un transcrito se tiñe fuertemente con bromuro de etidio y la talla se localiza entre los 500 bp a 650 bp se señala con la flecha blanca. Otro amplicón se tiñe con menor intensidad y su talla se encuentra entre los 650 bp a 850 bp se señala con la cabeza de flecha blanca. En la RT-PCR3 de TGM1 de P1 se evidencian al menos 3 amplicones, el de menor talla es de aproximadamente de 500 bp señalado con una cabeza de flecha azul, el segundo amplicón tiene una talla entre los 500 bp a 650 bp señalado con una cabeza de flecha roja y el tercer amplicón tiene una talla de aproximadamente de 650 bp señalado con una cabeza de flecha verde.



Figura 13. Verificación de RT-PCR de *TGM1* en gel de agarosa al 1%. a) RT-PCR #1 de *TGM1* de P1 y C1. b) **RT-PCR #2 de** *TGM1* **de P1 y C1. c) RT-PCR #3 de** *TGM1* **de P1 y C1. d) RT-PCR de** *TGM1* **de P1 con siembra de 40 µL de RT-PCR en cada pozo, respectivamente de RT-PCR1 y RT-PCR3.** RT-PCR1 (*primers* hT GM1_cDNA-1F y hTGM1_cDNA-1R); RT-PCR2 (*primers* hTGM1_cDNA-2F y hTGM1_cDNA-2R); RT-PCR3 (*primers* hTGM1cr_F2b y hTGM1cr_R2b). P1 = III:3; C1 = persona sana no emparentada. B = blanco.

4. SECUENCIACIÓN DE LOS TRANSCRITOS GENERADOS POR LA VARIANTE INTRÓNICA c.320-2A>G DE *TGM1* DE P1

La secuenciación de Sanger de los transcritos clonados generados por la variante c.320-2A>G de *TGM1* correspondientes a las colonias 6 y 7 permitió identificar la deleción de 12 nucleótidos del exón 3 de *TGM1*. Nomenclatura HGVS: c.320-2A>G de *TGM1* (*r.320_330de1*). Esta variante corresponde al mecanismo de activación de un sitio aceptor críptico localizado a 12 nucleótido corriente abajo de la variante intrónica (Figura 14).

La secuenciación de Sanger de los transcritos clonados generados por la variante c.320-2A>G

de *TGM1* en las colonias 8, 9 y 10 permitió identificar la retención del intrón 2 de 150 nucleótidos. Nomenclatura: c.320-2A>G de *TGM1* (*r.[319_320ins320-150_320-1]*) (Figura 15). La secuenciación de Sanger de los transcritos clonados generados por la variante c.320-2A>G en las colonias 11, 12, 15 y 16 permitió identificar la deleción de 189 nucleótidos. Esta variante corresponde al mecanismo de salto del exón 3. Nomenclatura: c.320-2A>G de *TGM1* (*r.320_508del*) (Figura 15). (Se cumplió el objetivo específico 5).



Figura 14. Secuenciación de RT-PCR de la variante intrónica c.320-2A>G de *TGM1* **clonado en la colonia 7.** El transcrito corresponde a la activación de un sitio críptico aceptor de *splicing*. La secuenciación de la colonia 6 reportó el mismo transcrito: *r.320_330del*.



Figura 15. Secuenciación de RT-PCR de la variante intrónica c.320-2A>G de *TGM1* **clonado en la colonia 10.** El transcrito corresponde a la retención del intrón 2 en el ARNm de *TGM1*. Las secuenciación de las colonias 8 y 9 identificaron el mismo transcrito: *r*.*[319_320ins320-150_320-1]*.



Figura 16. Secuenciación de RT-PCR de la variante intrónica c.320-2A>G de *TGM1* **clonado en la colonia 15.** El transcrito corresponde a un salto del exón 3 (*exon skipping*) de *TGM1* con la correspondiente deleción de 189 nucleótidos en el ARNm de *TGM1*. La secuenciación de Sanger de las colonias 11, 12 y 16 permitieron identificar la misma secuencia transcrita: *r.320_508del*.

5. PREDICCIONES IN SILICO DE LA VARIANTE INTRÓNICA c.320-2A>G

A. CRYP-SKIP

Resultados obtenidos con el programa CRYP-SKIP para el exón 3 de la *TGM1* con 120 nucleótidos de los intrones flanqueantes respectivos. Predice la activación de un sitio críptico AG en el exón 3 con un puntaje de 0,69. El AG se encuentra localizado a 53 nucleótidos corriente a bajo del sitio críptico consenso del intrón 2 (Figura 17).

B. NNSPLICE SCORE v.0.9

Utilizando este programa con un punto de corte mínimo de 0,85 para los sitios de *splicing* 3', se predijeron para la variante c.320-2A>G de *TGM1*, 4 potenciales sitios aceptores de *splicing* crípticos localizados en el intrón 3 de *TGM1*. Dos de estos sitios obtuvieron un puntaje de 0,95. Uno de estos correspondió al sitio aceptor de *splicing* consenso del intrón 3 con un puntaje de 0,95 y el otro sitio críptico aceptor de *splicing* se localizó a 38 bases corriente arriba del sitio aceptor de *splicing* consenso del intrón 3 (Figura 18).



Figura 17. Predicción de sitio críptico aceptor de *splicing* realizado con CRYP-SKIP con la secuencia del exón 3 de *TGM1*. Las letras en mayúscula corresponden a la secuencia del exón 3 de *TGM1* y las letras minúsculas a la secuencia de los intrones flanqueantes. La cabeza de la flecha azul indica la localización del sitio críptico aceptor de *splicing* en casos de mutaciones del sitio aceptor de *splicing* consenso del intrón 2. Las cabezas de las flechas rojas indican sitios crípticos donadores de *splicing* crípticos probables en casos de mutaciones del sitio donador consenso del intrón 4.

Acceptor site predictions for c.320-2A>G :					
Start	End	Score	Intron	Exon	
881	921	0.94	cctcatcctttaa	tttccc ${f a}g_{{f g}}$ aacccctaccacctccacc	
1074	1114	0.94	cgtctctcctcc	cacctc ag agttcagtgtcaggggaaca	
1277	1317	0.95	ggctccatccct	$\operatorname{ctcctc} \mathbf{ag}_{\operatorname{ggaggccttgccagctaatt}}$	
1315	1355	0.95	attgctgatttcc	tactct ag gaaacaaccccgaggtgggc	

Figura 18. Predicciones del programa NNSplice Score v0.9 para los posibles sitios crípticos aceptores de *splicing* causado por la variante c.320-2A>G de *TGM1*.

C. SPLICE SITE SCORE CALCULATION Y MAXENTSCAN

A partir de todos los posibles sitios crípticos aceptores de *splicing* corriente abajo de la variante c.320-2A>G de *TGM1* se ingresaron en orden estas secuencias nucleotídicas 5' a 3' de los posibles sitios crípticos aceptores de *splicing* como se resumen en la tabla 13 con

su respectivos puntajes obtenidos en cada programas. Los sitios crípticos aceptores de *splicing* con mejor puntaje se encontraron en el extremo 3' del intrón 3 (filas 13, 14, 15 y 16 de la tabla 13). El mejor puntaje lo obtuvo un sitio aceptor de *splicing* críptico localizado a -40 del intrón 3. Además, los posibles sitios crípticos aceptores localizados en el exón 3 presentaron muy baja puntación (fila 1 a la 12 de la tabla 13). Con estos puntajes negativos obtenidos en los sitios crípticos aceptores de *splicing* en el exón 3 estos programas no predecirían el transcrito identificado en el clonaje y secuenciación de la RT-PCR3. Nuevamente, estos dos programas da un puntaje positivo para el sitio aceptor de splicing alternativo localizado a 53 nucleótidos corriente abajo del sitio de la variante c.320-2A>G de *TGM1* como lo reportó el programa Cryp-Skip. (Se cumplió con el objetivo específico 6).

	SPLICE SITE SCORE CALCULATION			MAXENTSCAN			
	Secuencia de 12 nt INTRÓN 5' probable de AG críptico	1 nt EXÓN	PUNTAJE	SECUENCIA DE PROBABLE SITIOS ACEPTORES CRÍPTICO	MODELO DE MÁXIMA ENTROPIA	MODELO DE MARKOV 1ER ORDEN	MODELO DE MATRICES DE PESO
1	GTCCTTGCGG AG	G	-4,40	GGAGCTGTGTCCTTGCGG AG GGC	-10,63	-3,38	-3,5
2	AGGGCATGCT AG	Т	-4,40	CCTTGCGGAGGGCATGCT AG TAG	-6,24	-8,24	-3,24
3	GCATGCTAGT AG	Т	-1,00	TGCGGAGGGCATGCTAGT AG TGA	-7,51	-6,38	-3,77
4	GGACTTGCTG AG	С	-11,30	AACGGTGTGGACTTGCTG AG CTC	-8,71	-7,42	-8,45
5	CGCTCGGACC AG	А	2,00	TGAGCTCGCGCTCGGACC AG AAC	3,25	1,33	0,56
6	AGAACCGCCG AG	А	-11,90	CTCGGACCAGAACCGCCG AG AGC	-21,26	-14,06	-10,3
7	AACCGCCGAG AG	С	-10,30	CGGACCAGAACCGCCGAG AG CAC	-15,59	-14,06	-12,06
8	GACGAGTATG AG	Т	-14,90	ACCACACAGACGAGTATG AG TAC	-27,31	-26,15	-14,46
9	GAGTACGACG AG	С	-13,40	ACGAGTATGAGTACGACG AG CTG	-18,17	-13,89	-13,24
10	ACGAGCTGAT AG	Т	-3,30	TGAGTACGACGAGCTGAT AG TGC	-8,8	8,29	-4,49
11	CGCCGCGGGGC AG	С	0,30	TGATAGTGCGCCGCGGGC AG CCT	0,3	-0,76	-2,57
12	ATCACCCTTG AG	Т	-5,60	CTGATCGCATCACCCTTG AG TTA	-9,16	-6,38	-2,48
13	TTTAATTTCCC AG	G	6.9	CTCATCCTTTAATTTCCC AG GAA	8,58	8,52	10,22
14	TCCCCACCTC AG	А	8.1	GTCTCTCCTCCCCACCTC AG AGT	8,80	8,65	10,89
15	CCCTCTCCTCAG	G	11,70	GCTCCATCCCCTCTCCTC AG GGA	9,79	9,77	11,66
16	TTCCTACTCTAG	G	8,60	TTGCTGATTTCCTACTCT AG GAA	9,77	9,5	9,97

Tabla 13. Predicciones de sitios crípticos para la variante c.320-2A>G de TGM1

La fila 2 corresponde a la secuencia identificada en el clonaje de RT-PCR3 de un sitio aceptor de splicing críptico. La fila número 5 corresponde a la predicción de activación de sitio aceptor de *splicing* críptico realizado con Cryp-Skip. La fila número 16 corresponde al *exon skipping* del exón 3.
6. ALINEAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS TGM1 MUTANTES GENERADAS POR LA VARIANTE c.320-2A>G DE *TGM1*

En la Figura 19 muestra el alineamiento múltiple entre la TGM1 WT y las enzimas mutantes generadas por la mutación intrónica c.320-2A>G de TGM1. El patrón de splicing alternativo de salto del exón 3 (r.320 508del) conduce a la deleción de 63 aminoácidos (p.Glu107 Ile169del) sin corrimiento del marco de lectura. Teóricamente traduciría una proteína mutante de 754 aminoácidos con la pérdida parcial del dominio β-Sandwich y la conservación del centro catalítico y de los dos barriles β C-terminal del zimógeno. La segunda variante de *splicing* alternativo generada por la variante c.320-2A>G de TGM1 es la activación de un sitio aceptor de *splicing* alternativo a 12 nucleótidos corriente abajo del sitio de la mutación. Teóricamente generaría la deleción de 12 nucleótidos del ARNm (r.320 330del) y resultaría en la deleción de los aminoácidos EGML (ácido glutámico, glicina, metionina y leucina) localizados entre las posiciones 107 a la 110 de la TGM1 (p.Glu107 Leu110del). Esta TGM1 mutante conserva la mayor parte del dominio β-Sandwich y la conservación del centro catalítico y de los dos barriles β C-terminal del zimógeno. El tercer patrón de *splicing* alternativo identificado corresponde a la retención del intrón 2 (r./319 320ins320-150 320-11) que traduciría teóricamente una proteína truncada de 117 aminoacidos (p.Glu107fs*12) con la pérdida de los dominios β -Sandwich, el centro catalítico y los dos barriles β C-terminal. (Se cumplió el objetivo específico 7).

VARIANTE DE ARNm	REARREGLO DE SPLICING	VARIANTE EN PROTEÍNA					
(Nomenclatura HGVS)	RESULTANTE						
r.320_508del	Exon skipping (del exón 3)	p.Glu107_Ile169del					
r.320_330del	Activación sitio críptico aceptor alternativo	p.Glu107_Leu110del					
r.[319_320ins320- 150_320-1]	Retención del intrón 2	p.Glu107Glyfs*12					

 Tabla 14. Variantes de ARNm y de proteínas generados por la mutación intrónica c.320-2A>G de

 TGM1

	1	10	20		30		40		50		60		70			80		90
TGM1 WT Exon Skipping 3	MMDGPRSDV MMDGPRSDV	GRWGGNI GRWGGNI	PLOPPTT PLOPPTT	PSPEPE	PEPDG	RSRRG	GGRSH GGRSH	FWARC FWARC	CGCC CGCC	SCRNAA SCRNAA	ADDDW ADDDW	GPEP: GPEP:	SDSRG SDSRG	RGSSS	GTRR	PGSR	GSDS GSDS	RR PVSRGSG RR PVSRGSG
Retención de intrón 2	MMDGPRSDV	GRWGGN	PLQPPTI	PSPEPE	PEPDG	RSRRG	GGRSI	EWARC EWARC	CGCC	SCRNA	ADDDW	GPEP	SDSRG SDSRG	RGSSS	GTRR	PGSR	GSDS	R R P V S R G S G R R P V S R G S G
	100	110		120		130		140		150		160		170		-	180	190
Exon Skipping 3	VNAAGDGTI VNAAGDGTI	REGMLVN	NGVDLL	SSRSDC	NRREH	HTDEY	EXDEI	IVRR	GQPE	НМГГГ.	-G	ESSDI	XITLE]	INPEV INPEV	GKGT	HVII	PVGKGGSGG PVGKGGSGG
Activación sitio criptico Retención de intrón 2	VNAAGDGTI VNAAGDGTI	RGEAGL	NGVDLL SSSAES*	SSRSDQ	NRREH	HTDEY	EYDEI	LIVRR	GQPF	HMLLL	LSRTY	ESSDI	RITLE	LLIGN	INPEV	GKGT	HVII	PVGKGGSGG
7014117	200	CONTRACT	210	22	0	230	annor		240		250		260		270		2	80
Exon Skipping 3 Activación sitio criptico	WKAQVVKAS WKAQVVKAS WKAQVVKAS	GQNLNLI GQNLNLI	RVHTSPN RVHTSPN RVHTSPN	AIIGKE	QFTVR QFTVR QFTVR	TQSDA TQSDA TQSDA	GEFQI GEFQI GEFQI	LPFDP LPFDP	RNEI RNEI RNEI	YILFN YILFN YILFN	PWCPE PWCPE PWCPE	DIVY	DHED DHED DHED	WRQE WRQE WRQE		SGRI SGRI SGRI	YYGT YYGT YYGT	EAQIGERTW EAQIGERTW EAQIGERTW
Retención de mulon 2	290	300	31	0	320		330		3	140		350		360		370		380
TGM1 WT Exon Skipping 3 Activación sitio criptico Retención de intrón 2	NYGQFDHGV NYGQFDHGV NYGQFDHGV	LDACLY LDACLY LDACLY	ILDRRGM ILDRRGM ILDRRGM	IPYGGRG IPYGGRG IPYGGRG	D P V N V D P V N V D P V N V	SRVIS SRVIS SRVIS	AMVN AMVN AMVN	SLDDN SLDDN SLDDN	GVLI GVLI GVLI	Ġ N W S G I G N W S G I G N W S G I	D Y S R G D Y S R G D Y S R G D Y S R G	TNPS TNPS TNPS TNPS	AWVGS AWVGS AWVGS	VĖILI VEILI VEILI	SYLR SYLR SYLR	TGÝS TGÝS TGÝS	VPYG VPYG VPYG	QCWVFAGVT QCWVFAGVT QCWVFAGVT
11010110101100112	390	4	00	410		420		430		440		4	50		460		470	480
TGM1 WT Exon Skipping 3 Activación sitio criptico Retención de intrón 2	TTVLRĊLGL TTVLRCLGL TTVLRCLGL	ATRTVTI ATRTVTI ATRTVTI	N F N S A H D N F N S A H D N F N S A H D	TDTSL1 TDTSL1 TDTSL1	MDIYF MDIYF MDIYF	DENMK DENMK DENMK	PLEHI PLEHI PLEHI	LNHDS LNHDS LNHDS	VWNF VWNF VWNF	HVWND HVWND HVWND	CWMKR CWMKR CWMKR	PDLP: PDLP: PDLP:	GFDG GFDG GFDG	WQVVI WQVVI WQVVI) Á T PQ) A T PQ) A T PQ	ETSS ETSS ETSS	GIÉC GIEC GIEC	CGPCSVESİ CGPCSVESI CGPCSVESI
		490	500		510		520		530		540		550			560		570
TGM1 WT Exon Skipping 3 Activación sitio criptico Retención de intrón 2	KNGLVYMKY KNGLVYMKY KNGLVYMKY	DTPFIF/ DTPFIF/ DTPFIF/	A EVNSDK A EVNSDK A EVNSDK	VYWQRC VYWQRC VYWQRC	DDGSE DDGSE DDGSE DDGSE	KIVYV KIVYV KIVYV	EEKAI EEKAI EEKAI	IGTLI IGTLI IGTLI	VTKA VTKA VTKA	ISSNMI ISSNMI ISSNMI	REDIT REDIT REDIT	YLYKI YLYKI YLYKI	HPEGS HPEGS HPEGS	DAERF DAERF DAERF	AVET AVET AVET	АААН АААН АААН	GSKP GSKP GSKP	NVÝANRGSA NVYANRGSA NVYANRGSA
	580	590		600		610		620		630		640		650			660	670
TGM1 WT Exon Skipping 3 Activación sitio criptico Retención de intrón 2	EDVAMQVEA EDVAMQVEA EDVAMQVEA	QDAVMG QDAVMG QDAVMG QDAVMG	DLMVSV DLMVSV DLMVSV	MLINHS MLINHS MLINHS	S S R R T S S R R T S S R R T	VKLHL VKLHL	YLSV YLSV YLSV	FYTG FYTG FYTG	VSGT VSGT VSGT	IFKETI IFKETI IFKETI	KKEVE KKEVE KKEVE	LAPG LAPG LAPG LAPG	ASDRV ASDRV ASDRV	TMPVA TMPVA TMPVA	YKEY YKEY YKEY	R PHL R PHL R PHL	VDQG. VDQG. VDQG.	AMLLNVSGH AMLLNVSGH AMLLNVSGH
	680		690	70	0	710			720		730		740	_	750		7	60
TGM1 WT Exon Skipping 3 Activación sitio criptico Retención de intrón 2	VKESGQVLA VKESGQVLA VKESGQVLA	KQHTFRI KQHTFRI KQHTFRI	LR TPDL S LR TPDL S LR TPDL S	LTLLGA LTLLGA LTLLGA	AVVGQ AVVGQ AVVGQ	ECEVQ ECEVQ ECEVQ	IVFKI IVFKI IVFKI	N P L P V N P L P V N P L P V	TLTN TLTN TLTN	VVFRL VVFRL VVFRL	EGSGL EGSGL EGSGL	QRPK QRPK QRPK	LLNVG LLNVG LLNVG	DIGGN DIGGN DIGGN	IETVT IETVT IETVT	LRQS LRQS LRQS	EVPV EVPV EVPV	R PGPRQLIA R PGPRQLIA R PGPRQLIA
TGM1 WT Exon Skipping 3 Activación sitio criptico Retención de intrón 2	SLDSPQLSQ SLDSPQLSQ SLDSPQLSQ SLDSPQLSQ	780 VHĠVIQN VHGVIQN VHGVIQN	79 / DVA PA P / DVA PA P / DVA PA P	GDGGFE GDGGFE GDGGFE	800 SDAGG SDAGG SDAGG	DSHLG DSHLG DSHLG	810 ETIPN ETIPN ETIPN	MASRG MASRG MASRG	GA* GA* GA*									

Figura 19. Alineamiento múltiple de las proteínas TGM1 WT y las proteínas TGM1 generadas por la mutación intrónica c.320-2A>G de TGM1.

VII. DISCUSIÓN

El desarrollo de esta tesis se fundamentó en identificar la causa molecular de ARCI en dos hermanas colombianas. Las pacientes presentaron la forma de eritrodermia ictiosiforme congénita (CIE). Se identificó la variante intrónica homocigota c.320-2A>G de *TGM1* en III:3 y III:5 por secuenciación de Sanger. Esta variante no había sido previamente reportada en las bases de datos de la NCBI y Ensembl.

La variante intrónica c.320-2A>G de TGM1 modifica el sitio consenso aceptor de splicing del intrón 2. Teóricamente podría permitir la generación de varios transcritos alternativos o aberrantes: al exon skipping del exón 3 (hipótesis 1), activación de un sitio críptico aceptor de splicing (hipótesis 2) y a la retención del intrón 2 (hipótesis 3). Teóricamente, los ARNm de TGM1 generados podrían traducir proteínas mutantes con deleciones o inserciones en el dominio β -sandwich con cambios importantes en el plegamiento de las hojas β o en los diferentes *loops* del dominio β-sandwich y finalmente, conducir al deterioro de las diferentes interacciones moleculares entre las fracciones solubles y no solubles de la proteína TGM1. Las afinidades por los diferentes sustratos de la enzima podrían alterarse por cambios estructurales de la enzima. Además, podría resultar en un importante cambio en la estructura terciaria de los sitios de reconocimiento de las diferentes proteasas in vivo por la TGM1 y generar dificultades en el acceso al punto de proteólisis N-terminal (Gly93) del zimógeno. También podrían generarse varios ARNm de TGM1 con codones de parada prematuros que traducirían proteínas truncadas que posiblemente podrían ser eliminados por el sistema NMD. Todo lo anterior, podría contribuir al déficit de la función enzimática de las TGM1 de las pacientes descritas en este estudio con ARCI y explicarían en conjunto el fenotipo CIE que presentan.

Existen varios casos de ARCI publicados con mutaciones homocigotas no sinónimas en el dominio β -sandwich que conducen a la síntesis teórica en una proteína truncada: c.316C>T (p.Arg106X), c.371delA (p.Gln124Argfs*16) y c.374delA (p.Asn125Thrfs*15). Estas mutaciones han sido asociados a fenotipos de ictiosis laminar (LI) (Esposito *et al.*, 2007; Akiyama *et al.*,

2003b; Numata *et al.*, 2015). Sin embargo, mutaciones *missense* en el dominio β-sandwich también han sido reportadas con fenotipos LI como en el caso de c.424C>T (p.Arg142Cys) y c.386A>G (p.His129Pro) (Laiho *et al.*, 1997; Bai *et al.*, 2015).

Por otra lado, mutaciones heterocigotas compuestas en TGM1 que involucran el dominio β sandwich se han asociado a fenotipos de CIE como son los siguientes casos: c.421C>T (p.Arg141His) y c.424C>T (p.Arg142Cys); c.424C>T (p.Arg142Cys) y c.1137G>C (p.Val379Leu); c.420A>G (p.Ile140Met) y c.1070G>A (p.Gly357Asp) (Laiho et al., 1997; Numata et al., 2015). Sin embargo, otras mutaciones heterocigotas compuestas de TGM1 no son exclusivas del fenotipo CIE. Por ejemplo, las mutaciones heterocigotas compuestas c.430G>A (p.Gly144Arg) y c.919C>T (p.Arg307Trp) de TGM1 se han asociado a uno de los fenotipos menores de las ARCI (Washio et al., 2014). Las mutaciones heterocigotas compuestas c.424C>T (p.Arg142Cys) y c.1137G>C (p.Val379Leu) de TGM1 también se ha descrito en pacientes con fenotipos LI y CIE (Laiho et al., 1997). Esta variabilidad clínica en mutaciones en TGM1 también ha sido descrita por otros autores. Por ejemplo, Huber *et al.*, reportaron en dos hermanas con ARCI la variante intrónica homocigota c.877-2A>G de TGM1 localizada en el sitio canónico aceptor de splicing del intrón 5. Una de las pacientes presentó LI y su hermana presentó CIE. La secuenciación del ADNc de TGM1 de las pacientes mostró la retención del intrón 5 de TGM1 que teóricamente traduciría una proteína truncada de 283 aminoácidos (p.Glu253Glyfs*32). Pigg et al., reportaron esta misma mutación en 33 familias noruegas con ARCI. Confirmaron la variabilidad clínica de esta mutación en las familias con ARCI estudiadas. También, secuenciaron el ADNc de TGM1 de tres personas con ARCI con esta variante y demostraron la inserción de un solo nucleótido de guanina (G) en las secuencias correspondientes entre los exones 5 y 6. El transcrito generado traduciría teóricamente una proteína truncada de 293 aminoácidos (p.Phe293Valfs*2) (Huber et al., 1995; Pigg et al., 1998). Estos estudios sugieren que pueden existir varios transcritos generados por una variante intrónica localizada en los sitios canónicos de splicing como también se ha demostrado en la variante intrónica c.320-2A>G de TGM1 de las pacientes estudiada en esta tesis.

El clonaje y secuenciación de los diferentes transcritos de RT-PCR de P1 permitió confirmar varios patrones de *splicing* alternativos generados por la variante intrónica c.320-2A>G de *TGM1*. La secuenciación de Sanger correspondientes a cuatro colonias de clonaje permitió identificar un transcrito de *TGM1* con la deleción de 189 bp correspondiente al exón 3 de *TGM1*

y confirmó la hipótesis 1 (salto del exón 3) que genera el ARNm *r.320_508del* (p.Glu107_Ile169del).

La secuenciación de Sanger de las otras colonias de clonaje con insertos de los productos de RT-PCR3 de P1 permitió identificar otros patrones de splicing alternativos. En dos colonias se identificó un transcrito con la activación de un sitio aceptor de splicing alternativo ubicado a 12 nucleótidos corriente abajo del sitio de la variante intrónica c.320-2A>G de TGM1. Este transcrito de ARNm teóricamente transcribiría una proteína de TGM1 con una deleción de 4 aminoácidos consecutivos en la región N-terminal del dominio B-sandwich. Los aminoácidos delecionados corresponden a la secuencia: ácido glutámico, glicina, metionina y leucina (EGML). La proteína sintetizada conservaría el centro catalítico y los dominios C-terminales (p.Glu107 Leu110del). Sin embargo, el dominio β-sandwich está altamente conservados en las proteínas TGM1 entre las especies del humano, el perro y el ratón (Farasat et al., 2009) y cambios en la secuencia por mutaciones podría teóricamente resultar en un déficit de la función residual enzimática. En dos colonias de clonaje de productos de RT-PCR3 de TGM1 se secuenciaron polinucleótidos correspondientes al intrón 2 de TGM1 y se confirmó la retención del intrón 2 en la secuencia de ARNm generado por la variante intrónica c.320-2A>G de TMG1. Este transcrito teóricamente traduciría una proteína truncada de 117 aminoácidos (p.Glu107Glyfs*12) y posiblemente podría ser eliminado por el sistema NMD. Se considera que estos tres transcrito generados por la variante c.320-2A>G de TMG1 contribuyen y son la causa molecular del fenotipo que presentan las pacientes estudiadas en esta tesis.

En esta tésis se utilizaron varios programas *in silico* paralelamente al estudio de RT-PCR, clonaje y secuenciación de los diferentes transcritos para la variante intrónica c.320-2A>G de *TGM1* y determinar otros posibles transcritos alternativos no identificados en los estudios de clonaje. Los programas SpliceSiteScore, MaxEntScan y NNsplice score dieron varios sitios aceptores de *splicing* crípticos en el extremo 3' del intrón 3 con un alto puntaje en comparación a los localizados en el exón 3 que mostraron incluso puntajes negativos. Los puntajes *in silico* más altos se obtuvieron en dos sitios crípticos a nivel del intrón 3 y uno corresponde al *exon skipping* del exón 3 como patrón de *splicing* alternativo para la variante en estudio como se identificó en varios transcritos clonados y secuenciados de RT-PCR1. El programa CrypSkip predijo la activación de un sitio aceptor de *splicing* alternativo en el exón 3 a 53 nucleótidos corriente abajo de la variante c.320-2A>G de *TGM1*, que teóricamente traduciría una proteína truncada de 117

aminoácidos (p.Glu107Pro*10). En los otros programas (SpliceSiteScore, MaxEntScan y NNsplice) este sitio aceptor de splicing alternativo también obtuvo un puntaje positivo, sin embargo, es un puntaje menor con respecto a los puntajes que se obtuvieron los sitios aceptores alternativos del intrón 3. Este resultado in silico teóricamente no se podría descartar en los posibles transcritos no identificados por los estudio de clonaje realizados debido a la baja cantidad de colonias seleccionadas en este trabajo que pudieron excluir este posible transcrito y que incluso podría estar presentándose in vivo. Por otro lado, estos programas no reportaron un puntaje positivo al transcrito aceptor de *splicing* alternativo identificado en las dos colonias correspondientes al clonaje de los productos de RT-PCR3 de TGM1 de P1. Esto indicaría que los programas in silico tienen grados variables de precisión y podrían excluir posibles transcritos que se generan por estos tipos de mutaciones en sitios canónicos de splicing. Además, podrían presentarse un amplio rango de resultados con falsos positivos, entre un 0.5% y un 10% de los resultados. Estos conceptos deben tenerse en cuenta al momento de interpretarse los diferentes resultados in silico (Reese et al., 1997; Sorek et al., 2004; Dror et al., 2005). Se sugiere que en futuros estudios de investigación de variantes en sitios canónicos de splicing y en los que se requieran identificar los diferentes transcritos alternativos se deberían estudiar con un amplio número de transcritos clonados y respectiva secuenciación directa u otras técnicas moleculares que permitan el estudio de al menos 100 transcritos generados por este tipo de variantes.

Un protocolo de GeneReviews actualizado hace 2 años recomienda secuenciar directamente el gen *TGM1* como primer opción en los casos de ARCI. Secuenciar el gen *ABCA12* en el caso específico de ictiosis arlequín (HI). En los casos de individuos con ARCI en que no se encuentren variantes patológicas en *TGM1* y en *ABCA12* sugieren realizar pruebas diagnósticas en los otros 7 genes causales de ARCI (Richard and Bale, 1993-2014). En esta tesis, la secuenciación directa de *TGM1* permitió identificar la variante c.320-2A>G en las dos hermanas con ARCI y no se requirió el estudio en los otros genes causales. El estudio de los otros genes candidatos de ARCI representaría la secuenciación de más de 120 exones y un trabajo laborioso, extenso y con un costo que puede superar los 2.000 USD si se realizara por secuenciación directa de Sanger. Recientes artículos han utilizado la secuenciación de siguiente generación (NGS) como una estrategia para el diagnóstico molecular en trastornos hereditarios con una amplia heterogeneidad genética. Estas nuevas técnicas moleculares permiten disminuir tiempos considerables y jornadas laborales con respecto a la secuenciación directa de múltiples genes candidato. Por otro lado, la

disminución progresiva de costos en la última década de la NGS y de los paneles genéticos de ictiosis ofertados por diferentes proveedores se acercan a los US 1.400 USD y 2.000 USD al día de hoy. Posiblemente en un futuro, en nuevos casos de ARCI sin variantes patológicos en *TGM1* se podría postular la secuenciación por paneles de genes de ictiosis o de un exoma completo, teniendo en cuenta los costos y los beneficios.

En conclusión, en esta tesis se identificó la variante intrónica homocigota c.320-2A>G de *TGM1* en dos hermanas colombianas con ARCI. Esta variante genera al menos 3 transcritos mutantes de *TGM1*. Se identificaron tres patrones de *splicing* alternativos para esta variante: el salto del exón 3, la activación de un sitio aceptor de *splicing* alternativo y la retención del intrón 2 de *TGM1*. Dos de los transcritos secuenciados teóricamente traducen una proteína de TGM1 con la deleción de varios aminoácidos localizados en el dominio estructural β-sandwich de la enzima y la traducción de la proteína conservaría los dominios del centro catalítico y los dominios Cterminales de la enzima. Teóricamente cada proteína de TGM1 mutante presentaría una alta probabilidad de pérdida y de abolición de la función residual enzimática por cambios estructurales en el dominio β-sandwich. La retención del intrón 2 en el transcrito de *TGM1* conduciría a una proteína truncada con un codón de parada temprano y una abolición de la función enzimática. Este último transcrito podría ser degradado por el sistema NMD. No se descarta la posibilidad de que existan otros transcritos generados por la variante intrónica c.320-2A>G de *TGM1* que contribuyen al fenotipo ARCI aquí descrito.

VIII. PERSPECTIVAS

- Cuantificar la función enzimática residual de las proteínas mutantes de TGM1 generadas por la variante intrónica c.320-2A>G permitiría confirmar la abolición o el deterioro de la función enzimática. Para esta propuesta se pueden proponer varias metodologías.
 - Purificación de la enzima TGM1 a partir de biopsias de piel de una de las dos pacientes con ARCI y de individuos no emparentados. Posteriormente determinar la actividad enzimática con diferentes sustratos específicos y analizar los resultados (Steinert *et al.*, 1996; Yuspa and Harris, 1974; Kim *et al.*, 1995; Hitomi *et al.*, 2000).
 - Constructos de *TGM1*. La transformación de varias colonias de *E.coli* con diferentes vectores de expresión que correspondan a los transcritos generados por la variante c.320-2A>G de *TGM1* permitiría sintetizar las proteínas TGM1 mutantes. La purificación de la enzima desde los extractos bacterianos y posteriormente realizar los estudios de actividad enzimática de TGM1 correspondientes (Kim *et al.*, 1994).
 - En células HaCat (línea celular de queratinocito humano aneuploide inmortalizado) se podría editar la secuencia genómica de la célula HaCat con la variante intrónica c.320-2A>G de *TGM1* por medio del sistemas CRISPR-Cas9 para obtener la expresión de *TGM1* mutantes. Realizar los estudios de actividad enzimática.
- Estudios de transcriptómica comparativa de muestra de epidermis. Se podría efectuar transcriptómica de epidermis de pacientes con ARCI causado por mutaciones en *TGM1* en comparación con la transcriptómica de la epidermis de varios individuos sanos no emparentados. El análisis de *microarrays* de DNA es una nueva tecnología que permitiría analizar simultáneamente la expresión de miles de genes.

• Ampliar los estudios de genotipificación de la variante intrónica c.320-2A>G de *TGM1* por secuenciación de Sanger del exón 3 en los otros parientes sano y de las nuevas generaciones de esta familia con una previa asesoría genética sobre la importancia de conocer la condición de portador o no de la mutación y dar una adecuada asesoría.

BIBLIOGRAFIA

- Ahvazi, B., Boeshans, K. M., Idler, W., Baxa, U. & Steinert, P. M. (2003). Roles of calcium ions in the activation and activity of the transglutaminase 3 enzyme. J Biol Chem 278(26): 23834-23841.
- Ahvazi, B. & Steinert, P. M. (2003). A model for the reaction mechanism of the transglutaminase 3 enzyme. *Exp Mol Med* 35(4): 228-242.
- Akiyama, M. (2010). FLG mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema: spectrum of mutations and population genetics. *Br J Dermatol* 162(3): 472-477.
- Akiyama, M., Sawamura, D. & Shimizu, H. (2003a). The clinical spectrum of nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma and lamellar ichthyosis. *Clin Exp Dermatol* 28(3): 235-240.
- Akiyama, M., Sugiyama-Nakagiri, Y., Sakai, K., McMillan, J. R., Goto, M., Arita, K., Tsuji-Abe, Y., Tabata, N., Matsuoka, K., Sasaki, R., Sawamura, D. & Shimizu, H. (2005). Mutations in lipid transporter ABCA12 in harlequin ichthyosis and functional recovery by corrective gene transfer. *J Clin Invest* 115(7): 1777-1784.
- Akiyama, M., Takizawa, Y., Suzuki, Y. & Shimizu, H. (2003b). A novel homozygous mutation 371delA in TGM1 leads to a classic lamellar ichthyosis phenotype. *Br J Dermatol* 148(1): 149-153.
- Ammirati, C. T. & Mallory, S. B. (1998). The major inherited disorders of cornification. New advances in pathogenesis. *Dermatol Clin* 16(3): 497-508.
- Annilo, T., Shulenin, S., Chen, Z. Q., Arnould, I., Prades, C., Lemoine, C., Maintoux-Larois, C., Devaud, C., Dean, M., Denefle, P. & Rosier, M. (2002). Identification and characterization of a novel ABCA subfamily member, ABCA12, located in the lamellar ichthyosis region on 2q34. *Cytogenet Genome Res* 98(2-3): 169-176.
- Aufenvenne, K., Oji, V., Walker, T., Becker-Pauly, C., Hennies, H. C., Stocker, W. & Traupe, H. (2009). Transglutaminase-1 and bathing suit ichthyosis: molecular analysis of gene/environment interactions. *J Invest Dermatol* 129(8): 2068-2071.
- Bai, J., Ding, Y. G., Wu, Y. H., Qiao, J. J. & Fang, H. (2015). Novel transglutaminase 1 mutations in a Chinese patient with severe lamellar ichthyosis phenotype. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 81(3): 292-294.
- Bale, S. J. & Doyle, S. Z. (1994). The genetics of ichthyosis: a primer for epidemiologists. J Invest Dermatol 102(6): 498-508.
- Ballabio, A., Parenti, G., Carrozzo, R., Sebastio, G., Andria, G., Buckle, V., Fraser, N., Craig, I., Rocchi, M., Romeo, G. & et al. (1987). Isolation and characterization of a steroid sulfatase cDNA clone: genomic deletions in patients with X-chromosome-linked ichthyosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(13): 4519-4523.
- Basler, E., Grompe, M., Parenti, G., Yates, J. & Ballabio, A. (1992). Identification of point mutations in the steroid sulfatase gene of three patients with X-linked ichthyosis. Am J Hum Genet 50(3): 483-491.
- Bennett, K., Callard, R., Heywood, W., Harper, J., Jayakumar, A., Clayman, G. L., Di, W. L. & Mills, K. (2010). New role for LEKTI in skin barrier formation: label-free quantitative

proteomic identification of caspase 14 as a novel target for the protease inhibitor LEKTI. *J Proteome Res* 9(8): 4289-4294.

- Beutler, E., Nguyen, N. J., Henneberger, M. W., Smolec, J. M., McPherson, R. A., West, C. & Gelbart, T. (1993). Gaucher disease: gene frequencies in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet* 52(1): 85-88.
- Bevans, C. G., Kordel, M., Rhee, S. K. & Harris, A. L. (1998). Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. J Biol Chem 273(5): 2808-2816.
- Boeglin, W. E., Kim, R. B. & Brash, A. R. (1998). A 12R-lipoxygenase in human skin: mechanistic evidence, molecular cloning, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(12): 6744-6749.
- Boeshans, K. M., Mueser, T. C. & Ahvazi, B. (2007). A three-dimensional model of the human transglutaminase 1: insights into the understanding of lamellar ichthyosis. *J Mol Model* 13(1): 233-246.
- Bolliger, M. F., Frei, K., Winterhalter, K. H. & Gloor, S. M. (2001). Identification of a novel neuroligin in humans which binds to PSD-95 and has a widespread expression. *Biochem J* 356(Pt 2): 581-588.
- Booth, C. C. (1999). Robert Willan MD FRS (1757-1812): dermatologist of the millennium. *J R Soc Med* 92(6): 313-318.
- Braverman, N., Lin, P., Moebius, F. F., Obie, C., Moser, A., Glossmann, H., Wilcox, W. R., Rimoin, D. L., Smith, M., Kratz, L., Kelley, R. I. & Valle, D. (1999). Mutations in the gene encoding 3 beta-hydroxysteroid-delta 8, delta 7-isomerase cause X-linked dominant Conradi-Hunermann syndrome. *Nat Genet* 22(3): 291-294.
- Brocq, L. (1902). Erythrodermie congénitale ichthyosiforme avec hyperépidermotrophie. *Ann Derm Syphiligr* 3: 1-31.
- Brooks, A. P. & Harrington, C. I. (1977). Acquired ichthyosis and toxic epidermal necrolysis and mesenteric reticulum cell sarcoma and malabsorption. *Br Med J* 2(6089): 739-740.
- Brunak, S., Engelbrecht, J. & Knudsen, S. (1991). Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *J Mol Biol* 220(1): 49-65.
- Brunetti-Pierri, N., Andreucci, M. V., Tuzzi, R., Vega, G. R., Gray, G., McKeown, C., Ballabio, A., Andria, G., Meroni, G. & Parenti, G. (2003). X-linked recessive chondrodysplasia punctata: spectrum of arylsulfatase E gene mutations and expanded clinical variability. *Am J Med Genet A* 117A(2): 164-168.
- Burns, F. S. (1915). A case of generalized congenital keratoderma, with unusual involvement of the eyes, ears, and nasal and buccal mucous membranes. *J Cutan Dis* 33: 255-260.
- Bygum, A., Virtanen, M., Brandrup, F., Ganemo, A., Sommerlund, M., Strauss, G. & Vahlquist, A. (2013). Generalized and naevoid epidermolytic ichthyosis in Denmark: clinical and mutational findings. *Acta Derm Venereol* 93(3): 309-313.
- Campos, M. G., G (1976). Ictiosis congénita y queratodermia palmo plantar. Acta Médica Colombiana 1(4): 229-233.
- Candi, E., Melino, G., Mei, G., Tarcsa, E., Chung, S. I., Marekov, L. N. & Steinert, P. M. (1995). Biochemical, structural, and transglutaminase substrate properties of human loricrin, the major epidermal cornified cell envelope protein. *J Biol Chem* 270(44): 26382-26390.
- Candi, E., Schmidt, R. & Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(4): 328-340.
- Canueto, J., Giros, M., Ciria, S., Pi-Castan, G., Artigas, M., Garcia-Dorado, J., Garcia-Patos, V.,

Viros, A., Vendrell, T., Torrelo, A., Hernandez-Martin, A., Martin-Hernandez, E., Garcia-Silva, M. T., Fernandez-Burriel, M., Rosell, J., Tejedor, M., Martinez, F., Valero, J., Garcia, J. L., Sanchez-Tapia, E. M., Unamuno, P. & Gonzalez-Sarmiento, R. (2012). Clinical, molecular and biochemical characterization of nine Spanish families with Conradi-Hunermann-Happle syndrome: new insights into X-linked dominant chondrodysplasia punctata with a comprehensive review of the literature. *Br J Dermatol* 166(4): 830-838.

- Cariboni, A., Pimpinelli, F., Colamarino, S., Zaninetti, R., Piccolella, M., Rumio, C., Piva, F., Rugarli, E. I. & Maggi, R. (2004). The product of X-linked Kallmann's syndrome gene (KAL1) affects the migratory activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)producing neurons. *Hum Mol Genet* 13(22): 2781-2791.
- Cassinerio, E., Graziadei, G. & Poggiali, E. (2014). Gaucher disease: a diagnostic challenge for internists. *Eur J Intern Med* 25(2): 117-124.
- Clarke, D. D., Neidle, A., Sarkar, N. K. & Waelsch, H. (1957). Metabolic activity of protein amide groups. *Arch Biochem Biophys* 71(1): 277-279.
- Curry, C. J., Magenis, R. E., Brown, M., Lanman, J. T., Jr., Tsai, J., O'Lague, P., Goodfellow, P., Mohandas, T., Bergner, E. A. & Shapiro, L. J. (1984). Inherited chondrodysplasia punctata due to a deletion of the terminal short arm of an X chromosome. *N Engl J Med* 311(16): 1010-1015.
- Chakravarty, R. & Rice, R. H. (1989). Acylation of keratinocyte transglutaminase by palmitic and myristic acids in the membrane Anchorage region. *J Biol Chem* 264(1): 625-629.
- Chakravarty, R., Rong, X. H. & Rice, R. H. (1990). Phorbol ester-stimulated phosphorylation of keratinocyte transglutaminase in the membrane anchorage region. *Biochem J* 271(1): 25-30.
- Chavanas, S., Bodemer, C., Rochat, A., Hamel-Teillac, D., Ali, M., Irvine, A. D., Bonafe, J. L., Wilkinson, J., Taieb, A., Barrandon, Y., Harper, J. I., de Prost, Y. & Hovnanian, A. (2000). Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat Genet* 25(2): 141-142.
- Choi, E. J. & Toscano, W. A., Jr. (1988). Modulation of adenylate cyclase in human keratinocytes by protein kinase C. *J Biol Chem* 263(32): 17167-17172.
- Choy, F. Y. & Wei, C. (1995). Identification of a new mutation (P178S) in an African-American patient with type 2 Gaucher disease. *Hum Mutat* 5(4): 345-347.
- Chuang, N. N. & Huang, C. C. (2007). Interaction of integrin beta1 with cytokeratin 1 in neuroblastoma NMB7 cells. *Biochem Soc Trans* 35(Pt 5): 1292-1294.
- Dale, B. A., Resing, K. A. & Lonsdale-Eccles, J. D. (1985). Filaggrin: a keratin filament associated protein. *Ann N Y Acad Sci* 455: 330-342.
- de la Cruz-Alvarez, J., Allegue, F. & Oliver, J. (1996). Acquired ichthyosis associated with eosinophilic fasciitis. *J Am Acad Dermatol* 34(6): 1079-1080.
- De Laurenzi, V., Rogers, G. R., Hamrock, D. J., Marekov, L. N., Steinert, P. M., Compton, J. G., Markova, N. & Rizzo, W. B. (1996). Sjogren-Larsson syndrome is caused by mutations in the fatty aldehyde dehydrogenase gene. *Nat Genet* 12(1): 52-57.
- Deraison, C., Bonnart, C., Lopez, F., Besson, C., Robinson, R., Jayakumar, A., Wagberg, F., Brattsand, M., Hachem, J. P., Leonardsson, G. & Hovnanian, A. (2007). LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pHdependent interaction. *Mol Biol Cell* 18(9): 3607-3619.
- Derry, J. M., Gormally, E., Means, G. D., Zhao, W., Meindl, A., Kelley, R. I., Boyd, Y. &

Herman, G. E. (1999). Mutations in a delta 8-delta 7 sterol isomerase in the tattered mouse and X-linked dominant chondrodysplasia punctata. jderry@immunex.com. *Nat Genet* 22(3): 286-290.

- DiGiovanna, J. J. & Robinson-Bostom, L. (2003). Ichthyosis: etiology, diagnosis, and management. *Am J Clin Dermatol* 4(2): 81-95.
- Divina, P., Kvitkovicova, A., Buratti, E. & Vorechovsky, I. (2009). Ab initio prediction of mutation-induced cryptic splice-site activation and exon skipping. *Eur J Hum Genet* 17(6): 759-765.
- Donsky, H. J. (1978). Skin manifestations of internal malignancy. *Can Fam Physician* 24: 242-246.
- Dreyfus, I., Chouquet, C., Ezzedine, K., Henner, S., Chiaverini, C., Maza, A., Pascal, S., Rodriguez, L., Vabres, P., Martin, L., Mallet, S., Barbarot, S., Dupuis, J. & Mazereeuw-Hautier, J. (2014). Prevalence of inherited ichthyosis in France: a study using capturerecapture method. *Orphanet J Rare Dis* 9: 1.
- Dror, G., Sorek, R. & Shamir, R. (2005). Accurate identification of alternatively spliced exons using support vector machine. *Bioinformatics* 21(7): 897-901.
- Eckl, K. M., de Juanes, S., Kurtenbach, J., Natebus, M., Lugassy, J., Oji, V., Traupe, H., Preil, M. L., Martinez, F., Smolle, J., Harel, A., Krieg, P., Sprecher, E. & Hennies, H. C. (2009). Molecular analysis of 250 patients with autosomal recessive congenital ichthyosis: evidence for mutation hotspots in ALOXE3 and allelic heterogeneity in ALOX12B. J Invest Dermatol 129(6): 1421-1428.
- Eckl, K. M., Tidhar, R., Thiele, H., Oji, V., Hausser, I., Brodesser, S., Preil, M. L., Onal-Akan, A., Stock, F., Muller, D., Becker, K., Casper, R., Nurnberg, G., Altmuller, J., Nurnberg, P., Traupe, H., Futerman, A. H. & Hennies, H. C. (2013). Impaired epidermal ceramide synthesis causes autosomal recessive congenital ichthyosis and reveals the importance of ceramide acyl chain length. *J Invest Dermatol* 133(9): 2202-2211.
- Elias, P. M., Williams, M. L., Choi, E. H. & Feingold, K. R. (2014). Role of cholesterol sulfate in epidermal structure and function: lessons from X-linked ichthyosis. *Biochim Biophys Acta* 1841(3): 353-361.
- Elias, P. M., Williams, M. L., Maloney, M. E., Bonifas, J. A., Brown, B. E., Grayson, S. & Epstein, E. H., Jr. (1984). Stratum corneum lipids in disorders of cornification. Steroid sulfatase and cholesterol sulfate in normal desquamation and the pathogenesis of recessive X-linked ichthyosis. J Clin Invest 74(4): 1414-1421.
- Eramo, L. R., Esterly, N. B., Zieserl, E. J., Stock, E. L. & Herrmann, J. (1985). Ichthyosis follicularis with alopecia and photophobia. *Arch Dermatol* 121(9): 1167-1174.
- Esposito, G., Tadini, G., Paparo, F., Viola, A., Ieno, L., Pennacchia, W., Messina, F., Giordano, L., Piccirillo, A. & Auricchio, L. (2007). Transglutaminase 1 deficiency and corneocyte collapse: an indication for targeted molecular screening in autosomal recessive congenital ichthyosis. *Br J Dermatol* 157(4): 808-810.
- Farasat, S., Wei, M. H., Herman, M., Liewehr, D. J., Steinberg, S. M., Bale, S. J., Fleckman, P. & Toro, J. R. (2009). Novel transglutaminase-1 mutations and genotype-phenotype investigations of 104 patients with autosomal recessive congenital ichthyosis in the USA. *J Med Genet* 46(2): 103-111.
- Faustino, N. A. & Cooper, T. A. (2003). Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* 17(4): 419-437.
- Fischer, J. (2009). Autosomal recessive congenital ichthyosis. J Invest Dermatol 129(6): 1319-

1321.

- Folk, J. E. & Cole, P. W. (1966). Identification of a functional cysteine essential for the activity of guinea pig liver transglutaminase. *J Biol Chem* 241(13): 3238-3240.
- Frost, P. & Van Scott, E. J. (1966). Ichthyosiform dermatoses. Classification based on anatomic and biometric observations. *Arch Dermatol* 94(2): 113-126.
- Fuijkschot, J., Cruysberg, J. R., Willemsen, M. A., Keunen, J. E. & Theelen, T. (2008). Subclinical changes in the juvenile crystalline macular dystrophy in Sjogren-Larsson syndrome detected by optical coherence tomography. *Ophthalmology* 115(5): 870-875.
- Fuijkschot, J., Maassen, B., Gorter, J. W., Gerven, M. & Willemsen, M. (2009). Speech-language performance in Sjogren-Larsson syndrome. *Dev Neurorehabil* 12(2): 106-112.
- Fuijkschot, J., Theelen, T., Seyger, M. M., van der Graaf, M., de Groot, I. J., Wevers, R. A., Wanders, R. J., Waterham, H. R. & Willemsen, M. A. (2012). Sjogren-Larsson syndrome in clinical practice. *J Inherit Metab Dis* 35(6): 955-962.
- Gaucher, P. (1882).De l'epithelioma primitive de la rate, hypertrophie idiopathique de la rate sans leucemie. In *Faculté de Médecine*Paris, France: Faculté de Médecine de Paris.
- Ghadially, R., Williams, M. L., Hou, S. Y. & Elias, P. M. (1992). Membrane structural abnormalities in the stratum corneum of the autosomal recessive ichthyoses. *J Invest Dermatol* 99(6): 755-763.
- Ginns, E. I., Choudary, P. V., Martin, B. M., Winfield, S., Stubblefield, B., Mayor, J., Merkle-Lehman, D., Murray, G. J., Bowers, L. A. & Barranger, J. A. (1984). Isolation of cDNA clones for human beta-glucocerebrosidase using the lambda gt11 expression system. *Biochem Biophys Res Commun* 123(2): 574-580.
- Goldsmith, L. A., Baden, H. P., Roth, S. I., Colman, R., Lee, L. & Fleming, B. (1974). Vertebral epidermal transamidases. *Biochim Biophys Acta* 351(1): 113-125.
- Goldsmith, L. A. & Martin, C. M. (1975). Human epidermal transamidase. J Invest Dermatol 64(5): 316-321.
- Grall, A., Guaguere, E., Planchais, S., Grond, S., Bourrat, E., Hausser, I., Hitte, C., Le Gallo, M., Derbois, C., Kim, G. J., Lagoutte, L., Degorce-Rubiales, F., Radner, F. P., Thomas, A., Kury, S., Bensignor, E., Fontaine, J., Pin, D., Zimmermann, R., Zechner, R., Lathrop, M., Galibert, F., Andre, C. & Fischer, J. (2012). PNPLA1 mutations cause autosomal recessive congenital ichthyosis in golden retriever dogs and humans. *Nat Genet* 44(2): 140-147.
- Hackett, B. C., Fitzgerald, D., Watson, R. M., Hol, F. A. & Irvine, A. D. (2010). Genotypephenotype correlations with TGM1: clustering of mutations in the bathing suit ichthyosis and self-healing collodion baby variants of lamellar ichthyosis. *Br J Dermatol* 162(2): 448-451.
- Happle, R. (1979). X-linked dominant chondrodysplasia punctata. Review of literature and report of a case. *Hum Genet* 53(1): 65-73.
- Hazen, P. G., Carney, P. & Lynch, W. S. (1989). Keratitis, ichthyosis, and deafness syndrome with development of multiple cutaneous neoplasms. *Int J Dermatol* 28(3): 190-191.
- Herman, G. E. (2000). X-Linked dominant disorders of cholesterol biosynthesis in man and mouse. *Biochim Biophys Acta* 1529(1-3): 357-373.
- Hernandez-Martin, A., Garcia-Doval, I., Aranegui, B., de Unamuno, P., Rodriguez-Pazos, L., Gonzalez-Ensenat, M. A., Vicente, A., Martin-Santiago, A., Garcia-Bravo, B., Feito, M., Baselga, E., Ciria, S., de Lucas, R., Ginarte, M., Gonzalez-Sarmiento, R. & Torrelo, A. (2012). Prevalence of autosomal recessive congenital ichthyosis: a population-based study

using the capture-recapture method in Spain. JAm Acad Dermatol 67(2): 240-244.

- Hitomi, K., Yamagiwa, Y., Ikura, K., Yamanishi, K. & Maki, M. (2000). Characterization of human recombinant transglutaminase 1 purified from baculovirus-infected insect cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 64(10): 2128-2137.
- Hoang, M. P., Carder, K. R., Pandya, A. G. & Bennett, M. J. (2004). Ichthyosis and keratotic follicular plugs containing dystrophic calcification in newborns: distinctive histopathologic features of x-linked dominant chondrodysplasia punctata (Conradi-Hunermann-Happle syndrome). *Am J Dermatopathol* 26(1): 53-58.
- Holleran, W. M., Ginns, E. I., Menon, G. K., Grundmann, J. U., Fartasch, M., McKinney, C. E., Elias, P. M. & Sidransky, E. (1994). Consequences of beta-glucocerebrosidase deficiency in epidermis. Ultrastructure and permeability barrier alterations in Gaucher disease. *J Clin Invest* 93(4): 1756-1764.
- House, C., Wettenhall, R. E. & Kemp, B. E. (1987). The influence of basic residues on the substrate specificity of protein kinase C. *J Biol Chem* 262(2): 772-777.
- Huber, M., Rettler, I., Bernasconi, K., Frenk, E., Lavrijsen, S. P., Ponec, M., Bon, A., Lautenschlager, S., Schorderet, D. F. & Hohl, D. (1995). Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. *Science* 267(5197): 525-528.
- Humbert, P. & Agache, P. (1991). Acquired ichthyosis: a new cutaneous marker of autoimmunity. *Arch Dermatol* 127(2): 263-264.
- Hunter, J., Savin, J. & Dahl, M. (2002). *Clinical Dermatology*. Massachusetts, USA. Oxford, UK. Victoria, Australia.
- Iismaa, S. E., Holman, S., Wouters, M. A., Lorand, L., Graham, R. M. & Husain, A. (2003). Evolutionary specialization of a tryptophan indole group for transition-state stabilization by eukaryotic transglutaminases. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(22): 12636-12641.
- Iismaa, S. E., Mearns, B. M., Lorand, L. & Graham, R. M. (2009). Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiol Rev* 89(3): 991-1023.
- Irvine, A. D. (2007). Fleshing out filaggrin phenotypes. J Invest Dermatol 127(3): 504-507.
- Irvine, A. D. & McLean, W. H. (2006). Breaking the (un)sound barrier: filaggrin is a major gene for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 126(6): 1200-1202.
- Israeli, S., Goldberg, I., Fuchs-Telem, D., Bergman, R., Indelman, M., Bitterman-Deutsch, O., Harel, A., Mashiach, Y., Sarig, O. & Sprecher, E. (2013). Non-syndromic autosomal recessive congenital ichthyosis in the Israeli population. *Clin Exp Dermatol* 38(8): 911-916.
- Israeli, S., Khamaysi, Z., Fuchs-Telem, D., Nousbeck, J., Bergman, R., Sarig, O. & Sprecher, E. (2011). A mutation in LIPN, encoding epidermal lipase N, causes a late-onset form of autosomal-recessive congenital ichthyosis. *Am J Hum Genet* 88(4): 482-487.
- Jacyk, W. K. (2005). Bathing-suit ichthyosis. A peculiar phenotype of lamellar ichthyosis in South African blacks. *Eur J Dermatol* 15(6): 433-436.
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Rastam, M., Colineaux, C., Gillberg, I. C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., Bourgeron, T. & Paris Autism Research International Sibpair, S. (2003). Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet* 34(1): 27-29.
- Jennemann, R., Rabionet, M., Gorgas, K., Epstein, S., Dalpke, A., Rothermel, U., Bayerle, A., van der Hoeven, F., Imgrund, S., Kirsch, J., Nickel, W., Willecke, K., Riezman, H., Grone, H. J. & Sandhoff, R. (2012). Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier

disruption. Hum Mol Genet 21(3): 586-608.

- Jobard, F., Lefevre, C., Karaduman, A., Blanchet-Bardon, C., Emre, S., Weissenbach, J., Ozguc, M., Lathrop, M., Prud'homme, J. F. & Fischer, J. (2002). Lipoxygenase-3 (ALOXE3) and 12(R)-lipoxygenase (ALOX12B) are mutated in non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma (NCIE) linked to chromosome 17p13.1. *Hum Mol Genet* 11(1): 107-113.
- Jobsis, A. C., De Groot, W. P., Tigges, A. J., De Bruijn, H. W., Rijken, Y., Meijer, A. E. & Marinkovic-Ilsen, A. (1980). X-linked ichthyosis and X-linked placental sulfatase deficiency: a disease entity. Histochemical observations. *Am J Pathol* 99(2): 279-289.
- Kamalpour, L., Rice, Z. P., Pavlis, M., Veledar, E. & Chen, S. C. (2010). Reliable methods to evaluate the clinical severity of ichthyosis. *Pediatr Dermatol* 27(2): 148-153.
- Kamo, M., Ohyama, M., Kosaki, K., Amagai, M., Ebihara, T., Nakayama, J. & Ishiko, A. (2011). Ichthyosis follicularis, alopecia, and photophobia syndrome: a case report and a pathological insight into pilosebaceous anomaly. *Am J Dermatopathol* 33(4): 403-406.
- Kaplan, M. H., Sadick, N. S., McNutt, N. S., Talmor, M., Coronesi, M. & Hall, W. W. (1993). Acquired ichthyosis in concomitant HIV-1 and HTLV-II infection: a new association with intravenous drug abuse. J Am Acad Dermatol 29(5 Pt 1): 701-708.
- Kelley, R. I., Wilcox, W. G., Smith, M., Kratz, L. E., Moser, A. & Rimoin, D. S. (1999). Abnormal sterol metabolism in patients with Conradi-Hunermann-Happle syndrome and sporadic lethal chondrodysplasia punctata. *Am J Med Genet* 83(3): 213-219.
- Kent, L., Emerton, J., Bhadravathi, V., Weisblatt, E., Pasco, G., Willatt, L. R., McMahon, R. & Yates, J. R. (2008). X-linked ichthyosis (steroid sulfatase deficiency) is associated with increased risk of attention deficit hyperactivity disorder, autism and social communication deficits. J Med Genet 45(8): 519-524.
- Kienesberger, P. C., Oberer, M., Lass, A. & Zechner, R. (2009). Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *J Lipid Res* 50 Suppl: S63-68.
- Kim, S. Y., Chung, S. I. & Steinert, P. M. (1995). Highly active soluble processed forms of the transglutaminase 1 enzyme in epidermal keratinocytes. J Biol Chem 270(30): 18026-18035.
- Kim, S. Y., Kim, I. G., Chung, S. I. & Steinert, P. M. (1994). The structure of the transglutaminase 1 enzyme. Deletion cloning reveals domains that regulate its specific activity and substrate specificity. *J Biol Chem* 269(45): 27979-27986.
- Kirk, J. M., Grant, D. B., Besser, G. M., Shalet, S., Quinton, R., Smith, C. S., White, M., Edwards, O. & Bouloux, P. M. (1994). Unilateral renal aplasia in X-linked Kallmann's syndrome. *Clin Genet* 46(3): 260-262.
- Kitatani, K., Sheldon, K., Rajagopalan, V., Anelli, V., Jenkins, R. W., Sun, Y., Grabowski, G. A., Obeid, L. M. & Hannun, Y. A. (2009). Involvement of acid beta-glucosidase 1 in the salvage pathway of ceramide formation. *J Biol Chem* 284(19): 12972-12978.
- Korsgren, C., Lawler, J., Lambert, S., Speicher, D. & Cohen, C. M. (1990). Complete amino acid sequence and homologies of human erythrocyte membrane protein band 4.2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(2): 613-617.
- Krakowski, A., Brenner, S., Covo, J., Loewenthal, M. & Baratz, M. (1973). Acquired ichthyosis in Kaposi's sarcoma. *Dermatologica* 147(5): 348-351.
- Krishnamurthy, S., Kapoor, S. & Yadav, S. (2007). Nephrotic syndrome with X-linked ichthyosis, Kallmann Syndrome and unilateral renal agenesis. *Indian Pediatr* 44(4): 301-303.
- Kubilus, J., Tarascio, A. J. & Baden, H. P. (1979). Steroid-sulfatase deficiency in sex-linked

ichthyosis. Am J Hum Genet 31(1): 50-53.

- Kurosawa, M., Takagi, A., Tamakoshi, A., Kawamura, T., Inaba, Y., Yokoyama, K., Kitajima, Y., Aoyama, Y., Iwatsuki, K. & Ikeda, S. (2013). Epidemiology and clinical characteristics of bullous congenital ichthyosiform erythroderma (keratinolytic ichthyosis) in Japan: results from a nationwide survey. J Am Acad Dermatol 68(2): 278-283.
- Kutting, B., Metze, D., Luger, T. A. & Bonsmann, G. (1996). Mycosis fungoides presenting as an acquired ichthyosis. *J Am Acad Dermatol* 34(5 Pt 2): 887-889.
- Laiho, E., Ignatius, J., Mikkola, H., Yee, V. C., Teller, D. C., Niemi, K. M., Saarialho-Kere, U., Kere, J. & Palotie, A. (1997). Transglutaminase 1 mutations in autosomal recessive congenital ichthyosis: private and recurrent mutations in an isolated population. Am J Hum Genet 61(3): 529-538.
- Langlois, S., Armstrong, L., Gall, K., Hulait, G., Livingston, J., Nelson, T., Power, P., Pugash, D., Siciliano, D., Steinraths, M. & Mattman, A. (2009). Steroid sulfatase deficiency and contiguous gene deletion syndrome amongst pregnant patients with low serum unconjugated estriols. *Prenat Diagn* 29(10): 966-974.
- Laumonnier, F., Bonnet-Brilhault, F., Gomot, M., Blanc, R., David, A., Moizard, M. P., Raynaud, M., Ronce, N., Lemonnier, E., Calvas, P., Laudier, B., Chelly, J., Fryns, J. P., Ropers, H. H., Hamel, B. C., Andres, C., Barthelemy, C., Moraine, C. & Briault, S. (2004). X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum Genet* 74(3): 552-557.
- Lee, K. N., Arnold, S. A., Birckbichler, P. J., Patterson, M. K., Jr., Fraij, B. M., Takeuchi, Y. & Carter, H. A. (1993). Site-directed mutagenesis of human tissue transglutaminase: Cys-277 is essential for transglutaminase activity but not for GTPase activity. *Biochim Biophys Acta* 1202(1): 1-6.
- Lefevre, C., Audebert, S., Jobard, F., Bouadjar, B., Lakhdar, H., Boughdene-Stambouli, O., Blanchet-Bardon, C., Heilig, R., Foglio, M., Weissenbach, J., Lathrop, M., Prud'homme, J. F. & Fischer, J. (2003). Mutations in the transporter ABCA12 are associated with lamellar ichthyosis type 2. *Hum Mol Genet* 12(18): 2369-2378.
- Lefevre, C., Bouadjar, B., Ferrand, V., Tadini, G., Megarbane, A., Lathrop, M., Prud'homme, J. F. & Fischer, J. (2006). Mutations in a new cytochrome P450 gene in lamellar ichthyosis type 3. *Hum Mol Genet* 15(5): 767-776.
- Lefevre, C., Bouadjar, B., Karaduman, A., Jobard, F., Saker, S., Ozguc, M., Lathrop, M., Prud'homme, J. F. & Fischer, J. (2004). Mutations in ichthyin a new gene on chromosome 5q33 in a new form of autosomal recessive congenital ichthyosis. *Hum Mol Genet* 13(20): 2473-2482.
- Little, E. G. (1929). Acquired Ichthyosis. Proc R Soc Med 22(12): 1537-1538.
- Lorand, L. & Graham, R. M. (2003). Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(2): 140-156.
- Lykkesfeldt, G., Nielsen, M. D. & Lykkesfeldt, A. E. (1984). Placental steroid sulfatase deficiency: biochemical diagnosis and clinical review. *Obstet Gynecol* 64(1): 49-54.
- Macarov, M., Zeigler, M., Newman, J. P., Strich, D., Sury, V., Tennenbaum, A. & Meiner, V. (2007). Deletions of VCX-A and NLGN4: a variable phenotype including normal intellect. *J Intellect Disabil Res* 51(Pt 5): 329-333.
- Magert, H. J., Standker, L., Kreutzmann, P., Zucht, H. D., Reinecke, M., Sommerhoff, C. P., Fritz, H. & Forssmann, W. G. (1999). LEKTI, a novel 15-domain type of human serine proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 274(31): 21499-21502.

- Martul, P., Pineda, J., Levilliers, J., Vazquez, J. A., Rodriguez-Soriano, J., Loridan, L. & Diaz-Perez, J. L. (1995). Hypogonadotrophic hypogonadism with hyposmia, X-linked ichthyosis, and renal malformation syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 42(2): 121-128.
- Maya-Nunez, G., Cuevas-Covarrubias, S., Zenteno, J. C., Ulloa-Aguirre, A., Kofman-Alfaro, S. & Mendez, J. P. (1998). Contiguous gene syndrome due to deletion of the first three exons of the Kallmann gene and complete deletion of the steroid sulphatase gene. *Clin Endocrinol (Oxf)* 48(6): 713-718.
- Mazereeuw-Hautier, J., Aufenvenne, K., Deraison, C., Ahvazi, B., Oji, V., Traupe, H. & Hovnanian, A. (2009). Acral self-healing collodion baby: report of a new clinical phenotype caused by a novel TGM1 mutation. *Br J Dermatol* 161(2): 456-463.
- Megarbane, H. & Megarbane, A. (2011). Ichthyosis follicularis, alopecia, and photophobia (IFAP) syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 6: 29.
- Menni, S., Boccardi, D. & Brusasco, A. (2000). Ichthyosis revealing coeliac disease. Eur J Dermatol 10(5): 398-399.
- Menon, I. A. & Hoberman, H. F. (1969). Dermatological writings of ancient India. *Medical history* 13(4): 387-392.
- Micanovic, R., Procyk, R., Lin, W. & Matsueda, G. R. (1994). Role of histidine 373 in the catalytic activity of coagulation factor XIII. *J Biol Chem* 269(12): 9190-9194.
- Mizrachi-Koren, M., Geiger, D., Indelman, M., Bitterman-Deutsch, O., Bergman, R. & Sprecher, E. (2005). Identification of a novel locus associated with congenital recessive ichthyosis on 12p11.2-q13. *J Invest Dermatol* 125(3): 456-462.
- Mizutani, Y., Kihara, A. & Igarashi, Y. (2006). LASS3 (longevity assurance homologue 3) is a mainly testis-specific (dihydro)ceramide synthase with relatively broad substrate specificity. *Biochem J* 398(3): 531-538.
- Mondal, A. K., Kumar, P. & Mondal, A. (2011). Bullous congenital ichthyosiform erythroderma. *Indian Pediatr* 48(12): 968.
- Moulick, A., Jana, A., Sarkar, N., Guha, P., Mahapatra, C. & Lallawmzuala, K. (2013). Non pitting edema, arthritis and ichthyosis; presenting manifestation of leprosy. *Indian J Lepr* 85(2): 83-86.
- Muller, F. B., Huber, M., Kinaciyan, T., Hausser, I., Schaffrath, C., Krieg, T., Hohl, D., Korge, B. P. & Arin, M. J. (2006). A human keratin 10 knockout causes recessive epidermolytic hyperkeratosis. *Hum Mol Genet* 15(7): 1133-1141.
- Murthy, S. N., Iismaa, S., Begg, G., Freymann, D. M., Graham, R. M. & Lorand, L. (2002). Conserved tryptophan in the core domain of transglutaminase is essential for catalytic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5): 2738-2742.
- Mycek, M. J., Clarke, D. D., Neidle, A. & Waelsch, H. (1959). Amine incorporation into insulin as catalyzed by transglutaminase. *Arch Biochem Biophys* 84: 528-540.
- Naiki, M., Mizuno, S., Yamada, K., Yamada, Y., Kimura, R., Oshiro, M., Okamoto, N., Makita, Y., Seishima, M. & Wakamatsu, N. (2012). MBTPS2 mutation causes BRESEK/BRESHECK syndrome. *Am J Med Genet A* 158A(1): 97-102.
- Nakahara, K., Ohkuni, A., Kitamura, T., Abe, K., Naganuma, T., Ohno, Y., Zoeller, R. A. & Kihara, A. (2012). The Sjogren-Larsson syndrome gene encodes a hexadecenal dehydrogenase of the sphingosine 1-phosphate degradation pathway. *Mol Cell* 46(4): 461-471.
- Neidle, A., Clarke, D. D., Mycek, M. J. & Waelsch, H. (1958). Enzymic exchange of protein amide groups. *Arch Biochem Biophys* 77(1): 227-229.

- Nelson, D. R., Zeldin, D. C., Hoffman, S. M., Maltais, L. J., Wain, H. M. & Nebert, D. W. (2004). Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* 14(1): 1-18.
- Nemes, Z., Marekov, L. N. & Steinert, P. M. (1999). Involucrin cross-linking by transglutaminase 1. Binding to membranes directs residue specificity. *J Biol Chem* 274(16): 11013-11021.
- Netherton, E. W. (1958). A unique case of trichorrhexis nodosa; bamboo hairs. *AMA Arch Derm* 78(4): 483-487.
- Niemi, K. M., Kanerva, L. & Kuokkanen, K. (1991). Recessive ichthyosis congenita type II. Arch Dermatol Res 283(4): 211-218.
- Nikolski, P. (1897).Contribution à l'étude des anomalies congénitales de keratinisation., Vol. IV, 433-442 Moscuo: Comptes-Réndus XII Congres Int Medicine.
- Nousbeck, J., Padalon-Brauch, G., Fuchs-Telem, D., Israeli, S., Sarig, O., Sheffer, R. & Sprecher, E. (2013). Semidominant inheritance in epidermolytic ichthyosis. *J Invest Dermatol* 133(11): 2626-2628.
- Numata, S., Teye, K., Krol, R. P., Karashima, T., Fukuda, S., Matsuda, M., Ishii, N., Furumura, M., Ohata, C., Saminathan, S. D., Ariffin, R., Pramono, Z. A., Leong, K. F., Hamada, T. & Hashimoto, T. (2015). Mutation study for 9 genes in 23 unrelated patients with autosomal recessive congenital ichthyosis in Japan and Malaysia. *J Dermatol Sci* 78(1): 82-85.
- Oeffner, F., Fischer, G., Happle, R., Konig, A., Betz, R. C., Bornholdt, D., Neidel, U., Boente Mdel, C., Redler, S., Romero-Gomez, J., Salhi, A., Vera-Casano, A., Weirich, C. & Grzeschik, K. H. (2009). IFAP syndrome is caused by deficiency in MBTPS2, an intramembrane zinc metalloprotease essential for cholesterol homeostasis and ER stress response. *Am J Hum Genet* 84(4): 459-467.
- Oji, V., Hautier, J. M., Ahvazi, B., Hausser, I., Aufenvenne, K., Walker, T., Seller, N., Steijlen, P. M., Kuster, W., Hovnanian, A., Hennies, H. C. & Traupe, H. (2006). Bathing suit ichthyosis is caused by transglutaminase-1 deficiency: evidence for a temperature-sensitive phenotype. *Hum Mol Genet* 15(21): 3083-3097.
- Oji, V., Seller, N., Sandilands, A., Gruber, R., Gerss, J., Huffmeier, U., Hamm, H., Emmert, S., Aufenvenne, K., Metze, D., Luger, T., Loser, K., Hausser, I., Traupe, H. & McLean, W. H. (2009). Ichthyosis vulgaris: novel FLG mutations in the German population and high presence of CD1a+ cells in the epidermis of the atopic subgroup. *Br J Dermatol* 160(4): 771-781.
- Oji, V., Tadini, G., Akiyama, M., Blanchet Bardon, C., Bodemer, C., Bourrat, E., Coudiere, P., DiGiovanna, J. J., Elias, P., Fischer, J., Fleckman, P., Gina, M., Harper, J., Hashimoto, T., Hausser, I., Hennies, H. C., Hohl, D., Hovnanian, A., Ishida-Yamamoto, A., Jacyk, W. K., Leachman, S., Leigh, I., Mazereeuw-Hautier, J., Milstone, L., Morice-Picard, F., Paller, A. S., Richard, G., Schmuth, M., Shimizu, H., Sprecher, E., Van Steensel, M., Taieb, A., Toro, J. R., Vabres, P., Vahlquist, A., Williams, M. & Traupe, H. (2010). Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses: results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Soreze 2009. J Am Acad Dermatol 63(4): 607-641.
- Paik, Y. K., Billheimer, J. T., Magolda, R. L. & Gaylor, J. L. (1986). Microsomal enzymes of cholesterol biosynthesis from lanosterol. Solubilization and purification of steroid 8isomerase. *J Biol Chem* 261(14): 6470-6477.
- Paramsothy, Y., Ilchyshyn, A., Sidky, K. & Byrne, J. P. (1987). Lymphomatoid granulomatosis mimicking bronchial carcinoma. *Postgrad Med J* 63(739): 381-384.

- Parenteau, N. L., Pilato, A. & Rice, R. H. (1986). Induction of keratinocyte type-I transglutaminase in epithelial cells of the rat. *Differentiation* 33(2): 130-141.
- Patel, N., Spencer, L. A., English, J. C., 3rd & Zirwas, M. J. (2006). Acquired ichthyosis. J Am Acad Dermatol 55(4): 647-656.
- Pedersen, L. C., Yee, V. C., Bishop, P. D., Le Trong, I., Teller, D. C. & Stenkamp, R. E. (1994). Transglutaminase factor XIII uses proteinase-like catalytic triad to crosslink macromolecules. *Protein Sci* 3(7): 1131-1135.
- Peterson, L. L. & Wuepper, K. D. (1984). Epidermal and hair follicle transglutaminases and crosslinking in skin. *Mol Cell Biochem* 58(1-2): 99-111.
- Pigg, M., Gedde-Dahl, T., Jr., Cox, D., Hausser, I., Anton-Lamprecht, I. & Dahl, N. (1998). Strong founder effect for a transglutaminase 1 gene mutation in lamellar ichthyosis and congenital ichthyosiform erythroderma from Norway. *Eur J Hum Genet* 6(6): 589-596.
- Pisano, J. J., Finlayson, J. S. & Peyton, M. P. (1969). Chemical and enzymic detection of protein cross-links. Measurement of epsilon-(gamma-glutamyl)lysine in fibrin polymerized by factor XIII. *Biochemistry* 8(3): 871-876.
- Pixley, R. A., Espinola, R. G., Ghebrehiwet, B., Joseph, K., Kao, A., Bdeir, K., Cines, D. B. & Colman, R. W. (2011). Interaction of high-molecular-weight kininogen with endothelial cell binding proteins suPAR, gC1qR and cytokeratin 1 determined by surface plasmon resonance (BiaCore). *Thromb Haemost* 105(6): 1053-1059.
- Presland, R. B., Haydock, P. V., Fleckman, P., Nirunsuksiri, W. & Dale, B. A. (1992). Characterization of the human epidermal profilaggrin gene. Genomic organization and identification of an S-100-like calcium binding domain at the amino terminus. *J Biol Chem* 267(33): 23772-23781.
- Radner, F. P., Marrakchi, S., Kirchmeier, P., Kim, G. J., Ribierre, F., Kamoun, B., Abid, L., Leipoldt, M., Turki, H., Schempp, W., Heilig, R., Lathrop, M. & Fischer, J. (2013). Mutations in CERS3 cause autosomal recessive congenital ichthyosis in humans. *PLoS Genet* 9(6): e1003536.
- Raghunath, M., Hennies, H. C., Ahvazi, B., Vogel, M., Reis, A., Steinert, P. M. & Traupe, H. (2003). Self-healing collodion baby: a dynamic phenotype explained by a particular transglutaminase-1 mutation. *J Invest Dermatol* 120(2): 224-228.
- Rajpopat, S., Moss, C., Mellerio, J., Vahlquist, A., Ganemo, A., Hellstrom-Pigg, M., Ilchyshyn, A., Burrows, N., Lestringant, G., Taylor, A., Kennedy, C., Paige, D., Harper, J., Glover, M., Fleckman, P., Everman, D., Fouani, M., Kayserili, H., Purvis, D., Hobson, E., Chu, C., Mein, C., Kelsell, D. & O'Toole, E. (2011). Harlequin ichthyosis: a review of clinical and molecular findings in 45 cases. *Arch Dermatol* 147(6): 681-686.
- Rawson, R. B., Zelenski, N. G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M. T., Chang, T. Y., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. (1997). Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Mol Cell* 1(1): 47-57.
- Reese, M. G., Eeckman, F. H., Kulp, D. & Haussler, D. (1997). Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol* 4(3): 311-323.
- Reiches, A. J. (1950). Acquired ichthyosis; report of case associated with breast carcinoma. Urol Cutaneous Rev 54(3): 160.
- Rice, R. H., Rong, X. H. & Chakravarty, R. (1990). Proteolytic release of keratinocyte transglutaminase. *Biochem J* 265(2): 351-357.
- Richard, G. & Bale, S. J. (1993-2014). Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis. In

GeneReviews(R)(Eds R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger, T. D. Bird, C. R. Dolan, C. T. Fong, R. J. H. Smith and K. Stephens). Seattle (WA).

- Richard, G., Rouan, F., Willoughby, C. E., Brown, N., Chung, P., Ryynanen, M., Jabs, E. W., Bale, S. J., DiGiovanna, J. J., Uitto, J. & Russell, L. (2002). Missense mutations in GJB2 encoding connexin-26 cause the ectodermal dysplasia keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. *Am J Hum Genet* 70(5): 1341-1348.
- Rizzo, W. B. (1999). Sjogren-Larsson syndrome: explaining the skin-brain connection. *Neurology* 52(7): 1307-1308.
- Rodriguez-Pazos, L., Ginarte, M., Fachal, L., Toribio, J., Carracedo, A. & Vega, A. (2011). Analysis of TGM1, ALOX12B, ALOXE3, NIPAL4 and CYP4F22 in autosomal recessive congenital ichthyosis from Galicia (NW Spain): evidence of founder effects. *Br J Dermatol* 165(4): 906-911.
- Ronchese, F. (1943). Ichthyosiform atrophy of the skin in Hodgkin's disease. *Am J Clin Dermatology and syphilology* 47(6): 778-781.
- Russell, L. J., DiGiovanna, J. J., Rogers, G. R., Steinert, P. M., Hashem, N., Compton, J. G. & Bale, S. J. (1995). Mutations in the gene for transglutaminase 1 in autosomal recessive lamellar ichthyosis. *Nat Genet* 9(3): 279-283.
- Sarkar, N. K., Clarke, D. D. & Waelsch, H. (1957). An enzymically catalyzed incorporation of amines into proteins. *Biochim Biophys Acta* 25(2): 451-452.
- Scheinfeld, N., Libkind, M. & Freilich, S. (2001). New-onset ichthyosis and diabetes in a 14year-old. *Pediatr Dermatol* 18(6): 501-503.
- Shah, A. P., Shah, S. S. & Doshi, H. V. (1973). Accentuation of ichthyosis vulgaris due to associated leprosy. *Postgrad Med J* 49(570): 282-283.
- Shimomura, Y., Sato, N., Tomiyama, K., Takahashi, A. & Ito, M. (2006). A sporadic case of epidermolytic hyperkeratosis caused by a novel point mutation in the keratin 1 gene. *Clin Exp Dermatol* 31(2): 286-287.
- Sidransky, E., Fartasch, M., Lee, R. E., Metlay, L. A., Abella, S., Zimran, A., Gao, W., Elias, P. M., Ginns, E. I. & Holleran, W. M. (1996). Epidermal abnormalities may distinguish type 2 from type 1 and type 3 of Gaucher disease. *Pediatr Res* 39(1): 134-141.
- Sillen, A., Anton-Lamprecht, I., Braun-Quentin, C., Kraus, C. S., Sayli, B. S., Ayuso, C., Jagell, S., Kuster, W. & Wadelius, C. (1998). Spectrum of mutations and sequence variants in the FALDH gene in patients with Sjogren-Larsson syndrome. *Hum Mutat* 12(6): 377-384.
- Simon, M. & Green, H. (1985). Enzymatic cross-linking of involucrin and other proteins by keratinocyte particulates in vitro. *Cell* 40(3): 677-683.
- Sjogren, T. & Larsson, T. (1957). Oligophrenia in combination with congenital ichthyosis and spastic disorders; a clinical and genetic study. *Acta Psychiatr Neurol Scand Suppl* 113: 1-112.
- Skinner, B. A., Greist, M. C. & Norins, A. L. (1981). The keratitis, ichthyosis, and deafness (KID) syndrome. *Arch Dermatol* 117(5): 285-289.
- Smith, D. L., Smith, J. G., Wong, S. W. & deShazo, R. D. (1995). Netherton's syndrome: a syndrome of elevated IgE and characteristic skin and hair findings. J Allergy Clin Immunol 95(1 Pt 1): 116-123.
- Smith, F. J., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Sandilands, A., Campbell, L. E., Zhao, Y., Liao, H., Evans, A. T., Goudie, D. R., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Munro, C. S., Sergeant, A., O'Regan, G., Bale, S. J., Compton, J. G., DiGiovanna, J. J., Presland, R. B., Fleckman, P. & McLean, W. H. (2006). Loss-of-function mutations in the gene encoding

filaggrin cause ichthyosis vulgaris. Nat Genet 38(3): 337-342.

- Sneddon, I. B. (1955). Acquired ichthyosis in Hodgkin's disease. Br Med J 1(4916): 763-764.
- Sorek, R., Shemesh, R., Cohen, Y., Basechess, O., Ast, G. & Shamir, R. (2004). A non-EST-based method for exon-skipping prediction. *Genome Res* 14(8): 1617-1623.
- Soussi-Yanicostas, N., de Castro, F., Julliard, A. K., Perfettini, I., Chedotal, A. & Petit, C. (2002). Anosmin-1, defective in the X-linked form of Kallmann syndrome, promotes axonal branch formation from olfactory bulb output neurons. *Cell* 109(2): 217-228.
- Spelman, L. J., Strutton, G. M., Robertson, I. M. & Weedon, D. (1996). Acquired ichthyosis in bone marrow transplant recipients. *J Am Acad Dermatol* 35(1): 17-20.
- Steinert, P. M., Candi, E., Kartasova, T. & Marekov, L. (1998). Small proline-rich proteins are cross-bridging proteins in the cornified cell envelopes of stratified squamous epithelia. J Struct Biol 122(1-2): 76-85.
- Steinert, P. M., Cantieri, J. S., Teller, D. C., Lonsdale-Eccles, J. D. & Dale, B. A. (1981). Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(7): 4097-4101.
- Steinert, P. M., Chung, S. I. & Kim, S. Y. (1996). Inactive zymogen and highly active proteolytically processed membrane-bound forms of the transglutaminase 1 enzyme in human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 221(1): 101-106.
- Stone, D. L., Carey, W. F., Christodoulou, J., Sillence, D., Nelson, P., Callahan, M., Tayebi, N. & Sidransky, E. (2000a). Type 2 Gaucher disease: the collodion baby phenotype revisited. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 82(2): F163-166.
- Stone, D. L., Tayebi, N., Orvisky, E., Stubblefield, B., Madike, V. & Sidransky, E. (2000b). Glucocerebrosidase gene mutations in patients with type 2 Gaucher disease. *Hum Mutat* 15(2): 181-188.
- Sybert, V. P., Dale, B. A. & Holbrook, K. A. (1985). Ichthyosis vulgaris: identification of a defect in synthesis of filaggrin correlated with an absence of keratohyaline granules. J Invest Dermatol 84(3): 191-194.
- Tamura, J., Shinohara, M., Matsushima, T., Sawamura, M., Murakami, H. & Kubota, K. (1994). Acquired ichthyosis as a manifestation of abdominal recurrence of non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Hematol* 45(2): 191-192.
- Tayebi, N., Reissner, K. J., Lau, E. K., Stubblefield, B. K., Klineburgess, A. C., Martin, B. M. & Sidransky, E. (1998). Genotypic heterogeneity and phenotypic variation among patients with type 2 Gaucher's disease. *Pediatr Res* 43(5): 571-578.
- Thacher, S. M. (1989). Purification of keratinocyte transglutaminase and its expression during squamous differentiation. *J Invest Dermatol* 92(4): 578-584.
- Thacher, S. M. & Rice, R. H. (1985). Keratinocyte-specific transglutaminase of cultured human epidermal cells: relation to cross-linked envelope formation and terminal differentiation. *Cell* 40(3): 685-695.
- Toulza, E., Mattiuzzo, N. R., Galliano, M. F., Jonca, N., Dossat, C., Jacob, D., de Daruvar, A., Wincker, P., Serre, G. & Guerrin, M. (2007). Large-scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function. *Genome Biol* 8(6): R107.
- Traboulsi, E., Waked, N., Megarbane, H. & Megarbane, A. (2004). Ocular findings in ichthyosis follicularis-alopecia-photophobia (IFAP) syndrome. *Ophthalmic Genet* 25(2): 153-156.
- Tu, C. L. & Bikle, D. D. (2013). Role of the calcium-sensing receptor in calcium regulation of epidermal differentiation and function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 27(3): 415-427.

- Vahlquist, A., Bygum, A., Ganemo, A., Virtanen, M., Hellstrom-Pigg, M., Strauss, G., Brandrup, F. & Fischer, J. (2010). Genotypic and clinical spectrum of self-improving collodion ichthyosis: ALOX12B, ALOXE3, and TGM1 mutations in Scandinavian patients. *J Invest Dermatol* 130(2): 438-443.
- Vellodi, A., Tylki-Szymanska, A., Davies, E. H., Kolodny, E., Bembi, B., Collin-Histed, T., Mengel, E., Erikson, A., Schiffmann, R. & European Working Group on Gaucher, D. (2009). Management of neuronopathic Gaucher disease: revised recommendations. J Inherit Metab Dis 32(5): 660-664.
- Vergnat, M., Suzanne, J., Entraygues, H., Laurent, R., Gisselbrecht, H. & Agache, P. (1978). [Cutaneous manifestations of malabsorption diseases (author's transl)]. Ann Dermatol Venereol 105(12): 1009-1016.
- Virtanen, M., Smith, S. K., Gedde-Dahl, T., Jr., Vahlquist, A. & Bowden, P. E. (2003). Splice site and deletion mutations in keratin (KRT1 and KRT10) genes: unusual phenotypic alterations in Scandinavian patients with epidermolytic hyperkeratosis. *J Invest Dermatol* 121(5): 1013-1020.
- Washio, K., Fukunaga, A., Terai, M., Hitomi, K., Yamanishi, K. & Nishigori, C. (2014). Hypohidrosis plays a crucial role in the vicious circle of bathing suit ichthyosis: a case with summer exacerbation. *Acta Derm Venereol* 94(3): 349-350.
- Webster, D., France, J., Shapiro, L. & Weiss, R. (1978a). X-linked ichthyosis due to steroidsulphatase deficiency. *Lancet* 1(8055): 70-72.
- Webster, D., France, J. T., Shapiro, L. J. & Weiss, R. (1978b). X-linked ichthyosis due to steroidsulphatase deficiency. *Lancet* 1(8055): 70-72.
- Webster, J., Bluefarb, S. & Sickley, J. F. (1952). Ichthyosis associated with Hodgkin's disease. *AMA Arch Derm Syphilol* 65(3): 368-369.
- Wilson, P. A., Gardner, S. D., Lambie, N. M., Commans, S. A. & Crowther, D. J. (2006). Characterization of the human patatin-like phospholipase family. *J Lipid Res* 47(9): 1940-1949.
- Will, C. L. & Luhrmann, R. (2011). Spliceosome structure and function. Cold Spring Harb Perspect Biol 3(7).
- Willan, R. (1808). On cutaneous disease. Londres: J Johnson.
- Willemsen, M. A., Van Der Graaf, M., Van Der Knaap, M. S., Heerschap, A., Van Domburg, P. H., Gabreels, F. J. & Rotteveel, J. J. (2004). MR imaging and proton MR spectroscopic studies in Sjogren-Larsson syndrome: characterization of the leukoencephalopathy. *AJNR Am J Neuroradiol* 25(4): 649-657.
- Williams, M. L. & Elias, P. M. (1985). Heterogeneity in autosomal recessive ichthyosis. Clinical and biochemical differentiation of lamellar ichthyosis and nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma. Arch Dermatol 121(4): 477-488.
- Williams, M. L. & Elias, P. M. (1987). Genetically transmitted, generalized disorders of cornification. The ichthyoses. *Dermatol Clin* 5(1): 155-178.
- Yang, T., Liang, D., Koch, P. J., Hohl, D., Kheradmand, F. & Overbeek, P. A. (2004). Epidermal detachment, desmosomal dissociation, and destabilization of corneodesmosin in Spink5-/mice. *Genes Dev* 18(19): 2354-2358.
- Yeo, G. & Burge, C. B. (2004). Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol* 11(2-3): 377-394.
- Yu, Z., Schneider, C., Boeglin, W. E., Marnett, L. J. & Brash, A. R. (2003). The lipoxygenase gene ALOXE3 implicated in skin differentiation encodes a hydroperoxide isomerase.

Proc Natl Acad Sci U S A 100(16): 9162-9167.

- Yuspa, S. H. & Harris, C. C. (1974). Altered differentiation of mouse epidermal cells treated with retinyl acetate in vitro. *Exp Cell Res* 86(1): 95-105.
- Zheng, Y. & Brash, A. R. (2010). Dioxygenase activity of epidermal lipoxygenase-3 unveiled: typical and atypical features of its catalytic activity with natural and synthetic polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 285(51): 39866-39875.
- Zheng, Y., Yin, H., Boeglin, W. E., Elias, P. M., Crumrine, D., Beier, D. R. & Brash, A. R. (2011). Lipoxygenases mediate the effect of essential fatty acid in skin barrier formation: a proposed role in releasing omega-hydroxyceramide for construction of the corneocyte lipid envelope. *J Biol Chem* 286(27): 24046-24056.

ANEXOS

ANEXO 1. Artículo "A novel TGM1 mutation, leading to multiple splicing rearrangements, is associated with autosomal recessive congenital ichthyosis"

O. Ortega-Recalde, M. B. Moreno, J. I. Vergara, D. J. Fonseca, R. F. Rojas, H. Mosquera, C. L. Medina, C. M. Restrepo and P. Laissue

CLIN EXP DERMATOL. 2015 Oct;40(7):757-60 doi:10.1111/ced.12627

A novel *TGM1* mutation, leading to multiple splicing rearrangements, is associated with autosomal recessive congenital ichthyosis

O. Ortega-Recalde,¹ M. B. Moreno,¹ J. I. Vergara,^{2,3} D. J. Fonseca,^{1,4} R. F. Rojas,^{2,3} H. Mosquera,^{2,3} C. L. Medina,^{2,3} C. M. Restrepo^{1,4} and P. Laissue^{1,4}

¹Genetics Unit, GENUROS Group, Escuela de Medicina y Gencias de la Salud, Universidad del Rosario, Begotal, Colombia; ²Department of Dermatology, Universidad Autónoma de Bucaramanga, Bucaramanga, Colombia; ⁸Dermatology Unit, Clinica Carlos Ardila Lulle, Bucaramanga, Colombia; and ⁶Department of Molecular Genetics, Genética Molecular de Colombia, Bogotá, Colombia

dsi:10.1111/csd.12627

Summary

Autosomal recessive congenital ichthyosis (ARCI) is a group of rare, clinically heterogeneous skin disorders that affect cornification. ARCI includes lamellar ichthyosis, congenital ichthyosiform erythroderma and harlequin ichthyosis. TGM1 mutations cause > 50% of ARCI cases in the USA. We report two siblings with ARCI. They were found to carry a novel aetiological TGM1 mutation, which leads to the synthesis of multiple abnormal transcripts. These molecules resulted from three independent mechanisms: intron retention, exon skipping and activation of expand cryptic splice sites. Taken together, our findings expand the known TGM1 mutation repertoire, and provide an insight into the molecular mechanisms leading to ARCI phenotypes. These results could be useful for genetic counselling and future potential genotype–phenotype correlations.

Autosomal recessive congenital ichthyosis (ARCI) is a group of rare, clinically heterogeneous skin disorders that affect comification. Patients with ARCI (classically presenting epidermal scaling) can be affected by alopecia, palmar/plantar hyperkeratosis, hyperhidrosis, erythema and congenital collodion membrane. ARCI includes lamellar ichthyosis (LI), congenital ichthyosiform erythroderma (CIE) and harlequin ichthyosis (HI).¹ Although at least eight genes have been identified as related to the aetiology of ARCI, a clear genotype correlation (especially for CIE and LI) has not been established. This might be due to the overlapping clinical features observed in these patients and to the molecular complexity underlying skin pathophysiol-

Accepted for publication 15 October 2014

ogy. At least 60% of LI and CIE cases originate from mutations in the TGM1, NIPAL4 and ALOX12B genes.¹ TGM1 mutations cause > 50% of ARCI cases in the USA.² The TGM1 gene encodes the transglutaminase (TGase)-1 protein, a critical enzyme implicated in cornified cell envelope synthesis.^{3,4} More than 135 TGM1 ARCI aetiological sequence variants have been reported to date, most of which consist of missense and nonsense mutations.^{1,2,5}

We report two siblings with ARCI, who were found to carry a novel aetiological TGM1 mutation that leads to the synthesis of multiple abnormal transcripts.

Report

The first patient, P1 (a 30-year-old woman), presented with mildly erythematous scales that had been present since birth. The lesions had progressively increased in number during her adult life. Her palms and soles were affected by painful skin fissures, and she had recurrent ectropion and corneal ulcerative lesions. Physical examination when she was 29 years old

Correspondence: Dr Paul Laissue, Unidad de Genética, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

E-mail: paul laissue@urosario.edu.co

Conflict of interest: the authors declare that they have no conflicts of interest.

revealed alopecia (frontal and temporal), white and brown lesions on her scalp, eclabium, ectropion, thin eyebrows, numerous slightly erythematous grey/ brown desquamative plaques (located on the face, trunk and extremities), hyperhidrosis, diffuse palmoplantar keratoderma with fissures, nail dystrophy and heat intolerance (Fig. 1). P1's sibling, P2 (a 34-yearold woman), has similar clinical cutaneous features to those of PI. No skin abnormalities have been reported for the other siblings, two sisters (S1, III:2 and S2, III:4) and one brother (B1, III:6). The probands' parents (II:2 and II:3) were reported to be consanguineous (Fig. 1).

We carried out genetic investigations. The study was approved by the ethics committee at Universidad del Rosario, and was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. All participants provided written informed consent.



(b) P2-III:3

(c) P2-III:3



Figure 1 (a) Pedigree of a family affected by autosomal recessive congenital ichthyosis (ARCI). Black symbols refer to affected individuals, while circles in some second- and third-generation individuals (II:2, II:3 and III:2) represent the *TGMI* c.3 20–2 A×G mutation in the heterosygous state. (b) Clinical characteristics of patient with ARCI, showing frontal alopedia, sparse and thin hair, sparse eyebrows and eyelashes, ectropion, eclabium, and bright and slightly erythematous skin. (c) Hands of patient with ARCI, showing diffuse palmar keratoderma with fissures and white scales.

We used direct sequencing on the TGM1 coding regions and intron-exon boundaries (reference sequence: ENSG00000092295.7) on samples from P1 and P2 (primer sequences and PCR conditions are available upon request). Skin biopsy, RNA extraction and cDNA synthesis were performed using standard procedures. PCR was used to amplify a fragment encompassing exons 2-4 (primer sequences are available upon request). Amplicons were cloned into the pCR4-TOPO-TA plasmid (Life Technologies, Foster City, CA, USA) and directly sequenced.

The clinical features of both probands were compatible with ARCI (probably CIE), and therefore the complete *TGM1* complete coding region was sequenced. These assays revealed that both patients had the homozygous c.320-2A>G sequence variant, which might have altered the intron 2 splicing acceptor site (Figs 2 and 3). This variant was not present in public databases of single nucleotide polymorphisms, Sequencing revealed that S1 and her parents were both heterozygous for this variant.

Theoretically, the c.320-2A>G mutation could lead to retention of intron 2 (Mechanism 1, Mech1), skipping of exon 3 (Mech2) or activation of upstream potential cryptic splice sites (Mech3). To explore these assumptions we took skin biopsies from P2, and performed RNA extraction. PCR was then used to amplify a fragment encompassing exons 2–4. Gel electrophoresis showed distinct amplicons, thereby suggesting the presence of many abnormal transcripts.

Amplicons were then cloned and directly sequenced to establish the sequences of these molecules accurately. Sequence analysis revealed multiple transcripts resulting from the underlying mechanisms of Mech1-3 (Figs 2 and 3). More precisely, the Mech1 transcript product was related to the synthesis of a 117residue truncated protein lacking the catalytic core domain. It has been demonstrated that some patients with ARCI having mutations leading to the synthesis of truncated TGM1 display low levels of mRNA transcript, protein or enzyme bioactivity.2.6.7 Interestingly, it has been shown that patients carrying TGM1 mutations that are predicted to generate premature stop codons are more likely to be affected by hyperhidrosis and overheating, two clinical features observed in our patients.2.5 The Mach2 transcript product was predicted to generate a 63 amino acid deletion (residues 107-169), located in the protein's amino-terminal B-sandwich domain. This mutation, which was not predicted to affect the protein's C-terminal sequence, might have caused abnormal folding and impairment of intra/intermolecular interaction. It was



Figure 2 (a,b) TGM1 chromatograms of patients. (a) Genomic DNA sequencing displaying the homosygous c.320–2A>G mutation (gDNA WT, wild-type reference sequence). (b) Abnormal splicing rearrangements (intron retention, exon skipping and cryptic splice site activation) caused by the c.320–2A>G mutation. The predicted amino acid sequence is indicated under each chromatogram.



also determined that a cryptic splice site (located 12 nucleotides upstream of the canonical splice acceptor site) generated a 12 bp in-frame nucleotide deletion. This variant was predicted to produce a four-residue deletion (positions 108-111) located in an evolutionarily highly conserved functional domain. Taken together, our findings expand the known TGM1 mutation repertoire and provide an insight into the molecular mechanisms leading to ARCI phenotypes. These results could be useful for genetic counselling and future potential genotype-phenotype correlations.

Learning points

- ARCI comprises a group of rare, clinically heterogeneous skin disorders that affect cornification.
- At least eight genes have been identified as related to the aetiology of ARCI.
- More than 135 TGM1 ARCI aetiological sequence variants have been reported to date.
- TGM1 mutations can generate multiple splicing rearrangements leading to ARCI.
- TGM1 genotyping is useful for clinicians to establish the accurate molecular aetiology of ARCL.
- Sequence analysis of TGM1 and other ARCI genes can help patients and their families to understand their disease.

Acknowledgement

This study was supported by the Universidad del Rosario (Grant CS/Genetics 2015).

References

- 1 Oji V, Tadini G, Akiyama M et al. Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses: results of the Pirst Ichthyosis Consensus Conference in Sorèze 2009. J Am Acad Dermatol 2010; 63: 607–41.
- 2 Far asat S, Wei M-H, Herman M et al. Novel transglutaminase-1 mutations and genotype-phenotype investigations of 104 patients with autosomal recessive congenital ichthyosis in the USA. J Med Genet 2009; 46: 103-11.
- 3 Nemes Z, Marekov LN, Fésüs L, Steinert PM. A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain omega-hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation. Prac Natl Acad Sci US A 1999; 96: 8402–7.
- 4 Eckert RL, Sturniolo MT, Broome A-M et al. Transglutaminase function in epidermis. J Invest Dermatol 2005; 124: 481–92.
- 5 Herman MI., Farasat S. Steinbach PJ et al. Transglutaminase-1 gene mutations in autosomal recessive congenital ichthyosis: summary of mutations (including 23 novel) and modeling of TGase-1. Hum Mutat 2009; 30: 537–47.
- 6 Huber M, Rettler I, Bernasconi K et al. Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. *Science* 1995; 267: 525–8.
- 7 Candi E, Melino G, Lahm A et al. Transglutaminase 1 mutations in lamellar ichthyosis. Loss of activity due to failure of activation by proteolytic processing. J Biol Chem 1998; 273: 13693-702.