

TESIS DOCTORAL

# Estudio de una estrategia terapéutica para el tratamiento de la enfermedad de Dent-1 utilizando líneas celulares humanas y el ratón *knock-in* *Clcn5V523del*

Glorián K. Mura Escorche

2024













TESIS DOCTORAL

**Estudio de una estrategia terapéutica para el  
tratamiento de la enfermedad de Dent-1 utilizando  
líneas celulares humanas y el ratón *knock-in*  
*Clcn5V523del***

Memoria para acceder al grado de Doctor  
que presenta la graduada en Biología  
Glorián Katerine Mura Escorche

Directoras

Dra. Aida Elizabeth Córdoba Lanús

Dra. Elena Ramos Trujillo

Programa de doctorado en Ciencias de la Salud  
Unidad de Investigación - HUNSC

2024



## Autorización de las directoras de la tesis doctoral

La Dra. Aída Elizabeth Córdoba Lanús y la Dra. Elena Ramos Trujillo, directoras de la tesis doctoral presentada por la Graduada en Biología Glorian Katerine Mura Escorche.

Certifican que:

La memoria presentada por la Graduada en Biología Glorian Katerine Mura Escorche titulada “Estudio de una estrategia terapéutica para el tratamiento de la enfermedad de Dent-1 utilizando líneas celulares humanas y el ratón knock-in Clcn5V523del” ha sido realizada bajo nuestra dirección en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria y en el departamento de Medicina Interna, Dermatología y Psiquiatría de la Universidad de La Laguna.

Que, una vez revisada la memoria de Tesis, consideramos que reúne las condiciones de calidad y rigor científico, por lo que autorizamos a ser presentada y defendida ante el Tribunal designado para optar al grado de Doctor por la Universidad de La Laguna.

San Cristóbal de La Laguna, a 10 de Diciembre de 2023

Fdo: Dra. Aída Elizabeth  
Córdoba Lanús

Fdo: Dra. Elena Ramos  
Trujillo

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. <i>La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <a href="http://sede.ull.es/validacion">http://sede.ull.es/validacion</a></i>	
Identificador del documento: 6055743	Código de verificación: uYdGRS27
Firmado por: Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 13/12/2023 13:57:28
Elena Ramos Trujillo UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	13/12/2023 14:00:38



## Financiación

Este trabajo de investigación ha sido financiado por la Asociación de la Enfermedad de Dent (Asdent), por los proyectos PI17/00153 y PI20/00652, integrados en el Plan Nacional de I+D+I 2013-2016 y cofinanciados por el Instituto de Salud Carlos III y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional «Una manera de hacer Europa», y el proyecto PIFUN10/18 financiado por la Fundación Canaria Instituto de Investigación Sanitaria de Canarias.

El desarrollo de la presente Tesis Doctoral ha sido gracias al contrato predoctoral M-ULL para la formación de Doctores de la convocatoria 2019, financiado por el Ministerio de la Ciencia, Innovación y Universidades y la Universidad de La Laguna, del cual la doctoranda ha sido beneficiaria. Así como, por los contratos a cargo de los proyectos PIFUN10/18 y PIFIISC22/07 financiados por la Fundación Canaria Instituto de Investigación Sanitaria de Canarias (FIISC).





*“Es la calidad de las convicciones  
y no el número de seguidores  
lo que determina el éxito”*

Harry Potter y las Reliquias de la Muerte

*J. K. Rowling*



*A mi familia*



# Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Félix Claverie por darme la oportunidad de desarrollar la tesis doctoral en su grupo de investigación que, aunque no figura como mi director de tesis, ha participado de ese papel acogiéndome durante estos 6 años, aportando sabiduría y carácter a mi camino científico.

A mis directoras, la Dra. Elena Ramos y la Dra. Elizabeth Córdoba. Elena, has sido un gran apoyo y un ejemplo a seguir, porque no solo ha sido una jefa sino también una compañera de trabajo. Gracias por confiar en mí, por escucharme y buscar soluciones en los momentos de estrés. Me has enseñado que la fortaleza, la calma y la paciencia son herramientas fundamentales en el crecimiento personal. Elizabeth, gracias porque sin apenas conocerme, aceptaste el reto de dirigirme y de aconsejarme, sobre todo en la perseverancia y el esfuerzo que requiere este tipo de trabajo. Gracias por socorrerme cuando lo he necesitado.

A los miembros de mi tribunal de seguimiento, Dr. David Machado, Dr. Félix Machín y el Dr. Abraham Acevedo, los cuales me han aportado puntos de vista diferentes y necesarios para la elaboración y desarrollo de la tesis, porque su labor ha sido importante cada año como punto de inflexión y control de daños experimental. Hago una especial mención al Dr. David Machado, que ha formado parte de mi carrera como científica de manera importante. Gracias por todos los consejos dados sin pedir nada a cambio ya que, sin ti, al menos un capítulo de esta tesis no habría sido posible.

A mis amigos. Silvia, mi confidente más longeva y la principal culpable de que yo esté escribiendo esto hoy, gracias por tu saber escuchar, por las risas y el cariño que me has brindado a lo largo del camino. A Sara Cazorla y Jessel, porque cuando comencé me incluyeron como una más del laboratorio, por los desayunos y almuerzos, por tantos consejos científicos y de vida, por las risas y las cervezas, gracias. Sara y Carla, que me han acompañado en este final de camino, el más duro, gracias por aguantarme cuando ni yo misma me soportaba, por ayudar a levantarme, por animarme en cada ratito juntas, gracias. A mis “biobiólogos”, Irene, Aleida, Alejandro y Nuba, porque comenzamos este camino universitario juntos y sin saberlo, nos hemos acompañado todos estos años en nuestros éxitos, bodas y en los momentos menos

bonitos, a pesar de cada uno estar en lugares distintos han estado siempre presentes, gracias.

A los pediatras nefrólogos colaboradores, Víctor García Nieto y María Isabel Luis Yanes (Mabel), por su participación, consejos y gran calidad humana.

A mis compañeras de grupo, Ana y Carolina y a las técnicas de laboratorio, Lari, Isa y Yanet, por su contribución y esfuerzo que forman parte de este trabajo.

A todo el personal del animalario, Jordi, Cristi, Olivia, Mario, Antonio, Carlos, Alicia y Maria Rosa, gracias por cada sonrisa, por cada favor, por cada ánimo y por todo el aprendizaje que me han brindado. De ustedes también es esta Tesis.

A mi familia. Mi madre Francis, gracias por el esfuerzo mamá para conseguir que yo esté aquí haciendo lo que me gusta, por lograr que me mudara a España a estudiar, aunque eso significara nuestra separación. Porque siempre has confiado en mí y sabías que yo podía con cualquier cosa. Tu fuerza de convicción y tu amor son admirables, gracias. Mi hermana Valentina (mi psicóloga de confianza), la más peque, pero también fuerte, me has enseñado que no hay límites en los objetivos, que podemos cambiar de parecer y gustos y no pasa nada, gracias por escucharme atenta aun teniendo mil cosas encima. A mi tía Glory y mi prima Isabella, unas mujeres que también han dejado atrás una vida planificada, que han resurgido de sus cenizas y que están alcanzando cada una de sus metas, gracias, no podría estar aquí sin su apoyo. Gracias por ser mujeres que han sido un pilar fundamental en mi vida, la cual no estuvo completa de nuevo hasta que estuvimos juntas. A mi abuelo Andrés, porque el pensamiento científico viene de familia, gracias por ser mi segundo padre, y por contribuir de manera incansable en mi educación.

A mi segunda familia, Mari y Domingo, que los he querido desde el primer momento que los conocí. Me han tratado como una hija más, siempre apoyándome, queriéndome y alimentándome, gracias, por tanto.

A mi esposo Domingo, gracias infinitas, porque eres mi persona. Gracias por todo el apoyo incondicional, amor, ánimos y por soportar todos los dramas. No podría haber elegido mejor a este compañero de vida. Sin ti, esta tesis hubiera sido más difícil de hacer. Has sido calma, paciencia, comprensión y mi mejor crítico. No ha sido un camino fácil de recorrer, sin embargo, lo hemos conseguido. Esta tesis es tan mía como tuya.

Finalmente, quería dedicar este trabajo a cada una de las personas con la enfermedad de Dent, especialmente a Nacho y Eva de ASDENT. Gracias por darle humanidad y visibilidad a este problema. Eva, eres inspiración, ejemplo de vida y motor de cambio. No te has cruzado de brazos. Has cruzado desiertos. Movido cielo y tierra por Nacho. Desde el primer momento se me quedo grabada tu frase en mi mente “Niega lo imposible y abraza lo extraordinario”.

Gracias.





# Índice

<b>RESUMEN</b> .....	<b>37</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>45</b>
1. Enfermedades raras y tubulopatías primarias .....	47
2. Enfermedad de Dent .....	48
2.1. Definición y epidemiología de la enfermedad de Dent .....	48
2.2. Fenotipo clínico .....	50
2.3. Diagnóstico .....	54
2.4. Heterogeneidad genética de la ED .....	55
2.5. Tratamientos actuales .....	55
3. Enfermedad de Dent 1 y la proteína CLC-5 .....	57
3.1. El gen <i>CLCN5</i> .....	57
3.2. Estructura y función de la proteína CLC-5 .....	58
3.3. Patogénesis de la ED1 .....	60
4. Posibles terapias para el tratamiento de la ED1 .....	64
4.1. Caracterización del efecto de mutaciones exónicas de tipo cambio de sentido sobre el procesamiento del pre-ARNm mediante ensayos con minigenes .....	65
4.1.1. Proceso de corte y empalme y secuencias reguladoras .....	65
4.1.2. Mutaciones exónicas con efecto sobre el procesamiento del pre-ARNm ....	68
4.1.3. Estudio funcional del procesamiento del pre-ARNm usando minigenes .....	69
4.2. Modelos celulares para el estudio de mutaciones que causan mal plegamiento de CLC-5 .....	69

4.3. Modelos <i>in vivo</i> para el estudio de la ED1 .....	71
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>75</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>79</b>
1. Objetivos generales .....	81
2. Objetivos específicos .....	81
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>83</b>
1. Efecto de las mutaciones de cambios de sentido en el gen <i>CLCN5</i> sobre el pre-AR-Nm mediante ensayos con minigenes .....	85
1.1. Análisis <i>in silico</i> del efecto de mutaciones de cambio de sentido en el gen <i>CLCN5</i> ....	85
1.2. Amplificación de los fragmentos genómicos de <i>CLCN5</i> de pacientes y controles ....	87
1.3. Construcción de minigenes .....	88
1.4. Clonación en vector de expresión ExonTrap (pET01) .....	88
1.5. Digestión y ligado de los fragmentos de interés con el vector de clonación .....	89
1.6. Preparación de células ultracompetentes E. coli XL1 Blue .....	90
1.7. Transformación en células ultracompetentes .....	91
1.8. Extracción de ADN plasmídico y comprobación de los plásmidos recombinantes ....	91
1.9. Mutagénesis digerida .....	92
1.10. Líneas celulares .....	93
1.11. Mantenimiento de células HEK293 y HEK293T .....	94
1.12. Transfección de cultivos celulares y PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) ....	94
2. Creación y caracterización de líneas celulares que expresan proteínas ClC-5 mutantes como modelos de la ED1 y tratamiento con chaperonas químicas .....	95
2.1. Clonación direccional de la ORF de ClC-5 en el vector pEGFPN1 y generación de mutantes .....	95
2.2. Determinación de la dosis óptima de geneticina (G418) para la selección de los clones estables .....	96
2.3. Transfección y selección de los clones .....	96
2.4. Recuperación de los mutantes estables .....	97
2.5. Ensayo de viabilidad celular por reducción del compuesto MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) para la determinación de la do-	

sis de chaperonas a ensayar en células HEK293 .....	97
2.6. Tratamiento con chaperonas químicas .....	98
2.7. Citometría de flujo .....	98
2.8. Microscopía confocal .....	98
3. Tratamiento del ratón Knock-in <i>Cln5</i> V523del con ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) .....	99
3.1. Genotipado de los ratones WT y KI <i>Cln5</i> V523del .....	99
3.2. Mantenimiento de animales .....	99
3.3. Recolección de muestras .....	100
3.4. Tratamiento del KI <i>Cln5</i> V523del con TUDCA .....	100
3.5. Parámetros bioquímicos .....	100
3.6. Análisis estadístico .....	102

## **RESULTADOS ..... 105**

1. Efecto de las mutaciones de cambio de sentido en el gen <i>CLCN5</i> sobre el pre-ARNm mediante ensayos con minigenes .....	107
1.1. Análisis <i>in silico</i> de las mutaciones de cambio de sentido presentes en la bibliografía .....	107
1.2. Mutaciones presentes en el minigén con los exones 10 y 11 que modifican la expresión de pre-ARNm .....	111
1.3. Mutaciones que no dieron lugar a la alteraciones del pre-ARNm en nuestro sistema de minigenes .....	116
2. Creación y caracterización de líneas celulares que expresan proteínas CIC-5 mutantes como modelos de la ED1 y tratamiento con chaperonas químicas .....	117
2.1. Determinación de dosis y tiempo óptimos de exposición de las células HEK293 a la geneticina (G418) .....	117
2.2. Determinación de las dosis de 4-PBA y TUDCA mediante ensayos de viabilidad celular .....	118
2.3. Determinación de los niveles de fluorescencia de las proteínas de fusión CIC-5-EGFP salvaje y mutantes en el grupo control (sin tratamiento) y tratados con TUDCA y 4-PBA .....	119
2.4. Determinación de la localización subcelular y agregación de la proteína de fusión CIC-5-EGFP en la línea celular HEK293 y cuantificación,	

en el grupo control (sin tratamiento) y tratado con TUDCA y 4-PBA para las células WT como mutantes .....	122
2.4.1. Caracterización de las líneas celulares antes de los tratamientos con chaperonas químicas .....	122
2.4.2. Caracterización de las líneas celulares tratadas con 4-PBA .....	128
2.4.3. Caracterización de las líneas celulares tratadas con TUDCA .....	132
3. Tratamiento del ratón Knock-in <i>Clcn5</i> V523del con ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) .....	139
3.1. Valores de los parámetros clínicos de la enfermedad de Dent-1 en el grupo de ratones KI utilizados en el ensayo con TUDCA .....	140
3.2. Determinación de la PBPM ( $\beta$ 2-microglobulina) .....	140
3.3. Determinación de los niveles de excreción urinaria de fosfato .....	141
3.4. Determinación de los niveles de excreción urinaria de calcio .....	141
3.5. Determinación de los valores de orina excretada .....	141
3.6. Determinación de los valores de agua ingerida .....	141
3.7. Determinación del peso corporal .....	141
3.8. Cuantificación de la excreción de la N-Acetyl- $\beta$ -glucosaminidasa (NAG) como marcador de PBPM y de daño tubular .....	143
3.9. Aclaramiento de creatinina como marcador de la función renal .....	144
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>147</b>
1. Efecto de las mutaciones de cambios de sentido en el gen <i>CLCN5</i> sobre el pre-ARNm mediante ensayos con minigenes .....	150
2. Caracterización de modelos celulares y tratamiento con chaperonas químicas .....	155
3. Tratamiento del ratón Knock-in <i>Clcn5</i> V523del con ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) .....	159
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>165</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>169</b>
<b>ANEXO I. TABLAS Y FIGURAS .....</b>	<b>203</b>
1. BLOQUE 1. Efecto de las mutaciones de cambios de sentido en el gen <i>CLCN5</i> sobre el pre-ARNm mediante ensayos con minigenes .....	205

2. BLOQUE 3. Tratamiento del ratón Knock-in <i>Cln5</i> V523del con ácido tau- roursodeoxicólico (TUDCA) .....	210
---	-----

**ANEXO II. MEDIOS ..... 213**

**ANEXO III. PUBLICACIONES ..... 217**

1. Characterization of pre-mRNA Splicing Defects Caused by <i>CLCN5</i> and <i>OCRL</i> Mutations and Identification of Novel Variants Associated with Dent Disease ...	219
2. Consideraciones acerca de las bases moleculares de algunas tubulopatías en relación con la endogamia y los desplazamientos poblacionales .....	241



# Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Características clínicas de pacientes con la ED1 .....	53
<b>Tabla 2.</b> Resumen de las medidas analizadas en los modelos <i>Clcn5</i> KO y el modelo KI <i>Clcn5Val523del</i> .....	73
<b>Tabla 3.</b> Cebadores diseñados para la amplificación de los fragmentos codificantes de <i>CLCN5</i> .....	88
<b>Tabla 4.</b> Cebadores utilizados para la mutagénesis dirigida .....	93
<b>Tabla 5.</b> Secuencia de cebadores para comprobar la mutación en el exón 10 de <i>CLCN5</i> para el genotipado de ratones KI <i>Clcn5</i> V523del o WT .....	99
<b>Tabla 6.</b> Predicción de las herramientas bioinformáticas de las mutaciones de cambio de sentido de <i>CLCN5</i> seleccionadas a partir de la tabla A1 (Anexo I) .....	108
<b>Tabla 7.</b> Sitios <i>ESS</i> en el exón 10 <i>CLCN5</i> causados por mutaciones c.1535G>A, c.1537G>A, c. 1639T>G, c. 1639T>C y c.1641G>T, según la herramienta bioinformática HSF .....	114
<b>Tabla 8.</b> Resumen de los efectos observados en la agregación, la expresión y localización de la proteína CIC5-EGFP mutantes, con los tratamientos con 4-PBA y UDCA .....	138
<b>Tabla 9.</b> Valores debut determinados para cada uno de los parámetros analizados en los ratones KI <i>Clcn5</i> V523del .....	139
<b>Tabla 10.</b> Valores de referencia de los parámetros clínicos característicos de la ED1 observados en el modelo KI <i>Clcn5</i> V523del a los 3 y 4 meses de edad .....	140
<b>Tabla 11.</b> Marcadores de la ED1 medidos en los ratones KI <i>Clcn5</i> V523del a T0 y T20 ...	143
<b>Tabla 12.</b> Marcadores de daño tubular (NAG), daño renal (creatinina sérica y aclaramiento de la creatinina) en ratones KI <i>Clcn5</i> V5123del .....	145



# Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Línea de tiempo destacando los principales hitos históricos de la ED .....	50
<b>Figura 2.</b> <b>A)</b> Representación esquemática del gen <i>CLCN5</i> . <b>B)</b> Localización de las mutaciones descritas hasta la fecha en <i>CLCN5</i> .....	58
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de la función y estructura de la proteína ClC-5. <b>A)</b> ClC-5 como intercambiador de 2Cl <sup>-</sup> /H <sup>+</sup> en los endosomas tempranos de las células del túbulo proximal. <b>B)</b> Representación esquemática de la estructura secundaria de ClC-5. <b>C)</b> Representación del homodímero de ClC-5 .....	60
<b>Figura 4.</b> Representación del papel de ClC-5 en el proceso de endocitosis de las proteínas de BPM y en la acidificación de los endosomas .....	61
<b>Figura 5.</b> Elementos reguladores del proceso de <i>splicing</i> .....	67
<b>Figura 6.</b> Alteraciones de <i>splicing</i> causadas por mutaciones en el gen <i>CLCN5</i> .....	69
<b>Figura 7.</b> Representación y clasificación de los mecanismos moleculares que causan mal funcionamiento de ClC-5 .....	70
<b>Figura 8.</b> Células embrionarias de riñón humano expresando proteínas ClC-5 mutantes ....	71
<b>Figura 9.</b> Representación esquemática del vector pET01 .....	89
<b>Figura 10.</b> Representación esquemática del protocolo general de mutagénesis dirigida .....	92
<b>Figura 11.</b> Estructura de la construcción plasmídica en el que se incluye la proteína de fusión ClC5-EGFP WT .....	95
<b>Figura 12.</b> Diseño experimental para el estudio dosis-respuestas de HEK293 ante G418 donde se representan cada una de las concentraciones aplicadas de G418. También se representa la toma de las muestras cada día, hasta llegar a las 96 horas .....	96
<b>Figura 13.</b> Representación esquemática de los minigenes construidos en el vector de expresión pET01 .....	110

<b>Figura 14.</b> Electroforesis en geles de agarosa mostrando los resultados del análisis de RT-PCR de transcritos expresados a partir de minigenes de <i>CLCN5</i> que contienen los exones WT y mutantes .....	111
<b>Figura 15.</b> Resultados de la secuenciación de los productos alterados obtenidos de la RT-PCR de la construcción con los exones 10-11 del gen <i>CLCN5</i> , y representación esquemática de los mismos .....	113
<b>Figura 16.</b> Representación esquemática de los ESS generados por las mutaciones en el exón 10 de <i>CLCN5</i> c.1535G>A, c.1537G>A, c. 1639T>G, y c.1641G>T, según la herramienta bioinformática HSF .....	115
<b>Figura 17.</b> Curva dosis-respuesta de tratamiento con G418 en las células HEK293 .....	117
<b>Figura 18.</b> Porcentaje de viabilidad obtenido de las células HEK293 tratadas con diferentes dosis de 4-PBA y TUDCA .....	118
<b>Figura 19.</b> Gráfico de dispersión de puntos en que se representa SSC vs. FSC .....	119
<b>Figura 20.</b> Histogramas en los que se compara el número de células vivas frente a la intensidad generada por la proteína de fusión CIC5-EGFP y las proteínas de fusión mutantes, sin tratamiento aplicado .....	120
<b>Figura 21.</b> Histograma en el que se compara el número de células vivas frente a la intensidad de la fluorescencia generada por la proteína de fusión CIC5-EGFP y las proteínas de fusión mutantes después de aplicar el tratamiento con 4-PBA .....	120
<b>Figura 22.</b> Histograma en el que se compara el número de células vivas frente a la intensidad de la fluorescencia generada por la proteína de fusión CIC5-EGFP y las proteínas de fusión mutantes después de aplicar el tratamiento con TUDCA .....	121
<b>Figura 23.</b> Cuantificación de niveles de expresión de la proteína de fusión CIC-5-EGFP y mutantes, tanto en la población de células vivas en el grupo control (sin tratamiento) .....	121
<b>Figura 24.</b> Expresión de la proteína CIC5-WT-EGFP en células HEK293 sin tratamiento ....	124
<b>Figura 25.</b> Expresión de la proteína mutante CIC5-V523del-EGFP en células HEK293 sin tratamiento .....	125
<b>Figura 26.</b> Expresión de la proteína mutante CIC5-G65R-EGFP en células HEK293 sin tratamiento .....	126
<b>Figura 27.</b> Expresión de la proteína mutante CIC5-G462S-EGFP en células HEK293 sin tratamiento .....	127

<b>Figura 28.</b> Expresión de la proteína mutante CIC5-G466D-EGFP en células HEK293 sin tratamiento .....	128
<b>Figura 29.</b> Expresión de la proteína mutante CIC5-V523del-EGFP en células HEK293 tratadas con 4-PBA .....	129
<b>Figura 30.</b> Expresión de la proteína mutante CIC5-G65R-EGFP en células HEK293 tratadas con 4-PBA .....	130
<b>Figura 31.</b> Expresión de la proteína mutante CIC5-G462S-EGFP en células HEK293 tratadas con 4-PBA .....	131
<b>Figura 32.</b> Expresión de la proteína mutante CIC5-G466D-EGFP en células HEK293 tratadas con 4-PBA .....	132
<b>Figura 33.</b> Expresión de la proteína mutante CIC5-V523del-EGFP en células HEK293 tratadas con TUDCA .....	133
<b>Figura 34.</b> Expresión de la proteína mutante CIC5-G65R-EGFP en células HEK293 tratadas con TUDCA .....	134
<b>Figura 35.</b> Expresión de la proteína mutante CIC5-G462S-EGFP en células HEK293 tratadas con TUDCA .....	135
<b>Figura 36.</b> Expresión de la proteína mutante CIC5-G466D-EGFP en células HEK293 tratadas con TUDCA .....	136
<b>Figura 37.</b> Comparación de los resultados obtenidos en las líneas celulares no tratadas (control) y tratadas con 4-PBA y TUDCA para los PFB y PFM .....	137
<b>Figura 38.</b> Características fenotípicas determinadas para la ED1 .....	142
<b>Figura 39.</b> Marcadores de daño tubular y daño renal .....	144



# Lista de abreviaturas

<b>4-PBA</b>	4-fenilbutirato de sodio
<b>ACMG</b>	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
<b>ACr</b>	Aclaramiento de creatinina
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>BPM</b>	Bajo Peso Molecular
<b>CC</b>	Campo Claro
<b>CEIBA</b>	Comité de Ética en Investigación y Bienestar Animal
<b>CON</b>	Control
<b>CTP</b>	Células del Túbulo Proximal
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMEM-HG</b>	<i>DMEM con alta glucosa (High glucose)</i>
<b>DMSO</b>	Dimetil Sulfoxido
<b>Da</b>	Dalton
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>ED</b>	Enfermedad de Dent
<b>ED1</b>	Enfermedad de Dent tipo 1
<b>ED2</b>	Enfermedad de Dent tipo 2
<b>ED3</b>	Enfermedad de Dent tipo 3

<b>ELISA</b>	Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas ( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
<b>ER</b>	Enfermedades raras
<b>ERC</b>	Enfermedad Renal Crónica
<b>ESS</b>	Silenciador exónico del <i>splicing</i> ( <i>Exonic Splicing Silencer</i> )
<b>ESE</b>	Potenciador exónico del <i>splicing</i> ( <i>Exonic Splicing Enhancer</i> )
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration USA
<b>FSC</b>	Dispersión frontal ( <i>Forward Scatter</i> )
<b>GEFG</b>	Glomeruloesclerosis Focal Global
<b>GEFS</b>	Glomeruloesclerosis Focal Segmentaria
<b>G418</b>	Geneticina 418
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente ( <i>Green Fluorescence Protein</i> )
<b>HGMD</b>	<i>Human Gene Mutation Database</i>
<b>HEK</b>	Línea celular de riñón embrionario humano
<b>HSF</b>	<i>Human Splicing Finder</i>
<b>hnRNPs</b>	Ribonucleoproteínas nuclear heterogéneas ( <i>heterogeneous nuclear Ribonucleoproteins</i> )
<b>IP</b>	Intraperitoneal
<b>ISS</b>	Silenciadores intrónico del <i>splicing</i> ( <i>Intronic Splicing Silencer</i> )
<b>ISE</b>	Potenciador intrónico del <i>splicing</i> ( <i>Intronic Splicing Enhancer</i> )
<b>KI</b>	<i>Knock-in</i>
<b>KO</b>	<i>Knock-out</i>
<b>LB</b>	Luria-Bertoni
<b>LTR</b>	Repetición Larga Terminal ( <i>Long Terminal Repeat</i> )
<b>M</b>	Molar
<b>mM</b>	miliMolar
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<b>NAG</b>	N-acetyl-β-D-glucosaminidasa
<b>NGS</b>	<i>Next generation sequencing</i>

<b>ORF</b>	Marco de lectura abierto ( <i>Open Reading Frame</i> )
<b>Pb</b>	Pares de base
<b>PBPM</b>	Proteinuria de bajo peso molecular
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>pEGFPN1</b>	Vector de expresión de GFP
<b>PFB</b>	Plano Focal Bajo
<b>PFM</b>	Plano Focal Medio
<b>pET01</b>	Vector de expresión ExonTrap
<b>PTH</b>	Hormona paratiroidea ( <i>Parathyroid Hormone</i> )
<b>Pre-ARNm</b>	ARN mensajero no maduro
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT-PCR</b>	PCR con transcriptasa inversa ( <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>SMC</b>	Sitio de multiclonaje
<b>snRNP</b>	Pequeñas ribonucleoproteínas ( <i>small nuclear Ribonucleoproteins</i> )
<b>SSC</b>	Dispersión lateral ( <i>Side Scatter</i> )
<b>SR</b>	Proteínas ricas en serina y arginina ( <i>Serin/Arginine-rich proteins</i> )
<b>Splicing</b>	Sitio de corte y empalme
<b>T0</b>	Inicio del experimento
<b>T20</b>	Final del experimento
<b>TFG</b>	Tasa de Filtración Glomerular
<b>TUDCA</b>	Ácido Tauroursodeoxicólico
<b>UA</b>	Unidades Arbitrarias
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>UTR</b>	Región sin traducir ( <i>Untranslate Regions</i> )
<b>WT</b>	Fenotipo salvaje ( <i>Wild-type</i> )





# Resumen



**Antecedentes:** La enfermedad de Dent (ED) es una tubulopatía proximal ligada al cromosoma X, cuya afectación en la población es minoritaria (afecta a menos de 5 personas por cada 10.000 habitantes), por lo que es considerada una enfermedad rara. Esta enfermedad se caracteriza principalmente por proteinuria de bajo peso molecular (PBPM), hipercalciuria, nefrolitiasis o nefrocalcinosis y en algunos casos raquitismo. Se presenta en la infancia o en la adolescencia y afecta de manera más severa a los varones que a las mujeres. En la edad adulta, los pacientes evolucionan con frecuencia hacia la insuficiencia renal crónica. Hoy en día, los tratamientos que existen están dirigidos a retrasar los principales síntomas de la enfermedad, por lo tanto, el daño en la función renal lleva a los pacientes a hemodiálisis y trasplante renal. El 60% de los pacientes presenta mutaciones en el gen *CLCN5* (enfermedad de Dent-1) que codifican a la proteína ClC-5, un intercambiador Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> implicado en la endocitosis del túbulo proximal distal. Esta proteína forma homodímeros y sus  $\alpha$ -hélices H, I, P y Q participan en la formación de la interfaz entre los dos monómeros. ClC-5 se expresa en la membrana de los endosomas tempranos de las células del túbulo proximal, y desempeña un papel crucial en la endocitosis. Esto explica el defecto en la endocitosis y la proteinuria de bajo peso molecular en los pacientes con enfermedad de Dent-1. Se han detectado mutaciones en *CLCN5* en más de 300 pacientes con esta enfermedad. Así mismo, nuestro grupo de investigación ha estudiado las causas genéticas y el fenotipo de la enfermedad de Dent en España, identificando mutaciones en el gen *CLCN5* en más de 50 pacientes. Las mutaciones más frecuentes son mutaciones de cambio de sentido, mutaciones sin sentido e inserciones y deleciones pequeñas.

En este sentido, la identificación y caracterización de mutaciones exónicas presentes en el gen *CLCN5*, han cobrado gran importancia. En nuestras investigaciones se ha observado, mediante estudios funcionales, que el efecto patogénico de algunas mutaciones previamente descritas como mutaciones de cambio de sentido no solo pueden causar un defecto a nivel proteico con el cambio de un aminoácido por otro, sino que también puede afectar al procesamiento (corte y empalme) del pre-ARN mensajero.

A nivel proteico, nuestro grupo se ha interesado en el estudio de las mutaciones de clase 1, es decir, aquellas que hacen que la proteína ClC-5 mutante quede retenida en el retículo endoplásmico (RE) y no llegue a su lugar habitual (endosomas tempranos y membrana plasmática). A través de experimentos de co-localización, nuestro grupo determinó que 4 mutaciones encontradas en pacientes con la enfermedad de Dent, p.(G466D), p.(G462S), p.(G65R) y p.(V523del) (Ramos-Trujillo *et al.*, 2013), son mutaciones de clase 1. Este tipo de defecto también se ha observado en otras enfermedades como el Parkinson, Huntington,

Esclerosis Lateral Amiotrófica, para las cuales ya se están probando compuestos conocidos como chaperonas químicas para su tratamiento, que son de distinta naturaleza y que favorecen el plegamiento de las proteínas, permitiendo que salgan del RE y lleguen su lugar de acción. Actualmente se están probando chaperonas hidrofóbicas como el ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) y el 4-fenilbutirato de sodio (4-PBA) que ya están aprobadas por la FDA y por la EMA para el tratamiento de la cirrosis biliar y trastornos del ciclo de la urea, respectivamente. Esto plantea así la posible utilización de fármacos ya comercializados para otras enfermedades (reposicionamiento de fármacos) que incluyan como principio activo a una chaperona química.

Como otra alternativa en la búsqueda de terapias efectivas para el tratamiento de la enfermedad de Dent-1 nuestro grupo diseñó y generó un ratón *knock-in* (KI) como modelo de enfermedad que incluye la mutación p.(V523del), ya que los ratones modificados genéticamente son de gran utilidad en el desarrollo de nuevas terapias. Para la enfermedad Dent-1 se han generado, con anterioridad, 3 ratones *knock-out* (KO) que carecen de una parte codificante del gen *Clcn5* y no expresan la proteína CIC-5. Estos ratones KO presentan el defecto en endocitosis en el túbulo proximal y las principales anomalías fenotípicas de la enfermedad de Dent-1. Sin embargo, se hizo necesario el diseño de ratones KI en los que se expresaran mutaciones puntuales o pequeñas inserciones o deleciones de *CLCN5* y que además permitieran el estudio del papel fisiológico de la mutación específica que causa la enfermedad en humanos. En este sentido, se ha estudiado el efecto patogénico de la mutación p.(V523del) en el riñón *in vivo* en el ratón KI *Clcn5V523del*, el cual manifiesta las principales características de enfermedad de Dent, la PBPB, hipercalciuria e hiperfosfaturia, al que ya se ha tratado con la chaperona 4-PBA y observándose una disminución importante de estos síntomas.

**Objetivos:** Los objetivos a desarrollar en esta Tesis Doctoral están centrados en determinar el efecto de mutaciones exónicas de *CLCN5* en el procesamiento del pre-ARN mensajero; en evaluar el efecto de 4 mutaciones de clase 1 seleccionadas sobre características de la proteína CIC-5 en una línea celular humana de riñón; evaluar el efecto de dos chaperonas sobre los modelo celulares y evaluar el efecto de una en el modelo de ratón KI *Clcn5V523del*, con el fin de aportar información sobre los mecanismos celulares y fisiológicos de la enfermedad de Dent y utilizar ambos modelos como plataformas de cribado pre-clínico de fármacos con potencial terapéutico.

**Metodología:** Se realizó un análisis *in silico* utilizando diferentes herramientas bioinformáticas que predijeran el efecto de presuntas mutaciones de cambio de sentido identificadas

en el gen *CLCN5* sobre el procesamiento del pre-ARN mensajero. Las mutaciones seleccionadas fueron estudiadas mediante el uso de sistemas de minigenes en combinación con ensayos *in vitro* usando células HEK293T.

Para el estudio con líneas celulares que expresan de forma estable proteínas que portan mutaciones de clase 1, se generaron mutantes en células HEK293 introduciendo la ORF del gen *CLCN5* en el vector de clonación pEGFPN1 que da lugar a proteínas de fusión CIC-5 EGFP. Se cuantificaron los niveles de expresión de estas proteínas a través de citometría de flujo, y se observó y caracterizó la localización y la agregación de la proteína CIC-5 EGFP WT y mutadas, mediante microscopía confocal en célula viva.

Para el análisis del efecto del tratamiento con las chaperonas TUDCA y 4-PBA en los modelos celulares, se determinó la dosis por ensayos de viabilidad con MTT, se trataron las células con cada fármaco durante 24h y se determinaron los cambios en niveles de expresión, localización y agregación de la proteína CIC-5 EGFP.

Respecto al tratamiento del ratón KI *Clcn5*V523del con la chaperona TUDCA, se trataron tanto ratones KI como WT con el fármaco o con solución salina (vehículo) durante 20 días por vía intraperitoneal. Se tomaron muestras al inicio y final del tratamiento y se analizaron los parámetros bioquímicos característicos de la enfermedad de Dent-1 (PBPM, hipercalciuria, poliuria, hiperfosfaturia, entre otros).

**Resultados:** Se seleccionaron 13 mutaciones de un total de 63 de cambio de sentido en el gen *CLCN5* presentes en la bibliografía, en base a criterios establecidos previamente. El análisis mediante sistemas de minigenes mostró que 3 de ellas no solo son variantes de cambio de sentido, sino que también generan cambios a nivel del pre-ARN mensajero, que pueden ser explicados por la alteración de sitios silenciadores activados a consecuencia de la mutación.

Las 4 mutaciones de clase 1 p.(G466D), p.(G462S), p.(G65R) y p.(V523del) alteran los niveles de expresión, de agregación y la localización de la proteína CIC-5 EGFP, en comparación con la proteína CIC-5 WT. La mutación p.(V523del) muestra mayores niveles de expresión en comparación con las variantes p.(G466D), p.(G462S), p.(G65R). Después de tratar con 4-PBA y TUDCA aumentan los niveles de expresión de la proteína CIC-5 EGFP con la mutación p.(V523del), la localización se recupera y los agregados disminuyen, llegando a parecerse a lo observado para la proteína CIC-5 WT. Para el resto de las mutaciones no se observaron cambios importantes como consecuencia del tratamiento.

Los ratones KI *Clcn5*<sup>V523del</sup> utilizados para el ensayo con la chaperona hidrofóbica TUDCA presentaban a tiempo cero el fenotipo esperado de la enfermedad de Dent-1. Después de 20 días de tratamiento se observó una reducción del 56% de los valores de  $\beta$ 2-microglobulina como marcador de PBPM. Los valores de fosfato y calcio en orina se redujeron un 28% y un 33%, respectivamente. Los valores de orina excretada no cambiaron a consecuencia del tratamiento. El marcador de daño tubular N-Acetyl- $\beta$ -glucosaminidasa (NAG) disminuyó un 63% en los ratones KI tratados con TUDCA-

**Conclusiones:** Las herramientas bioinformáticas son de gran utilidad en la predicción del efecto de presuntas mutaciones de cambio de sentido presentes en el gen *CLCN5* sobre el proceso de *splicing* del ARN. Nuestros resultados resaltan la importancia de evaluar los efectos de mutaciones de cambio de sentido en el gen *CLCN5* mediante ensayos de minigenes.

La proteína de fusión CIC-5 EGFP con las mutaciones de clase 1 p.(V523del), p.(G65R), p.(G462S) y p.(G466D) presentan alteraciones en la expresión y localización, las cuales son revertidas para la mutación p.(V523del) como consecuencia de los tratamientos con TUDCA y 4-PBA. Por lo que el desarrollo de modelos celulares de la enfermedad de Dent-1 es de gran utilidad para el ensayo pre-clínico de moléculas con potencial terapéutico de manera rápida y efectiva.

El tratamiento de nuestro modelo animal KI *Clcn5*<sup>V523del</sup> con el fármaco TUDCA disminuye la principal característica observada en la enfermedad de Dent-1, la PBPM, así como la hiperfosfaturia e hipercalciuria, por lo que podría ser una potencial estrategia terapéutica para los pacientes con ED1 causada por proteína CIC-5 retenida en el RE.







# Introducción



## 1. ENFERMEDADES RARAS Y TUBULOPATÍAS PRIMARIAS

La Unión Europea define las enfermedades raras (ER) como aquellas cuya prevalencia es inferior a 5 casos por cada 10.000 habitantes. Según la Organización Europea de Enfermedades Raras (EURORDIS), se estima que existen aproximadamente 6000 enfermedades distintas que afectan a entre un 3.5% y un 5.9% de la población mundial, lo que equivale a entre 263 y 446 millones de personas afectadas en todo el mundo. En Europa, se ha estimado que entre un 6 y un 8% de la población puede verse afectados por una ER en el curso de su vida (Nguengang Wakap *et al.*, 2020), y en España, según el Centro de Referencia Estatal de Atención a Personas con Enfermedades Raras, se calcula que existen unos 3 millones de personas que sufren una ER o poco común.

Las ER por lo general comportan una evolución crónica muy severa, con múltiples deficiencias motoras, sensoriales y cognitivas y por lo tanto suelen presentar un alto nivel de complejidad clínica que dificultan su diagnóstico y reconocimiento (Posada *et al.*, 2008).

Aproximadamente un 72% de las ER son origen genético y a menudo causan anomalías congénitas. Aparecen generalmente en la edad infantil, observándose los primeros síntomas antes de los dos años en dos de cada tres casos (Posada *et al.*, 2008). Con frecuencia su diagnóstico y tratamiento es complejo debido en parte al desconocimiento de estas patologías por el personal médico a causa de su baja prevalencia (Rodríguez-Soriano, 2003), pero también a causa de otros factores como el solapamiento fenotípico de estas patologías con otras más comunes, la dispersión geográfica, las deficiencias en los sistemas de salud o la falta de interés por parte de la industria farmacéutica (Mejía *et al.*, 2013). Para muchas ER, incluidas las de origen genético, se requieren esfuerzos combinados para reducir la morbilidad o la mortalidad perinatal y temprana, y abordar la considerable disminución de la calidad de vida y del potencial socioeconómico de un individuo (Baldovino *et al.*, 2016). Además de estas dificultades, estos pacientes se encuentran con una escasa investigación sobre estas patologías, situación que se agrava por la dispersión de los equipos de investigación, mala coordinación y pequeño número muestral (Posada *et al.*, 2008).

Las enfermedades raras de origen renal son más de 150 afecciones diferentes. La mayoría son hereditarias, mientras que otras, como las glomerulonefritis primarias, tienen etiologías complejas. Para los trastornos renales hereditarios, el diagnóstico, el manejo y los tratamientos son complejos, especialmente cuando están asociados con complicaciones multisistémicas (Aymé *et al.*, 2017).

Dentro del grupo de las enfermedades renales, las tubulopatías renales primarias se definen como enfermedades raras congénitas que afectan al túbulo renal, dan lugar a alteraciones metabólicas, minerales y del equilibrio ácido-base, y se presentan principalmente en la edad pediátrica (Mejía *et al.*, 2013; Blázquez Gómez *et al.*, 2021). Las tubulopatías renales engloban diferentes

afecciones que se pueden clasificar en función de la región afectada; túbulo proximal, asa de Henle y túbulos distal y colector, así como en función de su patogenia, donde encontramos trastornos que afectan al transporte de moléculas como glucosa, aminoácidos, fosfato, calcio, magnesio o agua. Además, existen trastornos complejos del túbulo proximal (síndrome de Toni-Debré-Fanconi; síndrome de Dent; síndrome de Lowe) (Aguirre-Meñica & Luis-Yanes, 2014).

El avance de las tecnológicas de análisis genético ha facilitado la identificación de una gran cantidad de genes relacionados con enfermedades renales, lo que ha llevado a un mejor conocimiento de los mecanismos de estos trastornos, sin embargo, la investigación a nivel genético sigue siendo fundamental a consecuencia de distintos factores como la heterogeneidad genética, la superposición de fenotipos, la exploración insuficiente de regiones no codificantes del genoma, y el conocimiento incompleto de los genes que regulan la función tubular renal (Iancu & Ashton, 2020).

## 2. ENFERMEDAD DE DENT

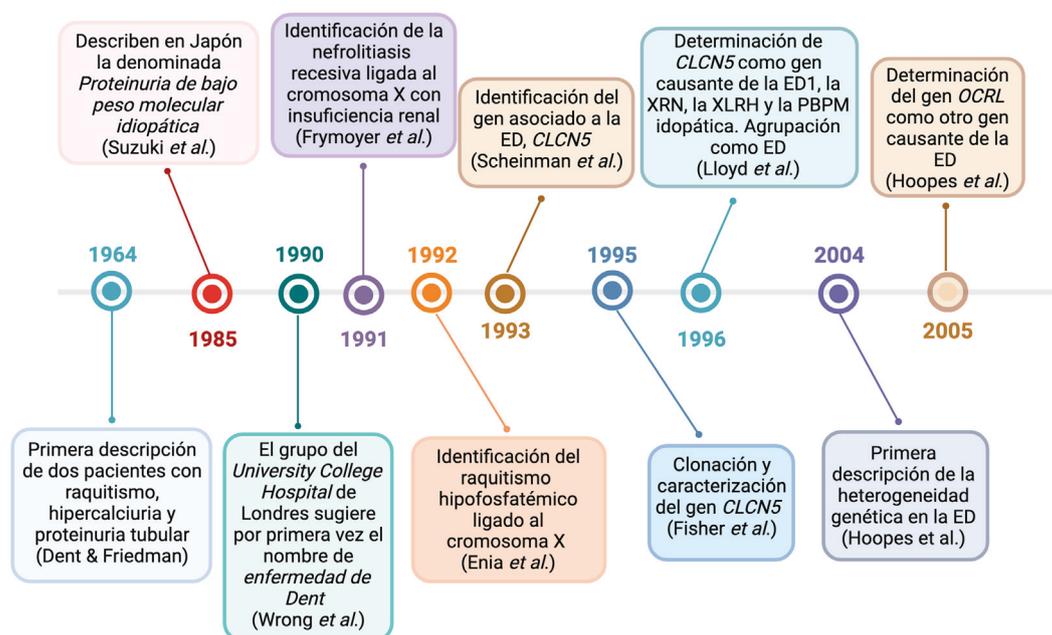
### 2.1. DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE DENT

El término “enfermedad de Dent” (OMIM #300009) (ED) hace referencia a un trastorno renal ligado al cromosoma X, relacionado con defectos en el túbulo proximal y con características del síndrome de Fanconi incompleto. Se caracteriza por proteinuria de bajo peso molecular (PBPM) y otros síntomas como hipercalciuria, nefrolitiasis y nefrocalcinosis, pudiendo progresar hacia enfermedad renal crónica (ERC). En algunos casos puede aparecer raquitismo (Claverie-Martín & García-Nieto, 2006; Devuyt & Thakker, 2010; Ramos-Trujillo *et al.*, 2022).

La ED fue descrita por primera vez en 1964 por Dent y Friedman, en dos casos no relacionados que presentaban raquitismo e hipercalciuria, pero sin defecto en la acidificación de la orina. Junto con la pérdida urinaria de calcio, los pacientes tenían retraso en el crecimiento y un defecto en la reabsorción tubular de fosfato y de aminoácidos (Dent & Friedman, 1964) (**Figura 1**). Posteriormente se llegaron a referir hasta cuatro manifestaciones fenotípicas de la enfermedad. En 1985 Suzuki y colaboradores describen en Japón la denominada *Proteinuria de bajo peso molecular idiopática*, en base a cinco casos en niños varones, dos de ellos hermanos, asintomáticos y de talla normal, pero que presentaron proteinuria en un estudio rutinario (Suzuki *et al.*, 1985). El grupo del *University College Hospital* de Londres sugiere por primera vez el nombre de *enfermedad de Dent* en 1990 al estudiar 8 casos no relacionados

entre sí, que presentaron proteinuria tubular, hipercalciuria, raquitismo y/o nefrocalcinosis (Wrong *et al.*, 1990). Wrong y sus colaboradores fueron los primeros en considerar un defecto en la reabsorción tubular como principal anomalía en la enfermedad. Estudiaron un total de 53 familiares, de los que 23 presentaban anomalías tubulares renales y ocho de ellos habían desarrollado insuficiencia renal crónica. Al observar que ocurría en personas afectadas de ambos sexos, se apuntó que la herencia podía ser autosómica dominante. Sin embargo, la serie inicial fue ampliada en publicaciones posteriores en la que ya se proponía que la herencia estaba ligada al cromosoma X (Wrong *et al.*, 1992; Wrong *et al.*, 1994). En 1991, Frymoyer y colaboradores estudiaron a una gran familia estadounidense constituida por 162 miembros pertenecientes a seis generaciones, con nueve pacientes varones afectos. Desde niños, habían mostrado nefrolitiasis y proteinuria, progresión a la nefrocalcinosis, defecto de la capacidad de concentración y evolución hacia la insuficiencia renal. Las biopsias renales revelaron atrofia tubular, fibrosis intersticial y glomeruloesclerosis. Esta «nueva» enfermedad renal hereditaria fue designada con el nombre de Nefrolitiasis recesiva ligada al cromosoma X con fallo renal. Por otra parte, en 1992, un grupo italiano describió lo que parecía ser una «nueva» variedad de raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (Enia *et al.*, 1992). En esos años, dos escritos sugirieron ya que la ED podía ser el mismo trastorno que aquellos descritos en Estados Unidos (EEUU) (Wrong *et al.*, 1992) y en Japón (Igarashi *et al.*, 1998).

A mediados de los años noventa se identificó el gen asociado con la ED, *CLCN5*, mediante un estudio de ligamiento (Scheinman *et al.*, 1993). Este gen está localizado en la región pericentromérica del brazo corto del cromosoma X (Xp11.22) y fue posteriormente clonado y caracterizado en 1995 (Fisher *et al.*, 1995). Poco después, Lloyd y colaboradores determinaron que los cuatro síndromes son causados por mutaciones en *CLCN5*, y desde entonces se les agrupa como *Enfermedad de Dent* (Lloyd *et al.*, 1996, 1997). En 2004, Hoopes y colaboradores encontraron que 13 pacientes con diagnóstico clínico de ED no presentaban mutaciones en el gen *CLCN5*, proponiendo por primera vez la posible heterogeneidad genética de esta enfermedad (Hoopes *et al.*, 2004). No fue hasta el 2005 que este mismo grupo identificó en 5 de los 13 pacientes analizados previamente, mediante estudios genéticos de ligamiento, la presencia de mutaciones en el gen *OCRL*, localizado en la región cromosómica Xq27-Xq27.1, y previamente asociado con el síndrome oculocerebrorenal ligado al cromosoma X de Lowe. Sin embargo, estos pacientes no presentaban síntomas característicos de la enfermedad de Lowe (cataratas o acidosis metabólica), aunque dos de ellos sí mostraban desórdenes neurológicos (Hoopes *et al.*, 2005). En este sentido, se introdujo el término ED tipo 2 (ED2) (OMIM #300555), para distinguir los casos con mutaciones en el gen *OCRL* de aquellos con mutaciones presentes en el gen *CLCN5* (ED tipo 1; ED1; OMIM #300009).



**Figura 1.** Línea de tiempo destacando los principales hitos históricos de la ED. Adaptado de Ganesello *et al.*, 2021.

## 2.2. FENOTIPO CLÍNICO

Las principales manifestaciones observadas en pacientes con ED1 son PBPM, hipercalciuria, nefrocalcinosis, nefrolitiasis e insuficiencia renal progresiva. Una minoría de pacientes desarrolla raquitismo u osteomalacia (Cox *et al.*, 1999). Del 30 al 80% de los pacientes desarrollarán ERC entre los 30 y los 50 años, aunque en algunos casos puede no aparecer hasta los 60 años o incluso más tarde (Wang *et al.*, 2016).

Otros defectos tubulares, como aminoaciduria, glucosuria, hiperfosfatúria, calciuresis, y uricosuria, pueden aparecer, pero con menor prevalencia, dando lugar a un síndrome de Fanconi parcial (Wrong *et al.*, 1994). Al mismo tiempo, la acidosis tubular renal proximal suele estar ausente (**Tabla 1**) (Hodgin *et al.*, 2008; Devuyt & Thakker, 2010). Mediante estudios de densitometría ósea se puede observar una reducción en la densidad mineral (Vezzoli *et al.*, 1995; Carballo-Trujillo *et al.*, 2003). A menudo la presentación clínica es sutil, de manera que la mayoría de los pacientes permanecen asintomáticos durante la infancia. De hecho, en los casos infantiles se presentarán otros síntomas antes de que ocurra la disfunción renal. Los síntomas típicos de esta enfermedad se presentan en la infancia o en la adolescencia y afecta de manera más severa a los varones que a las mujeres, las cuales son portadoras de las mutaciones, y manifiestan un fenotipo leve o inexistente (Lieske *et al.*, 1993), presentando rara vez nefrocalcinosis

o insuficiencia renal crónica, probablemente debido a la inactivación aleatoria de uno de los dos cromosomas X (Wrong *et al.*, 1994; Reinhart *et al.*, 1995; Hoopes *et al.*, 1998) Hasta la fecha, se han descrito solo 3 mujeres heterocigotas con ERC (Mansour-Hendili *et al.*, 2015).

La PBPM es la característica principal de la enfermedad (**Tabla 1**) ya que se observa en prácticamente todos los casos descritos (Mansour-Hendili *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Blanchard *et al.*, 2016). Hasta el momento, se han descrito sólo dos casos de pacientes con mutaciones en el gen *CLCN5* para los cuales no se reportó PBPM, pero si mostraban otros síntomas de la enfermedad como hipercalciuria (Scheinman *et al.*, 2000; Anglani *et al.*, 2015). Las proteínas de bajo peso molecular (BPM) (>40 KDa) generalmente asociadas a la PBPM son la  $\beta$ 2-microglobulina,  $\alpha$ 1-microglobulina y la proteína de unión al retinol, que pueden aparecer en los pacientes en niveles de 100 a más de 1000 veces superior a las tasas de excreción normal (Wrong *et al.*, 1994; Scheinman, 1998). La cantidad total de proteínas en la orina de niños afectados puede llegar a alcanzar 1 g por día, mientras que en los adultos el rango varía entre 0.5 y 2 g por día (Scheinman, 1998). En ambos grupos de pacientes, la cantidad de PBPM representa el 60-70% de la proteína total excretada. Los patrones de proteinuria en pacientes con la ED indican un defecto en la reabsorción de las proteínas filtradas, y no un daño glomerular o tubular (Wrong *et al.*, 1994). Sin embargo, se han descrito casos de ED1 que no solo presentan PBPM sino también proteinuria severa (incluso en rango nefrótico), sugiriendo la posibilidad de un daño tubular o glomerular (Wang *et al.*, 2016). Se han encontrado altas concentraciones de polipéptidos en la orina de estos pacientes, incluyendo hormonas potencialmente bioactivas, tales como la hormona paratiroidea (PTH, del inglés “*parathormone*”), la insulina, el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1). Se ha sugerido que la presencia de estos polipéptidos en el fluido tubular podría contribuir a la hipercalciuria, la fibrosis intersticial, y la insuficiencia renal progresiva propia de la ED (Norden *et al.*, 2000). Los niños con la ED no experimentan pérdida de sales, ya sea a nivel tubular proximal o distal, y tienen un aclaramiento osmolar normal (Reinhart *et al.*, 1995; Antón-Gamero *et al.*, 2005).

Otra de las manifestaciones más prevalentes en la ED1 es la hipercalciuria, la cual se ha reportado en más del 90% de los pacientes (**Tabla 1**) (Wrong *et al.*, 1994; Ludwig *et al.*, 2006; Bökenkamp *et al.*, 2009). El rango en niños afectos es de 9-14 mg/kg/día, mientras que en adolescentes y adultos oscila entre el 4 y 6 mg/kg/día. Los niveles séricos de la PTH son usualmente bajos en los pacientes con ED1, mientras que los niveles de la 1,25-dihidroxi-vitamina D3 son elevados (Scheinman, 1998).

El síndrome de Fanconi es una señal típica de la disfunción del túbulo proximal. Se ha reportado en forma incompleta en un 60% de los casos de ED1 y en forma completa en menos de

10%. Se caracteriza por glicosuria, aminoaciduria, hiperfosfatemia y acidosis, que se presentan con menor frecuencia que el resto de las características en la ED1 (**Tabla 1**) (Scheinman, 1998).

La nefrocalcinosis aparece con frecuencia (**Tabla 1**) (Gianesello *et al.*, 2021) en la adolescencia y algunas veces en la infancia, y su severidad no siempre está correlacionada con la aparición del fallo renal. La nefrolitiasis aparece con una alta variabilidad a nivel inter e intrafamiliar, aunque se asume su contribución a la disminución de la función renal (Scheinman, 1998). Se cree que la nefrolitiasis es el resultado de la asociación de la hipercalciuria y la alteración en la excreción de los cristales de fosfato y oxalato cálcico en el tubo (Piwon *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2003; Sayer *et al.*, 2004a, 2004b; Cebotaru *et al.*, 2005). En pacientes con cálculos renales es necesaria la monitorización de los niveles de ácido úrico, ya que este producto es excretado y absorbido por las células del túbulo proximal (CTP). Se han reportado pacientes de ED1 con hipouricemia en el 40% de los casos e hiperuricosuria en el 38% (Cho *et al.*, 2008; Blanchard *et al.*, 2016).

La hematuria, usualmente microhematuria, es común en pacientes con la ED (**Tabla 1**). Este síntoma puede ser señal tanto de nefrolitiasis como de glomerulonefritis cuando se asocia con proteinuria (Gianesello *et al.*, 2021).

Como hemos mencionado anteriormente, anomalías óseas como raquitismo u osteomalacia pueden presentarse en pacientes con la ED (**Tabla 1**). Esto puede explicarse por dos mecanismos diferentes: 1) el trastorno del balance de calcio/fosfato; 2) la desregulación de los receptores megalina y cubilina observada en pacientes con la ED. La cubilina y megalina tienen afinidad de unión por la proteína de unión a la vitamina D (Nielsen *et al.*, 2016) por lo que su función deteriorada puede llevar a un defecto en la reabsorción de la vitamina D por parte de las CTP (Anglani *et al.*, 2019).

La principal consecuencia de la ED es una disminución progresiva de la tasa de filtración glomerular (TFG) llevando a enfermedad renal en etapa terminal, que se manifiesta en el 11% de pacientes con ED1 a una edad promedio de 40 años (Blanchard *et al.*, 2016) y entre el 30% y el 80% desarrollan fallo renal entre los 30 y 50 años. Este dato sin embargo está infraestimado ya que se suele determinar en la niñez (Lieske *et al.*, 1993).

En cuanto al mecanismo subyacente a la ERC, se ha demostrado que el daño glomerular es común en pacientes con la ED y está asociado con la disminución de la función renal (Wang *et al.*, 2016). El análisis de biopsias renales en pacientes con proteinuria en rango nefrótico mostró glomerulosclerosis focal global (GEFG) y/o focal segmentaria (GEFS), o glomerulonefritis proliferativa mesangial (Copelovitch *et al.*, 2007; Frishberg *et al.*, 2009; Kaneko *et al.*, 2010; Fervenza, 2013; Wang *et al.*, 2016; Zaniew *et al.*, 2017; Bao *et al.*,

2019), por lo que se podría considerar la ED1 como una tubulopatía proximal con implicaciones a nivel glomerular en ciertos casos (Gianesello *et al.*, 2021).

Además de la disfunción tubular, se ha visto que las mutaciones en *CLCN5* también pueden provocar disfunción de los podocitos, lo que da lugar a un cuadro histológico de GEFS que podría ser un evento primario y no una consecuencia del daño tubular, por lo que la ED1 podría considerarse como una podocitopatía (Solanki *et al.*, 2018; Priante *et al.*, 2023).

**Tabla 1.** Características clínicas de pacientes con la ED1 (Adaptación de Gianesello *et al.*, 2021).

<b>Fenotipo</b>	<b>% pacientes Dent-1 (ED1) (N=772)</b>
PBPM	100
Hipercalciuria	81
Hematuria	61
Aminoaciduria	47
Hiperuricosuria	38
Glicosuria	22
Hiperfosfaturia	27
Hipouricemia	40
Hipofosfatemia	33
Hipocalemia	31
Hipomagnesemia	19
Síndrome de Fanconi incompleto	67
Síndrome de Fanconi completo	5
Fallo renal	28
Nefrocalcinosis	55
Nefrolitiasis	24
Trastornos óseos	19
Síntomas neurológicos	-
Discapacidad intelectual	9
Cataratas	11
Hipotonía	-

### 2.3. DIAGNÓSTICO

Los criterios diagnósticos para la ED son PBPM (las proteínas más comúnmente medidas son proteína de unión al retinol,  $\alpha$ 1 microglobulina, y en ocasiones  $\beta$ 2 microglobulina), y al menos una de las demás características indicadas anteriormente (Hoopes *et al.*, 2004; Edvardsson *et al.*, 2013; Zaniew *et al.*, 2017):

1. Hipercalciuria
2. Otros síntomas con menor prevalencia:
  - Nefrocalcinosis (calcificación renal difusa)
  - Nefrolitiasis (cálculos renales; compuestos de oxalato de calcio y/o fosfato de calcio)
  - Hematuria (sangre microscópica o macroscópica en la orina)
  - Hipofosfatemia (baja concentración de fósforo en sangre)
  - ERC; TFG medida o estimada que está por debajo de los límites normales para la edad.
  - Antecedentes familiares compatibles con herencia ligada al cromosoma X

La ED puede ocurrir de formas poco evidentes y por lo tanto su diagnóstico puede ser obviado en ocasiones, sobre todo en casos donde no hay, en apariencia, historial familiar de la enfermedad. Por esta razón la presencia de PBPM y al menos una de las variables características, o la constatación de antecedentes familiares podrían sugerir el diagnóstico de la ED (Hoopes *et al.*, 2004; Ludwig *et al.*, 2006; Tosetto *et al.*, 2006) Hoy en día el diagnóstico definitivo debe basarse en la presencia de una mutación en uno de los dos genes asociados con la enfermedad, por lo que se recomienda un cribado genético mediante el análisis de mutaciones en los genes *CLCN5* y *OCRL* en todos los pacientes que presentes PBPM indistintamente de cualquier otra característica (nefrolitiasis o nefrocalcinosis, hipercalciuria, raquitismo o ERC) (Edvardsson *et al.*, 2013; Zaniew *et al.*, 2017).

En la actualidad se están utilizando técnicas de última generación, como es el caso de la secuenciación de paneles multigénicos que incluyen *CLCN5*, *OCRL* y otros genes de interés, o pruebas genómicas más completas (cuando estén disponibles), como la secuenciación del exoma y del genoma completos. Dichas pruebas podrían proporcionar o sugerir un diagnóstico no considerado previamente debido al hallazgo de una mutación en uno o varios genes diferentes, que resulta en una presentación clínica similar (Lieske *et al.*, 2017; Gianesello *et al.*, 2020).

Otro enfoque en el diagnóstico es el fenotipado inverso, el cual se describe como un flujo de trabajo de diagnóstico invertido que comienza con el cribado genético y termina con

un diagnóstico clínico. Este enfoque se utiliza cada vez con más frecuencia, especialmente en aquellos casos clínicos que no se resuelven genéticamente con *NGS*. Este tipo de enfoque ayudó a identificar un par de casos de ED previamente diagnosticados erróneamente, ampliando el espectro de fenotipos atípicos de la ED (Trautmann *et al.*, 2018; Yamamura *et al.*, 2019).

En cuanto al diagnóstico mediante realización de biopsias, los resultados pueden ser desde normales hasta mostrar glomeruloesclerosis, atrofia tubular o cicatrización intersticial sin inflamación (Murakami & Kawakami, 1990; Frymoyer *et al.*, 1991; Langlois *et al.*, 1998; Moulin *et al.*, 2003; Hodgin *et al.*, 2008). En algunos casos se ha descrito la presencia de GEFG o GEFS en el estudio histológico, sin observarse síntomas claros de la ED, sin embargo, en todos los casos se encontraron mutaciones en *CLCN5*, por lo que se sugirió el diagnóstico de esta enfermedad en pacientes que mostraran proteinuria asintomática, pero con GEFG o GEFS, sin evidencia de enfermedad glomerular primaria (Copelovitch *et al.*, 2007).

#### **2.4. HETEROGENEIDAD GENÉTICA DE LA ED**

El 65% de los pacientes diagnosticados con la ED presenta mutaciones en el gen *CLCN5* (Jentsch *et al.*, 1995; Thakker, 1997; Waldegger & Jentsch, 2000) y el 15-20% presenta mutaciones en el gen *OCRL* (Hoopes *et al.*, 2005; Böckenhauer *et al.*, 2015). El porcentaje restante (10-15%) no presenta mutaciones en estos genes, clasificándose como ED de tipo 3 (ED3) (Anglani *et al.*, 2015). En el pasado, muchos autores han intentado identificar otros genes causantes de la ED. *CLCN4*, el gen que codifica para la proteína CIC-4, fue el primero en ser investigado debido a la cercanía en la localización dentro del cromosoma X, así como su función en conjunto con CIC-5 (Ludwig & Utsch, 2004; Wu *et al.*, 2009) pero no se encontraron mutaciones en pacientes. La cofilina (*CFL1*) fue otra proteína candidata, debido a que participa en la endocitosis de proteínas de bajo peso molecular en conjunto con *CLCN5* y *OCRL*, pero no encontraron variantes patogénicas (Wu *et al.*, 2009). Lo mismo se puede decir para los genes *SLC9A6* que codifica para la proteína NHE3 y para el gen que codifica para la colectrina, *TMEM27* (Tosetto *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009).

#### **2.5. TRATAMIENTOS ACTUALES**

Las principales opciones actuales con las que cuentan los pacientes con la ED1 son medidas paliativas dirigidas a reducir el riesgo de formación de cálculos renales y a retrasar la progresión hacia la ERC. Se pueden recetar fármacos para modificar la calciuria y la pro-

teinuria bajo el supuesto de que estos síntomas están relacionados con la aceleración hacia la progresión de la ERC. Sin embargo, los datos recientes no muestran ninguna asociación entre la nefrocalcinosis y la progresión de la ERC en grandes cohortes de pacientes con mutaciones en *CLCN5* u *OCRL* (Blanchard *et al.*, 2016; Zaniew *et al.*, 2017). Para la reducción de la proteinuria, característica clave en la ED1 y ED2, se ha ensayado el uso de fármacos que inhiben el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), donde los inhibidores de la ECA (iECA), empleados principalmente en la hipertensión arterial, y los bloqueadores de los receptores de angiotensina II (BRA), parecen ser eficaces para reducir la proteinuria en la ED, aunque los datos no son concluyentes (Blanchard *et al.*, 2016; Zaniew *et al.*, 2017). Otro estudio mostró una reducción de los niveles de albuminuria presentes en algunos pacientes con ED1 y ED2 mediante el uso de inhibidores del SRAA, observando la reducción de la proteinuria en la mitad de los individuos con enfermedad glomerular confirmada (Deng *et al.*, 2020).

Respecto a los defectos óseos, se ha intentado tratar el raquitismo mediante la administración de vitamina D (Wrong *et al.*, 1994). Sin embargo, esto puede causar empeoramiento de la hipercalciuria por lo que algunos médicos desaconsejan su uso, a menos que se trate de casos de enfermedad ósea clínica (Blanchard *et al.*, 2016).

En cuanto a la hipercalciuria, hasta ahora se ha recomendado el tratamiento con diuréticos tiazídicos con el fin de reducir la excreción de calcio urinario, formación de cálculos renales recurrentes, así como el aumento de la densidad ósea (Zaniew *et al.*, 2017). Estos compuestos mejoran la excreción renal de  $\text{Na}^+$  a través de la inhibición del cotrasportador  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  presentes en las células del túbulo contorneado distal (Monroy *et al.*, 2000). Asimismo, se ha demostrado que también son efectivos para mejorar la reabsorción pasiva de calcio en el túbulo proximal, por lo que son buenos candidatos para su uso en la ED (Nijenhuis *et al.*, 2005). Sin embargo, el uso de tiazidas en dosis altas puede causar efectos secundarios como hipovolemia y daño renal agudo, por lo que se recomienda su empleo con precaución en pacientes con la ED (Lieske *et al.*, 1993; Raja *et al.*, 2002; Blanchard *et al.*, 2008).

En ratones *Clcn5* KO (del inglés “*knockout*”) a los que se les administró una dieta alta en citrato se observó una reducción de la hipercalciuria y un retraso en la progresión hacia el daño renal (Cebotaru *et al.*, 2005). Aún no se han llevado a cabo ensayos clínicos concluyentes en humanos, sin embargo, se puede llegar a administrar citrato en pacientes con la ED1 (Lieske *et al.*, 2017; Zaniew *et al.*, 2017).

Por otro lado, la suplementación de fosfato se recomienda para el tratamiento de la hipofosfatemia o enfermedad ósea (Lieske *et al.*, 1993; Zaniew *et al.*, 2017).

En último término, los pacientes con la ED pueden ser sometidos a trasplante renal. En estos casos, la nefrolitiasis y nefrocalcinosis no recurren (Scheinman, 1998).

### 3. ENFERMEDAD DE DENT 1 Y LA PROTEÍNA CLC-5

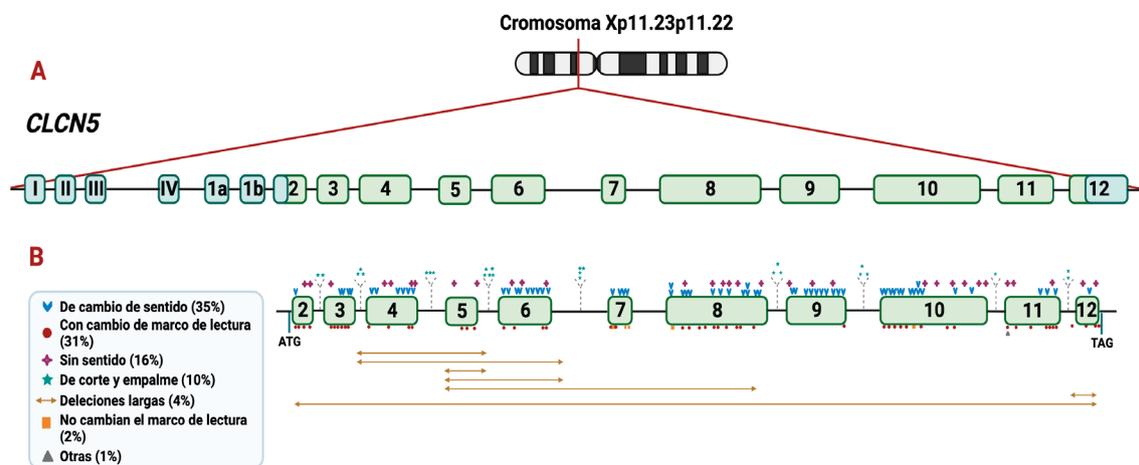
#### 3.1. EL GEN *CLCN5*

La ED1 está causada por mutaciones en el gen *CLCN5*, el cual está localizado en la región pericentromérica del cromosoma X (Xp11.23/11.22) (**Figura 2. A**). Abarca alrededor de 170 Kb de ADN genómico, con una región codificante de 2,238 pb que incluye 17 exones, de los cuales solo 11 son codificantes (desde el 2 hasta el 12) (Scheinman *et al.*, 1993; Fisher *et al.*, 1994; Fisher *et al.*, 1995; Scheel *et al.*, 2005). Se han identificado exones alternativos en la región 5' de *CLCN5* que no se traducen (Fisher *et al.*, 1994; Fisher *et al.*, 1995; Forino *et al.*, 2004; Hayama *et al.*, 2000; Ludwig *et al.*, 2003; Tosetto *et al.*, 2014).

Este gen puede generar 5 transcritos distintos, 2 de los cuales (Transcrito 3 [NM\_000084.5] y 4 [NM\_001282163.1]) codifican la proteína canónica CLC-5, de 746 aminoácidos. Los transcritos 1 [NM\_002227899.3] y 2 [NM\_001127898.3]) codifican para una proteína de 816 aminoácidos. Se trata una isoforma larga de la proteína CLC-5 (ICLC-5) con 70 aminoácidos adicionales, y es el producto obtenido a partir de la inclusión de los exones alternativos I-IV, presentes en el extremo 5' del gen *CLCN5* (**Figura 2**) (Ludwig *et al.*, 2003). El transcrito 5 [NM\_001282163.1] no codifica para ninguna proteína.

Para este gen, se han observado 2 promotores funcionales fuertes y uno débil (Hayama *et al.*, 2000; Tosetto *et al.*, 2014;), que pueden dar lugar a 11 formas distintas de ARN mensajero (ARNm) (isoformas de la región 5'UTR, del inglés “*untranslated regions*”) de *CLCN5* (variantes 1-11). El análisis del marco de lectura abierto sugirió que todas excepto tres isoformas (variantes 1, 2 y 4) codifican para la proteína canónica CLC-5 (Tosetto *et al.*, 2014). En riñones sanos, se ha observado que el ARNm que mayormente se expresa es la variante 3, aunque también se puede encontrar expresada a menor nivel en tejidos como la corteza adrenal, la glándula suprarrenal, musculo esquelético, hígado, placenta, intestino, próstata, células gliales y también en leucocitos (Steinmeyer *et al.*, 1995; Vandewalle *et al.*, 2004; Tosetto *et al.*, 2014). En un estudio de Ceol y colaboradores, en el que analizaron biopsias de riñones controles y con glomerulonefritis, encontraron que algunas de las isoformas promovidas por promotores débiles se expresaban más en riñones con glomerulonefritis, lo que sugirió a los autores que la regulación transcripcional de *CLCN5* podría estar inducida por proteinuria (Ceol *et al.*, 2020).

Hasta la fecha se han descrito más de 300 variantes patogénicas presentes en el gen *CLCN5* (Mansour-Hendili *et al.*, 2015; Giancesello *et al.*, 2021) (*Human Gene Mutation Data Base* (HGMD); <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) la mayoría de las mutaciones encontradas son de tipo cambio de sentido (35%), de cambio de marco de lectura (31%), seguidas de las variantes de parada (16%) y las mutaciones de corte y empalme o *splicing* (10%). Con una menor frecuencia (1-2%), podemos encontrar inserciones, deleciones, mutaciones complejas, inserciones de elementos Alu y mutaciones en regiones 5'UTR (**Figura 2.B**). Lo que demuestra la heterogeneidad alélica presente en la ED1.



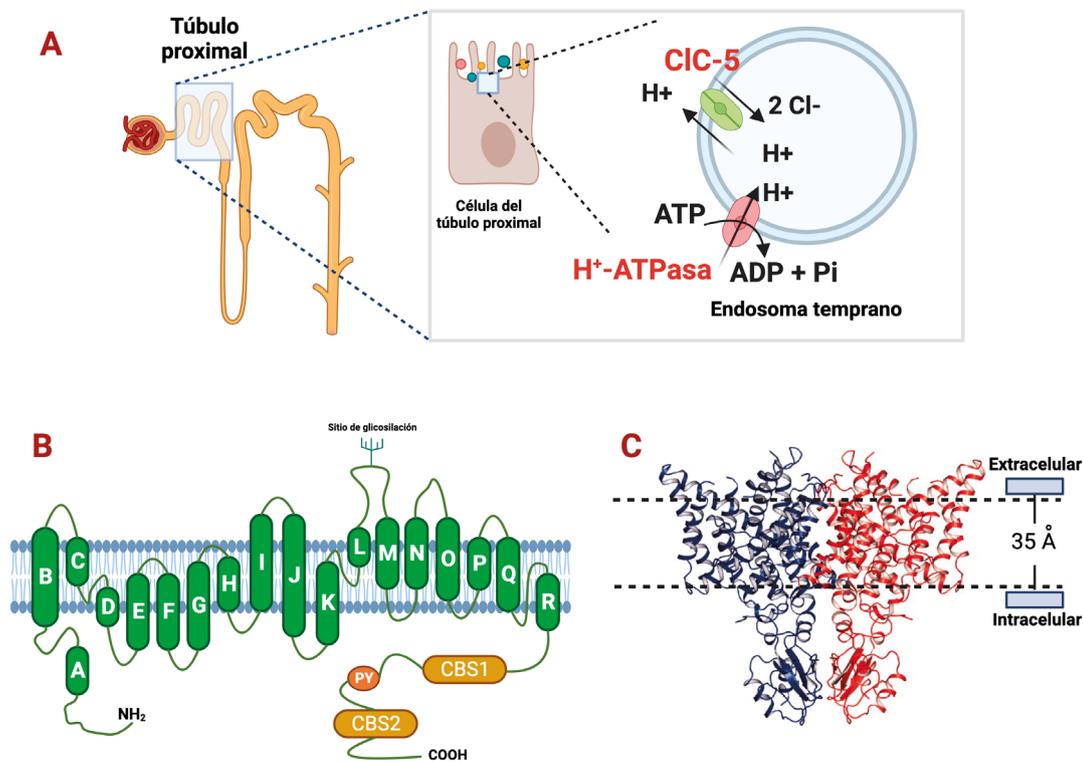
**Figura 2. A)** Representación esquemática del gen *CLCN5*. **B)** Localización de las mutaciones descritas hasta la fecha en *CLCN5*.

### 3.2. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA CLC-5

El gen *CLCN5* codifica para la proteína CLC-5, un intercambiador  $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$  dependiente de voltaje (**Figura 3.A**) perteneciente a la familia CIC de canales de cloruro e intercambiadores de cloruro y protones (CLC-1 a CLC-7, CLCKa y CLCKb). CLC-5 se expresa mayoritariamente en los epitelios renal e intestinal (Steinmeyer *et al.*, 1995, Vandewalle *et al.*, 2001). En el riñón, se expresa principalmente en las CTP, en las células  $\alpha$ -intercaladas del tubo colector y en las células epiteliales de la rama ascendente gruesa del asa de Henle, donde se expresa en menor medida (Devuyst *et al.*, 1999). En las CTP, CLC-5 juega un rol fundamental en la acidificación de los endosomas tempranos, donde colocaliza con la ATPasa de  $\text{H}^+$ , por lo que participa en el proceso de endocitosis mediada por receptores de albúmina y de proteínas de

BPM que atraviesan el glomérulo (Gunther *et al.*, 1998; Devuyst *et al.*, 1999). El mantenimiento del pH ácido en los endosomas es importante para la disociación del ligando-receptor y el posterior reciclaje del receptor en la membrana apical y la degradación del ligando en los lisosomas (Hara Chikuma *et al.*, 2005; Pusch & Ziffarelli, 2015). En este sentido, el mal funcionamiento de ClC-5 explicaría el defecto en la endocitosis de las proteínas de BPM observado en modelos animales y pacientes. Una pequeña fracción de ClC-5 parece estar presente en la membrana plasmática, aunque de forma transitoria (Sakamoto *et al.*, 1999).

Respecto a su estructura secundaria, ClC-5 está constituida por 18  $\alpha$ -hélices denominadas de A a R, dos dominios citoplasmáticos cistationina beta-sintasa (CBS) y un motivo rico en prolinas (PY) (**Figura 3.B**) (Bateman *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2004). Los dominios CBS están involucrados en la regulación de la actividad de la proteína. Dos ácidos glutámicos son cruciales para el correcto funcionamiento de ClC-5, Glu211 (“*gating glutamate*”) (Dutzler *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2004) y el Glu268 (“*proton glutamate*”) (Zdebik *et al.*, 2008; Grieschat & Alekov 2011), donde el *proton glutamate* participa en el transporte de H<sup>+</sup>, mientras que el *gating glutamate*, es importante tanto en el transporte de H<sup>+</sup> como en el voltaje de ClC-5 (Igarashi, 1998), en este sentido, las mutaciones que afectan a estos aminoácidos pueden generar la pérdida de la entrada de H<sup>+</sup>, convirtiéndola en un canal de Cl<sup>-</sup> (Smith & Lippiat, 2010). También encontramos un dominio de N-glicosilación localizado en el aminoácido Asn408 (Wu *et al.*, 2003). Este dominio juega un rol importante en el plegamiento y oligomerización de la proteína. Se ha demostrado que mutaciones pueden conseguir que la proteína se poliubiquitine y sea transportada a los proteosomas (Schmieder *et al.*, 2007; D’Antonio *et al.*, 2013). El estudio cristalográfico de la estructura de proteínas homologas ClC en bacterias sugiere que la proteína ClC-5 funciona como un homodímero (**Figura 3.C**), donde sus  $\alpha$ -hélices B, H, I, O, P y Q participan en la formación de la interfaz entre los dos monómeros y son necesarias para la correcta formación del poro (Wu *et al.*, 2003). Las hélices D, F, N y R, las cuales están localizadas cercanas al poro, están involucradas en la selectividad del filtro de Cl<sup>-</sup> (Pusch *et al.*, 1997; Grand *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2003). El rol de la hélice E aún está por determinar, pero se ha observado que mutaciones cercanas pueden causar la pérdida de conductividad del Cl<sup>-</sup> o la pérdida de voltaje como consecuencia de retención de la proteína en el retículo endoplasmático (RE) (Lloyd *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2003; Grand *et al.*, 2009). Por otro lado, se ha visto que mutaciones localizadas en la zona de unión de los monómeros de ClC-5, pueden desestabilizar potencialmente su formación afectando a la configuración del poro, lo que se traduce en la pérdida o reducción de la actividad del canal (Günther *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2003; Lourdel *et al.*, 2012; Pusch & Ziffarelli, 2015).



**Figura 3.** Representación esquemática de la función y estructura de la proteína CIC-5. **A)** CIC-5 como intercambiador de  $2 \text{ Cl}^-/\text{H}^+$  en los endosomas tempranos de las células del túbulo proximal. **B)** Representación esquemática de la estructura secundaria de CIC-5. **C)** Representación del homodímero de CIC-5.

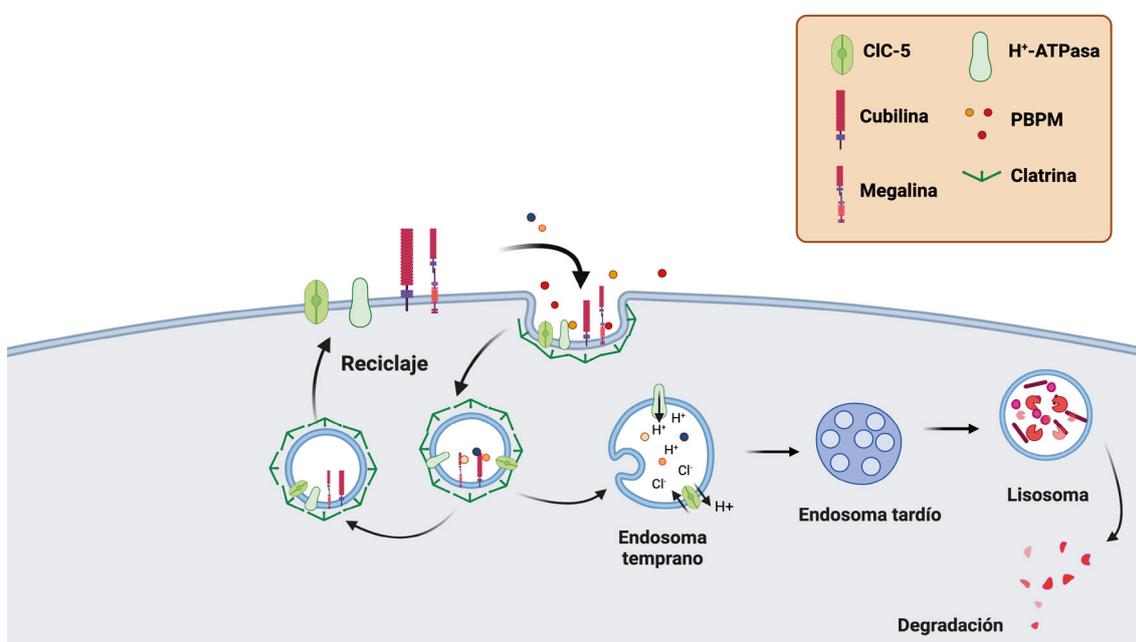
### 3.3. PATOGÉNESIS DE LA ED1

La reabsorción de nutrientes y proteínas en el túbulo proximal se lleva a cabo mediante el proceso de endocitosis mediada por receptores, entre los que encontramos el complejo multiligando megalina-cubilina, localizado en la membrana apical de las CTP (Christensen & Birn, 2002). Su función consiste en la endocitosis de una variedad de ligandos filtrados con afinidades variables, como es el caso de las proteínas de BPM, seguida de la entrega de estos ligandos a los lisosomas (Nielsen *et al.*, 2016) (**Figura 4**).

Mediante el estudio de un modelo de ratón *Clcn5* KO se determinó que un defecto en CIC-5 causaría la desregulación de los receptores de megalina y cubilina, afectando la expresión o el tráfico de estos receptores y dando lugar a la PBPM (Christensen *et al.*, 2003; Piwon, 2000; Erdmann *et al.*, 2007).

CIC-5 participa en el proceso de acidificación de los endosomas tempranos, necesario para el proceso de endocitosis (Clague *et al.*, 1994) junto a otra proteína intercambiadora, la

H<sup>+</sup>-ATPasa (Herak-Kramberger *et al.*, 1998) (**Figura 3**), que carece de acoplamiento con el transporte de contraiones, lo que da lugar a su acción electrogénica. En este sentido, se creía que solo ClC-5 era necesaria para impulsar la acidificación endosómica, independientemente de la H<sup>+</sup>-ATPasa (Scheel *et al.*, 2005; Smith & Lippiat, 2010), sin embargo, otros autores apoyan una cooperación entre ambas proteínas en el proceso de equilibrio iónico en el endosoma, gracias a la afluencia de Cl<sup>-</sup> inducida por ClC-5 (Günther *et al.*, 1998), debido a la acción reducida de la H<sup>+</sup>-ATPasa en pacientes con la ED (Satoh, 2016). En este sentido, la alteración del proceso de acidificación de los endosomas observado en pacientes y en los ratones *Clcn5* KO estaría causado por la pérdida de permeabilidad de Cl<sup>-</sup> mediada por ClC-5 (Devuyt *et al.*, 2005).



**Figura 4.** Representación del papel de ClC-5 en el proceso de endocitosis de las proteínas de BPM y en la acidificación de los endosomas.

La inactivación de ClC-5 también está relacionada con la alteración del metabolismo de calcio y fosfato, según se ha observado en estudios *in vitro* y en modelos animales *Clcn5* KO (Anglani *et al.*, 2019). De forma general, la mayor parte de la reabsorción de calcio y fosfato ocurre en las CTP mediante endocitosis. Aproximadamente el 98% del calcio filtrado se reabsorbe a lo largo de la nefrona, de forma paracelular en el TP y en la rama gruesa ascendente del asa de Henle y por vía transcelular en el túbulo contorneado distal y el túbulo colector (Moor & Bonny, 2016), mientras que el 80% del fosfato filtrado se reabsorbe en la orina a través de

transportadores tubulares proximales, principalmente en las nefronas yuxtamedulares (Wagner *et al.*, 2014; Blaine *et al.*, 2015).

En el TP, la reabsorción del calcio puede ocurrir por dos vías; principalmente por vía paracelular por difusión pasiva pero mediado por otras moléculas como sodio, cloro o bicarbonato y, en menor medida (un 15% del calcio reabsorbido) mediante el transporte activo regulado por la PTH (Blaine, Chonchol & Levi, 2014; Moor & Bonny, 2016). Cuando se secreta la PTH, llega a las CTP donde puede ser captada por su receptor específico o a través del complejo megalina-cubilina. Dentro de las CTP, la PTH estimula la síntesis de la enzima  $1\alpha$ -hidroxilasa mitocondrial, cuya función es convertir el precursor inactivo de vitamina D, 25(OH)-VitD3 en la hormona activa  $1,25(\text{OH})_2$ -VitD3 o calcitriol, cuyas funciones fundamentales son aumentar la absorción de calcio y fósforo en el intestino, inhibir la formación de osteoclastos para la reabsorción ósea y reducir la producción de la PTH (Murayama *et al.*, 1999; Girgis *et al.*, 2013). Por otro lado, la enzima 24-hidroxilasa convierte al calcitriol en su metabolito biológicamente inactivo. En condiciones patológicas, la PTH no es reabsorbida por las CTP, sino que se acumula en el segmento más distal del túbulo proximal, como lo demuestra el hecho de que los niveles de esta hormona están elevados tanto en la orina de pacientes como en la de ratones *Clcn5* KO (Piwon *et al.*, 2000; Norden *et al.*, 2001). El aumento de las concentraciones tubulares de la PTH induce la regulación positiva de la  $1\alpha$ -hidroxilasa, causando a su vez el incremento de calcitriol, lo que se observa en ratones KO para *Clc-5* y pacientes con ED1 (Anglani *et al.*, 2019). Cabría esperar por tanto una estimulación de la absorción de calcio intestinal, sin embargo, los estudios experimentales no lo han demostrado y en su lugar apuntan a una pérdida renal primaria de calcio y al aumento del recambio óseo, por medio de un mecanismo desconocido hasta la fecha (Silva *et al.*, 2003).

La reabsorción de 25(OH)-VitD3 mediante endocitosis en el TP también es defectuosa en ratones *Clcn5* KO y una gran cantidad de 25(OH)-VitD3 aparece en la orina final (Anglani *et al.*, 2019). Como el complejo megalina-cubilina media la reabsorción de la proteína de unión a vitamina D (DBP) (unido a su vez a la vitamina D) y la PTH que son filtradas por el glomérulo, la pérdida urinaria de estas hormonas en los ratones KO para *Clc-5* y en los pacientes con ED1 podría dar lugar a efectos opuestos en las células del túbulo proximal. Estos efectos podrían resultar en niveles variables en suero de calcitriol, y esto podría explicar las diferencias encontradas entre los dos modelos de ratones KO y la variabilidad en la manifestación de hipercalciuria y nefrolitiasis observada en los pacientes con la ED (Piwon *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2000, Guggino *et al.*, 2007, Scheinman *et al.*, 2009). La pérdida urinaria de DBP, que transporta la mayor parte de vitamina D circulante en plasma, puede explicar la manifestación de defectos óseos (Devuyt *et al.*, 2007).

Hasta el momento, no está claro el mecanismo por el cual se observa la hipercalciuria en pacientes con ED, encontrándonos con dos hipótesis. En una de ellas se sugiere que la hipercalciuria observada en pacientes con la ED1 es intrínseca a los mecanismos renales. Esta hipótesis está respaldada por el hecho de que este síntoma está ausente en pacientes después de un trasplante renal (Frymoyer *et al.*, 1991; Scheinman *et al.*, 1998). Por otro lado, se propone la posibilidad de que CIC-5 podría estar relacionado con la absorción gastrointestinal de calcio y que la hipercalciuria observada en pacientes con ED1 pueda ser un evento secundario (Hoopes *et al.*, 1998).

La absorción de fosfato es también mediada por la PTH a través de la regulación del cotransportador de sodio-fosfato NaPi-II-a, responsable de la absorción de fosfato en el túbulo proximal (Hilpert *et al.*, 1999). En condiciones patológicas, la acumulación de la PTH en el segmento más distal del túbulo proximal aumentaría la estimulación de los receptores para esta hormona presentes en las células del segmento distal del túbulo proximal, lo que dispararía la internalización y degradación de NaPi-II-a presente en la membrana, causando un incremento en la concentración de fosfato urinario. Este hecho explicaría la hiperfosfaturia observada en pacientes con la ED y ratones KO para CIC-5, un factor que favorece la nefrolitiasis como una consecuencia indirecta de la alteración de la endocitosis (Sayer *et al.*, 2004).

Por otro lado, se ha observado la relación de CIC-5 con otras proteínas de membrana, como es el caso de la isoforma 3 del intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE3), la cofilina y KIF1B (Anglani *et al.*, 2019). NHE3 es un intercambiador localizado en el borde en cepillo de las CTP responsable principal de la reabsorción de  $\text{Na}^+$  y agua en el TP. Alteraciones de este intercambiador están relacionadas con la pérdida de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que la entrada de  $\text{Na}^+$  crea una fuerza impulsora para la reabsorción de agua que, a su vez, impulsa la entrada paracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Brett *et al.*, 2005). En los dos modelos murinos *Cln5* KO se observó que la ausencia de CIC-5 causaría la pérdida de la localización de NHE3. También se relacionó la disminución de la actividad de NHE3 con la poliuria observada en estos ratones, ya que la reabsorción de agua en el TP se vería alterada como consecuencia de la actividad reducida de este intercambiador (Wang, 2000; Piwon *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2003; Günther *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2012).

La cofilina (*CFL1*) es una proteína despolimerizadora de actina que participa en el proceso de remodelación de esta, necesario para facilitar la gemación de la membrana plasmática y la endocitosis de albúmina mediada por vesículas recubiertas de clatrina. Se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* que existe una relación entre la cofilina y el extremo C-terminal de CIC-5 (Fujimoto, 2000; Hryciw *et al.*, 2003), y que esta interacción es necesaria para su expresión adecuada en membrana plasmática, junto con el factor-2 regulador de intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , Nedd-4, y KIF3B (Hryciw *et al.*, 2003, 2004 y 2006; Reed *et al.*, 2010).

#### 4. POSIBLES TERAPIAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ED1

Debido a su baja frecuencia y a la heterogeneidad genética y clínica, las enfermedades tubulares hereditarias como la ED1 son un asunto de difícil abordaje tanto para los médicos como para los investigadores básicos y epidemiólogos. El aumento del conocimiento sobre las bases genéticas y fisiopatológicas de ED1 no se ha traducido por el momento en opciones terapéuticas eficaces para estos pacientes. Al tratarse de una enfermedad rara, de poca incidencia, el desarrollo de medicamentos para ED1 por parte de la industria farmacéutica es escaso o inexistente. En la actualidad no hay ningún ensayo clínico farmacológico en desarrollo relacionado con esta patología (*EU Clinical Trials Register* <https://www.clinicaltrialsregister.eu/>, *NIH Clinical Center Trials* <https://www.clinicaltrials.gov/>, *WHO Clinical Trials Search Portal* <https://www.who.int/clinical-trials-registry-platform/the-ictrp-search-portal>).

En los últimos años se han comenzado a desarrollar estrategias terapéuticas personalizadas basadas en la comprensión del efecto de las mutaciones causales y los mecanismos reguladores implicados, y que permiten corregir o paliar los efectos de este tipo de mutaciones.

El reposicionamiento de fármacos es una estrategia en auge dirigida a identificar nuevos usos para medicamentos ya aprobados, lo que supone un menor riesgo de fracaso, pues la seguridad del fármaco ya ha sido probada en estudios clínicos y en ensayos pre-clínicos, una mayor rapidez en el desarrollo de la nueva aplicación y menores costes económicos, al menos en las fases pre-clínicas (Pushpakom *et al.*, 2019).

Las chaperonas químicas y farmacológicas son moléculas pequeñas capaces de penetrar en las células que se unen y estabilizan a una proteína diana. En muchas enfermedades causadas por mal plegamiento de proteínas, la chaperona estabiliza la proteína diana en el RE y le permite salir del mismo y ser transportada a través del Golgi hasta su destino final. En función del grado de especificidad en su modo de acción y su capacidad para unirse a la proteína diana y pueden ser de varios tipos: hidrofóbicos, osmolíticos y farmacológicos (Cortez & Sim, 2014). Diversos estudios han demostrado que la inhibición farmacológica del estrés de RE utilizando chaperonas de bajo peso molecular pueden aliviar los síntomas de patologías renales, neurológicas y respiratorias (Tanaka 2004; Kim *et al.*, 2013; Carlisle *et al.*, 2014; Wang, Di & Mu, 2014; Mohammed-Ali *et al.*, 2017). Es el caso del ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) y el 4-fenilbutirato de sodio (4-PBA); ambas chaperonas han mostrado su efectividad en estudios celulares y en modelos murinos relacionados con otras enfermedades, y su uso terapéutico en pacientes ya está autorizado en España y otros países. El TUDCA es un derivado endógeno de ácido biliar usado generalmente como agente protector hepático en el tratamiento de la coles-

tasis (Poupon *et al.*, 1999). Actúa como una chaperona química que inhibe la respuesta a estrés en el RE mediante el bloqueo de la respuesta a proteína desplegada (UPR, de inglés “*unfolding protein response*”) (Ozcan *et al.*, 2006; Amaral *et al.*, 2009), y ejerce acción neuro-protectora en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas (Khalaf *et al.*, 2022). La administración de TUDCA junto a riluzol (Elia *et al.*, 2016) y junto a 4-PBA (Paganoni *et al.*, 2020) en ensayos en fase II en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA) mostró un mayor efecto de detención en la progresión de la enfermedad frente a la administración independiente del otro fármaco. El 4-PBA es un inhibidor de deacetilasas de histonas (Collins *et al.*, 1995; Warrel *et al.*, 1998) y chaperona química (Vilatoba *et al.*, 2005), ampliamente estudiado como posible agente anticancerígeno y en enfermedades causadas por proteínas mal plegadas, como la fibrosis quística y enfermedades neurodegenerativas (Singh *et al.*, 2006; Villani *et al.*, 2023). Su potencial terapéutico se ha podido establecer en modelos de diferentes enfermedades *in vivo* e *in vitro*, donde se ha comprobado que atenúa el estrés de RE y disminuye la apoptosis en células del túbulo renal y la fibrosis intersticial renal (Chiang *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2016).

Como ya se ha indicado, la mayoría de las mutaciones causantes de ED1 son únicas en cada familia, por lo que resulta difícil establecer una correlación genotipo-fenotipo. Por ello, la comprensión del efecto real de las variantes es vital para el desarrollo de opciones terapéuticas. Para ello, y en la búsqueda de estrategias terapéuticas, nos centraremos en el estudio del efecto de mutaciones exónicas a nivel del procesamiento del ARNm o proceso de *splicing* mediante el uso de minigenes, el estudio del efecto de algunas mutaciones sobre la localización de la proteína a nivel celular en modelos celulares y, por último, el estudio del potencial terapéutico de las chaperonas en estos modelos celulares y en nuestro modelo animal.

#### **4.1. EFECTO DE MUTACIONES EXÓNICAS DE TIPO CAMBIO DE SENTIDO SOBRE EL PROCESAMIENTO DEL PRE-ARNM**

En las últimas dos décadas se ha hecho evidente que las presuntas mutaciones de cambio de sentido y sinónimas pueden también afectar el procesamiento del precursor del pre-ARNm (Wang *et al.*, 2007; Scotti & Swanson, 2016; Cartegni *et al.*, 2022).

##### **4.1.1. PROCESO DE CORTE Y EMPALME Y SECUENCIAS REGULADORAS**

El pre-ARNm es una molécula precursora del ARN mensajero (ARNm) maduro, que se sintetiza en el núcleo y que inicialmente está compuesta por secuencias codificantes o exones y no codificantes o intrones. El procesamiento del pre-ARNm (también llamado reacción de

corte-empalme o *splicing*) es una modificación co-transcripcional que ocurre sobre estas moléculas, y en general, consiste en una serie de reacciones en el núcleo celular donde las regiones intrónicas son eliminadas y los exones son enlazados de forma consecutiva en la molécula final de ARN mensajero maduro (ARNm) que contiene la secuencia de nucleótidos necesaria para la síntesis correcta de una proteína. Esta molécula madura, ya modificada, es transportada al citosol para allí ser traducida en proteína (Berget *et al.*, 1977; Pan *et al.*, 2008).

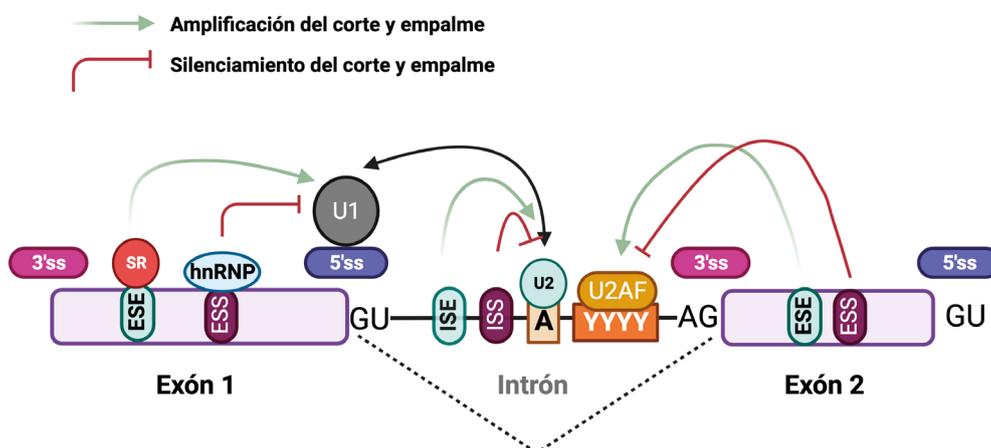
El 70% de los genes humanos expresan múltiples ARNm a través del proceso de corte y empalme alternativo de exones o parte de ellos (Johnson *et al.*, 2003), dando lugar a diferentes proteínas o isoformas. Este proceso está regulado por el espliceosoma, cuya función principal es el reconocimiento y unión de los exones y la correcta regulación del corte y empalme, con el fin de cumplir con los requisitos de las células y tejidos (Wang *et al.*, 2007). El espliceosoma está compuesto por un complejo de ribonucleoproteínas y factores auxiliares (Jurica *et al.*, 2003).

El procesamiento del pre-ARNm está regulado por elementos propios de la molécula generada durante la transcripción presentes en su secuencia, denominados elementos en *cis*. Estos elementos son secuencias o sitios consenso que ayudan a definir las regiones intrónicas y exónicas en la propia molécula de pre-ARNm y otras que actúan como sitios de reconocimiento y anclaje del espliceosoma. Son los sitios de corte y empalme 5' (sitio donador) y 3' (sitio aceptor), localizados en las uniones de exones e intrones, el punto de ramificación y el tracto de polipirimidinas, situados dentro de las secuencias intrónicas (**Figura 5**) (De Conti, Baralle & Buratti, 2013). Los sitios consensos presentes en los extremos 5' y 3' de la secuencia intrónica, contiene motivos GU (Guanina-Uracilo) y AG (Adenina-Guanina), respectivamente, y están presentes en un 98,7% de los casos. También se pueden encontrar motivos 5' y 3' no canónicos, pero que suelen ocurrir entre un 0,56 y un 0,99% de las veces (Anna & Monika, 2018). Por su parte, el punto de ramificación está caracterizado por un nucleótido de adenina (A) que se encuentra generalmente a unos 100 nucleótidos aproximadamente del sitio 3' en el intrón y es un elemento fundamental para las reacciones intermedias necesarias para el correcto procesamiento del pre-ARNm (Baralle & Baralle 2005). El tracto de polipirimidinas es una secuencia enriquecida con nucleótidos pirimidínicos localizado corriente abajo del sitio de ramificación dentro del intrón y suele estar compuesto principalmente por uracilos (U) (Ward & Cooper, 2010).

Además de los elementos mencionados, también participan elementos auxiliares que incluyen potenciadores exónicos (ESE, del inglés "*Exonic Splicing Enhancer*"), silenciadores exónicos (ESS, del inglés "*Exonic Splicing Silencer*"), potenciadores intrónicos (ISE, del inglés "*Intronic Splicing Enhancer*") y silenciadores intrónicos (ISS, del inglés "*Intronic Splicing Silencer*") (Gliso-

vic *et al.*, 2008) (**Figura 5**). Estos elementos son reconocidos por proteínas específicas (elementos en “*trans*”) que amplifican o inhiben o silencian el proceso de corte y empalme, favoreciendo la inclusión o la exclusión de una región determinada en la molécula final (Cartegni *et al.*, 2002) (**Figura 5**). El grupo de proteínas de unión a los elementos ESE mejor caracterizadas son la familia de proteínas ricas en serina y arginina, SR (del inglés “*Serin/Arginine-rich proteins*”), mientras que para el caso de los ESS y ISS, se encuentra el grupo de ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs, del inglés “*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*”) (Cartegni *et al.*, 2002). Las proteínas SR reconocen específicamente los potenciadores localizados en los exones o intrones mediante la interacción ARN/ARN en el sitio 5’ y el punto de ramificación, favoreciendo la formación del espliceosoma temprano y promoviendo la inclusión de los exones a los que están unidas (Cáceres y Kornblihtt 2002; Lee & Río 2015). Las proteínas silenciadoras hnRNPs (hnRNP A hasta la hnRNP U) (Han *et al.*, 2010) y se diferencian por el dominio de unión a ARN (RBD, del inglés “*RNA-binding domain*”), que es responsable de la especificidad de la interacción (Geuens *et al.* 2016). Su acción reguladora parece implicar un mecanismo llamado “bucle” en el que se bloquea el complejo espliceosoma. Otro mecanismo propuesto sugiere que las hnRNP recubren el exón y actúan como antagonistas de los ESE/ISE, evitando así su unión (Cáceres & Kornblihtt 2002; Zhang *et al.*, 2008a, b; Kolovos *et al.*, 2012).

En resumen, se trata de un proceso complejo que requiere de una regulación estricta para la correcta síntesis de las proteínas. En este sentido, mutaciones que causan la sustitución de nucleótidos puede afectar al reconocimiento de la maquinaria de *splicing*. De hecho, se ha demostrado que entre el 15 y el 50% de todas las mutaciones patógenas alteran los sitios de empalme y los elementos reguladores de empalme (Karczewski *et al.*, 2020).

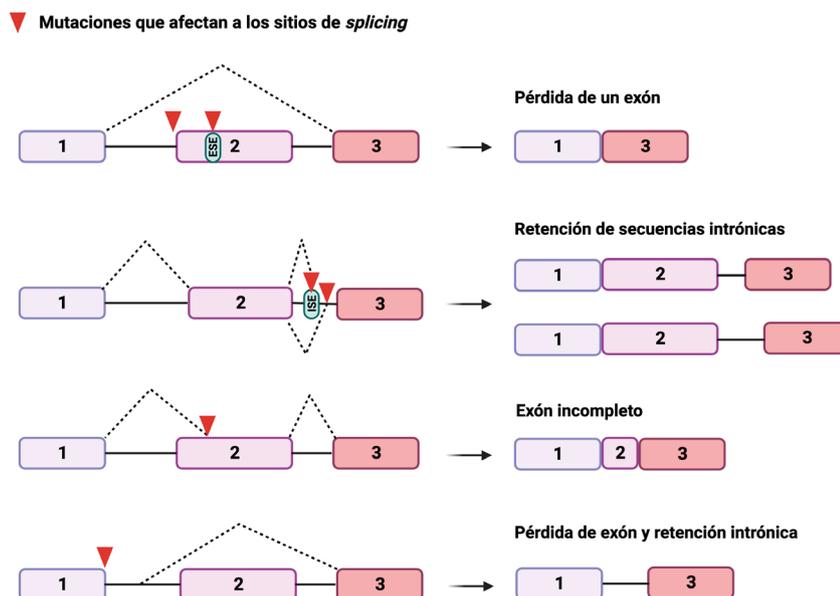


**Figura 5.** Elementos reguladores del proceso de splicing (Claverie-Martin *et al.*, 2015).

#### 4.1.2. MUTACIONES EXÓNICAS CON EFECTO SOBRE EL PROCESAMIENTO DEL PRE-ARNM

En este estudio nos centramos en las variantes de cambio de sentido, ya que son las que afectan en mayor proporción (35%) al gen *CLCN5* (Mansour-Hendili *et al.*, 2015; Gianese-llo *et al.*, 2020b). Las mutaciones de cambio de sentido son aquellas localizadas en regiones codificantes de los genes que dan lugar al cambio de un aminoácido por otro en la proteína codificada. Este cambio aminoacídico podría generar la pérdida total o parcial de la actividad de la proteína, alterar en mayor o menor medida la estructura de la que formará parte, o afectar su localización celular. Sin embargo, se sabe que un número considerable de éstas también alteran el procesamiento del pre-ARNm (Fackenthal *et al.*, 2002; Auclair *et al.*, 2006; Ramos-Trujillo *et al.*, 2007; Arnold *et al.*, 2009; Gonzalez-Paredes *et al.*, 2014 y 2016; Suarez-Artiles *et al.*, 2018; Perdomo-Ramirez *et al.*, 2019; Wai *et al.*, 2019, Mura-Escorche *et al.*, 2023). Esto es debido a que dichas mutaciones alteran o eliminan las secuencias del pre-ARNm implicadas en su procesamiento, actuando también como mutaciones de *splicing* (Liu *et al.*, 1997; D'Souza *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001; Campos *et al.*, 2003). La sustitución de nucleótidos en un ESE puede hacer que la proteína SR no se una a éste, lo cual haría que el espliceosoma no reconozca al exón y que el ARNm maduro no lo incorpore correctamente, o bien introduzca una región intrónica en el ARNm final (**Figura 6**) (McVety *et al.*, 2006; Drögemüller *et al.*, 2011). De la misma forma, la modificación de una secuencia ESS podría incrementar o disminuir la capacidad inhibidora del proceso, generando la eliminación o la incorporación de ciertas secuencias en la molécula de ARNm final (Wimmer *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008) (**Figura 6**).

Las mutaciones que pueden causar una modificación del procesamiento del pre-ARNm pueden ser clasificadas como variantes sinónimas, de cambio de sentido o sin sentido, pero en realidad estar dando lugar a cambios mucho más drásticos en la proteína resultante que los que cabría esperar por el cambio de aminoácido predicho. Además, se sabe que los codones de parada prematuros normalmente activan el sistema NMD (del inglés “*nonsense-mediated mRNA decay*”), un mecanismo conocido de degradación el ARNm que evita la producción de proteínas truncadas no funcionales (Nicholson *et al.*, 2010).



**Figura 6.** Alteraciones de *splicing* causadas por mutaciones en el gen *CLCN5*

#### 4.1.3. ESTUDIO FUNCIONAL DEL PROCESAMIENTO DEL PRE-ARN<sup>m</sup> USANDO MINIGENES

Para determinar el efecto de las variantes observadas en el gen *CLCN5* sobre el procesamiento del pre-ARN<sup>m</sup> y sus consiguientes consecuencias fenotípicas, es necesario que cada mutación se evalúe mediante estudios funcionales (Pagani & Baralle, 2004). El método ideal es el análisis de ARN a partir de muestras de tejidos de pacientes mediante RT-PCR (Baralle & Baralle, 2005). Sin embargo, la disponibilidad de este tipo de muestras suele ser limitada, por lo que el estudio con minigenes se ha convertido en una alternativa fiable. Se trata de un sistema híbrido que permite la expresión transitoria de fragmentos de interés del pre-ARN<sup>m</sup>, y el análisis de su procesamiento mediante RT-PCR. Este enfoque permite confirmar el efecto de una variante en el correcto procesamiento y/o regulación de uno o más exones (Sharma *et al.*, 2014).

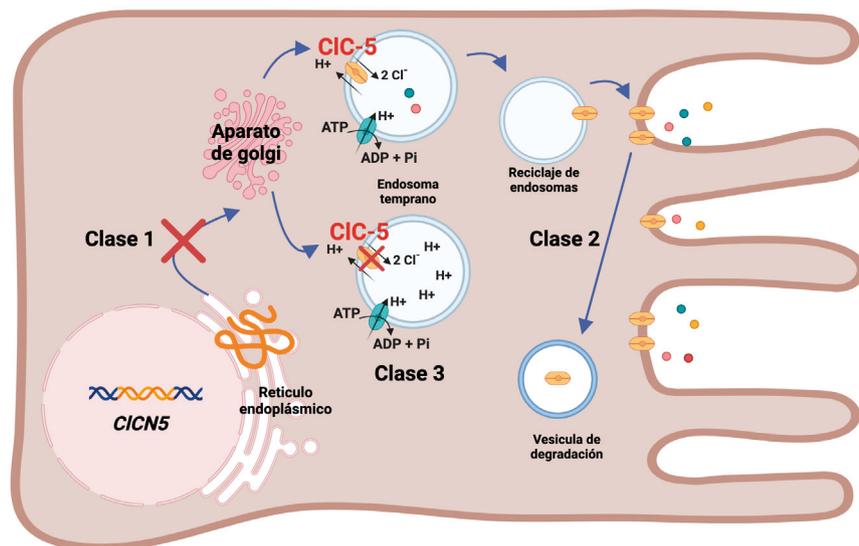
#### 4.2. MODELOS CELULARES PARA EL ESTUDIO DE MUTACIONES EXÓNICAS EN EL GEN *CLCN5*

Se estima que la variabilidad fenotípica observada en pacientes con la ED1 se debe en parte a los diferentes grados de afectación sobre la funcionalidad de Clc-5 causados por las variantes genéticas en *CLCN5*. Éstas han sido clasificadas según sus consecuencias gracias a estudios funcionales de proteínas Clc-5 de tipo salvaje y mutante en ovocitos de *Xenopus*

*laevis* (Lloyd, 1996; Lloyd, 1997), en células de riñón embrionario humano (HEK) (Smith & Lippiat, 2010; Grand *et al.*, 2011), en líneas celulares epiteliales tubulares proximales inmortalizadas de pacientes con ED1 (Gorvin *et al.*, 2013) e *in vivo* en ratones que albergan mutaciones *CLC-5* inducidas (Novarino *et al.*, 2010) (**Figura 7**) (Lieske *et al.*, 1993; Ludwig *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2009; Lourdel *et al.*, 2012; D'Antonio *et al.*, 2013):

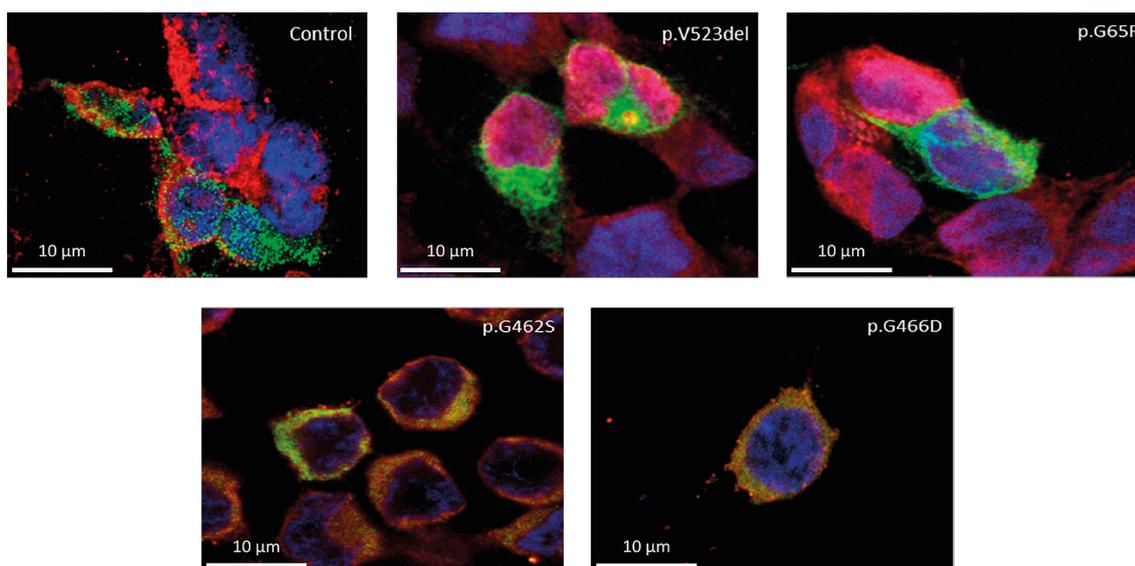
- **Clase 1:** Son aquellas mutaciones que afectan al procesamiento y al plegamiento de las proteínas, por lo que provocan la retención en el RE, la degradación de la proteína mutante y su ausencia en los endosomas tempranos y/o la superficie celular.
- **Clase 2:** Aquellas que producen un retraso en el procesamiento de la proteína, por lo que reducen su estabilidad.
- **Clase 3:** Estas mutaciones conducen a proteínas plegadas adecuadamente que pueden dirigirse correctamente a la membrana plasmática y a los endosomas tempranos, pero muestran una corriente de cloruro reducida o abolida.

Según algunos estudios funcionales mediante oocitos de *Xenopus laevis* y diferentes cultivos celulares, aproximadamente un 60% de las mutaciones estudiadas resultaron ser mutaciones de clase 1 (Morimoto *et al.*, 1998; Ludwig *et al.*, 2005; Tanuma *et al.*, 2007; Grand *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009; Grand *et al.*, 2011; Lourdel *et al.*, 2011). Sin embargo, una minoría de mutaciones no encajaría en ninguna de estas tres clases, lo que refleja la limitación de la clasificación y la necesidad de realizar análisis funcionales (Liu *et al.*, 2021).



**Figura 7.** Representación y clasificación de los mecanismos moleculares que causan mal funcionamiento de *CLC-5* (Adaptado de Lourdel *et al.*, 2012).

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron a través de experimentos de co-localización que cuatro mutaciones identificadas previamente en pacientes con la ED1, p.(G466D), p.(G462S), p.(G65R) y p.(V523del) (Ramos-Trujillo *et al.*, 2013) son mutaciones de clase 1, es decir, las cuatro proteínas mutantes son retenidas en el RE (**Figura 8**). Esto sugiere una biosíntesis defectuosa de CIC-5 y una acumulación anormal de la misma en el RE, al menos en un modelo de células epiteliales del túbulo proximal humanas.



**Figura 8.** Células embrionarias de riñón humano expresando proteínas CIC-5 mutantes. Núcleos en azul (DAPI), RE en rojo (calnexina) y proteína CIC-5 marcada en verde (proteína de fusión con GFP). En la imagen del control podemos ver cómo CIC-5 se distribuye por toda la célula, mientras que en las proteínas CIC-5 mutantes se puede ver la co-localización con el RE.

### 4.3. MODELOS *IN VIVO* PARA EL ESTUDIO DE LA ED1

La utilización de modelos *in vivo* ha sido fundamental para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos de las enfermedades, la investigación aplicada de estrategias terapéuticas y técnicas quirúrgicas, el desarrollo de vacunas y antibióticos o la determinación de la seguridad y la eficacia de diferentes fármacos. En este ámbito juega un papel crucial la utilización de ratones debido a su bajo costo, su corto ciclo reproductivo, su facilidad de manejo y su facilidad de manipulación genética, convirtiéndolos en un modelo animal popular y ampliamente utilizado para estudios *in vivo* (Ye & Chen, 2022). La legislación europea (Directiva 2010/63/EU) garantiza el bienestar animal y regula la aplicación de modelos *in vivo* en las investigaciones clínicas con el fin de asegurar su uso justificado; que las ventajas de la investigación

superen al sufrimiento infligido a los animales y que los objetivos propuestos para su uso no se puedan alcanzar por otros métodos alternativos al manejo animal. Esta normativa se centra la aplicación del principio de las tres “Rs”: Reemplazar el uso de los animales por otras técnicas en la medida de lo posible; reducir el número de animales utilizados al mínimo necesario, y refinar las técnicas para minimizar el dolor y la angustia (*European Animal Research Association*). En la actualidad, las políticas reguladoras avanzan en evitar el uso de animales en la experimentación mediante la aplicación de modelos computacionales, cultivos celulares y de tejidos o empleando organismos alternativos como el caso de vertebrados inferiores e invertebrados (Doke & Dhawale, 2015).

#### 4.3.1. MODELOS MURINOS DE LA ED

Los primeros modelos animales para el estudio de la ED1 se desarrollaron en el año 2000; dos ratones KO en los que se eliminó el gen *Clcn5*, por lo que la expresión de la proteína ClC-5 quedó anulada: El modelo Jentsch (Piwon *et al.*, 2000; Günther *et al.*, 2003) y el modelo Guggino (Wang *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2007). Estos ratones KO mostraron las principales manifestaciones renales de la ED1 y permitieron demostrar el papel de ClC-5 en la endocitosis y el tráfico de proteínas en las células del túbulo proximal, destacando la relación con las proteínas localizadas en el borde en cepillo megalina y cubilina (Christensen *et al.*, 2003). También arrojaron luz sobre la heterogeneidad fenotípica observada en la ED1, al observarse diferencias en la manifestación de la hipercalciuria y la nefrolitiasis.

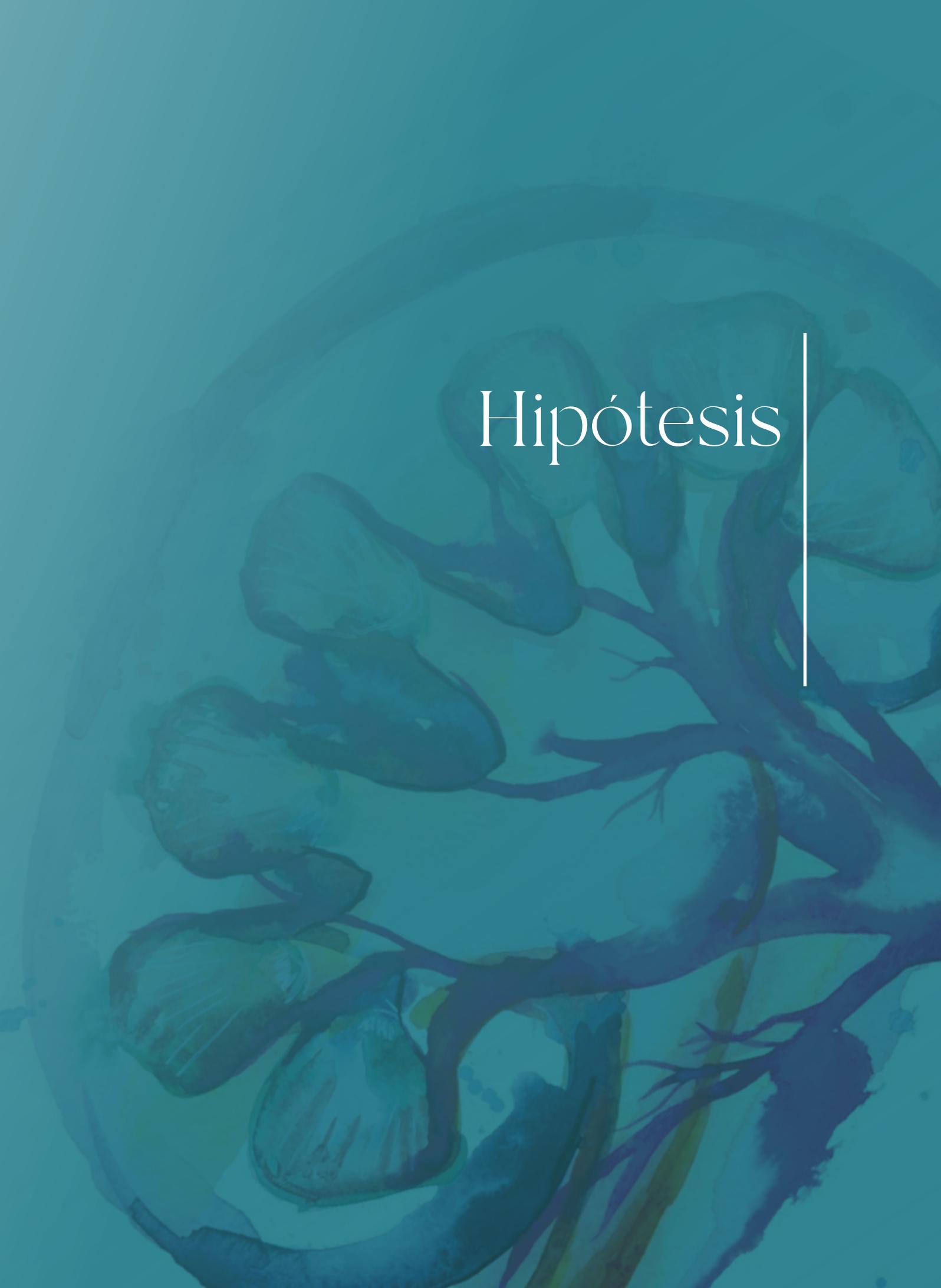
En el 2010, Novarino y colaboradores crearon un ratón *knock-in* (KI). A diferencia de los ratones KO, donde la expresión del gen es nula, los ratones KI en general expresan una proteína mutada. Estos modelos se utilizan como estrategia complementaria o alternativa al ratón KO y tienen varias aplicaciones incluyendo el estudio del papel fisiológico de la mutación específica que causa la enfermedad en humanos. En este modelo se introdujo una mutación no descrita en ningún paciente, la mutación p.(E211A) en el denominado *gating glutamate*, que desacopla el cotransporte de Cl<sup>-</sup> y H<sup>+</sup> y convierte a ClC-5 en un canal de Cl<sup>-</sup>, lo que permitió estudiar el papel de la proteína como intercambiador de Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> y su importancia en la endocitosis (Novarino *et al.*, 2010). Este modelo también mostró las características típicas de la ED, pero se observaron unos niveles normales de acidificación endosomal, lo que implica que un daño en este mecanismo no proporciona una explicación suficiente de lo observado en ED1.

Nuestro grupo ha desarrollado un ratón KI que presenta la mutación p.(V523del) (Perdomo-Ramírez, Tesis Doctoral y manuscrito en preparación). Esta mutación ha sido identificada en cinco pacientes (Wu *et al.*, 2009; Ramos-Trujillo *et al.*, 2013; Sekine *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2014; Hureaux *et al.*, 2019), observándose un fenotipo particularmente severo en el paciente español. Esta mutación implica la pérdida de la valina 523 en la proteína mutante, un residuo muy conservado en la evolución que es fundamental para el ensamblaje de las dos subunidades ClC-5 en el homodímero. La alteración en este residuo probablemente daría lugar a la formación de proteínas plegadas de manera incorrecta en RE. Se ha determinado mediante electrofisiología que esta delección causa la pérdida de conductancia de ClC-5 (Wu *et al.*, 2009), y mediante estudios de co-localización realizados en nuestro laboratorio, se ha clasificado como clase 1 (**Figura 8**). El ratón KI generado por nuestro grupo expresa la proteína mutante ClC-5 y muestra pérdidas significativas de proteína de bajo peso molecular y de fosfatos por la orina y otras características de la enfermedad como la poliuria (**Tabla 2**). Su fenotipo se asemeja al de ED1 por lo que es una herramienta ideal para el ensayo de terapias potenciales para pacientes con la ED1 que presenten mutaciones similares (Perdomo-Ramírez, Tesis Doctoral y manuscrito en preparación).

**Tabla 2.** Resumen de las medidas analizadas en los modelos *Clcn5* KO y el modelo KI *Clcn5*Val523del

Síntomas	Modelo KO Jentsch	Modelo KO Guggino	Modelo KI Claverie-Martín
PBPM	Presente	Presente	Presente
Poliuria	Presente	Presente	Presente
Fosfaturia	Presente	Presente	Presente
Hiper calciuria	Ausente	Presente	Presente
Nefrocalcinosis	Ausente	Presente	No estudiado
PTH sérica	Normal	Normal	No estudiado
Calcitriol en suero	Reducida	Incrementada	No estudiado
Calcitriol en orina	Incrementada	No estudiada	No estudiado





# Hipótesis



## HIPÓTESIS

- Algunas mutaciones de cambio de sentido tienen efectos dañinos porque dan lugar a ARN mensajeros defectuosos. Existen mutaciones exónicas de *CLCN5* causantes de la enfermedad de Dent-1 que alteran el procesamiento del pre-ARNm.
- Las mutaciones de clase 1 producen una proteína mal plegada que es retenida en el RE y por tanto su localización subcelular es susceptible de ser corregida, al menos parcialmente, mediante un tratamiento con chaperonas químicas, tanto en modelos celulares como en el ratón *knock-in Clcn5V523del*, pudiendo revertir el fenotipo propio de la enfermedad de Dent-1.





# Objetivos



## 1. OBJETIVOS GENERALES

- Determinar el efecto de mutaciones exónicas de *CLCN5* en el procesamiento del pre-ARN mensajero.
- Evaluar el efecto de las mutaciones de clase 1 seleccionadas sobre el funcionamiento y localización subcelular de la proteína CIC-5 en una línea celular de riñón humano.
- Evaluar el efecto de distintas chaperonas químicas seleccionadas sobre líneas celulares de riñón humano y sobre el modelo de ratón KI *Cln5V523del*.

## 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Realizar un estudio bibliográfico sobre las mutaciones exónicas de cambio de sentido descritas hasta la fecha.
- Predecir el efecto de las mutaciones seleccionadas para el estudio en el procesamiento del pre-ARNm (*splicing*) utilizando diferentes herramientas bioinformáticas.
- Seleccionar y analizar funcionalmente el efecto de algunas de estas mutaciones en el procesamiento del pre-ARNm en un sistema de minigenes.
- Generar modelos celulares en una línea celular de riñón humano en los que se expresen proteínas con las mutaciones de clase 1 p.(G65R), p.(G462S), p.(G466D) y p.(V523del).
- Estudiar la localización subcelular de las proteínas con las mutaciones de clase 1.
- Aplicar un tratamiento de chaperonas químicas (TUDCA y 4-PBA) sobre los modelos celulares generados y analizar su efecto sobre la expresión, la localización y la agregación de la proteína CIC-5.
- Tratar con una chaperona química (TUDCA) al ratón *knock-in* y analizar su efecto en los parámetros clínicos más relevantes de la ED.





# Materiales y métodos



## 1. EFECTO DE LAS PRESUNTAS MUTACIONES DE CAMBIO DE SENTIDO DEL GEN *CLCN5* SOBRE EL PRE-ARNM

### 1.1. ANÁLISIS IN SILICO DEL POSIBLE EFECTO DE MUTACIONES DE CAMBIO DE SENTIDO EN EL GEN *CLCN5*

Las mutaciones de cambio de sentido en el gen *CLCN5* fueron seleccionadas de la literatura (Mansour-Hendili *et al.*, 2015), de la base de datos HGMD, (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) y mutaciones exónicas encontradas en nuestros pacientes. Se analizaron utilizando herramientas bioinformáticas para predecir su patogenicidad y sus efectos potenciales sobre el proceso de corte y empalme (**Anexo I**). La nomenclatura para la descripción de las mutaciones siguió las directrices de la *Human Genome Variation Society* (HGVS) (<http://varnomen.hgvs.org/>). La numeración de nucleótidos se basó en la secuencia de ADNc del gen *CLCN5* (número de acceso de GeneBank NM\_000084.5) donde c.1 indica la posición del codón de inicio de la traducción.

La patogenicidad de las variantes se predijo utilizando la herramienta VarSome v11.5 (disponible online: <https://varsome.com/>; consultada: 15 diciembre 2022) y fueron clasificadas de acuerdo con las recomendaciones del *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (Richards *et al.*, 2017). Las variantes se clasificaron en cinco categorías: variante patogénica, probablemente patogénica, de significado incierto, probablemente benigna, y benigna.

Los criterios para la selección de mutaciones con efecto potencial en el procesamiento de pre-ARNm fueron: a) Proximidad a los sitios de empalme (sitios donadores y aceptores; +/- 70 nucleótidos desde el extremo de los exones), b) Predicciones establecidas por herramientas bioinformáticas: activación de sitios crípticos en los sitios de corte y empalme dentro del exón, así como, el efecto de las mutaciones en los elementos reguladores (pérdida de sitios *ESEs* o/y ganancia de *ESS*).

Las herramientas bioinformáticas utilizadas para determinar el efecto potencial de la variación en el proceso de empalme del pre-ARNm fueron las siguientes:

- *Splice Site Prediction by Neural Network* v0.9 (*NNSplice*; disponible online: [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html); consultado: 20 julio 2020), la cual fue utilizada para predecir el efecto potencial de las mutaciones en las regiones consenso de los sitios de corte y empalme 5' y 3', así como la posible creación y/o activación de sitios nuevos (Reese *et al.*, 1997) mediante la comparación de la secuencia salvaje del

exón y la mutante. Asigna un valor numérico entre 0.4 y 1, cuanto más próximo a 1 es el valor, mayor probabilidad de que esa secuencia sea reconocida por la maquinaria del espliceosoma.

- *MutPredSplice* v.1.3.2 (disponible online: <http://www.mutdb.org/mutpredsplice>; consultado: 20 octubre 2019), esta herramienta comprende múltiples características de las mutaciones que se integran en un modelo basado en aprendizaje automático para predecir el efecto de las variantes exónicas en el pre-ARNm. Ofrece puntuaciones en una escala del 0,1 a 1, considerando que las variantes tienen efecto potencial a partir del valor 0,6 (Mort *et al.*, 2014).
- *SPARN* (disponible online: <http://tools.genes.toronto.edu/>; consultado: 15 noviembre 2019) determina el efecto potencial de las variantes sobre las regiones exónicas e intrónicas flanqueantes del gen, dando como resultado el porcentaje de incorporación del exón en los transcritos (Xiong *et al.*, 2015).
- *CADD-splice* v.1.6 (*Combined Annotation Dependent Depletion*; disponible online: <https://cadd.gs.washington.edu/>; consultado: 20 febrero 2022) otorga una puntuación en función de si las variantes de un solo nucleótido (SNV, del inglés “*single nucleotide variant*”) perjudiciales tienen efecto sobre el proceso de corte y empalme, siendo los valores mayores de 20 indicativos de que la variante es dañina (Rentzsch *et al.*, 2021).
- *Human Splicing Finder* v3 (HSF) (disponible online: <https://hsf.genomnis.com/>; consultado: 10 agosto 2023) (Desmet *et al.*, 2009) analiza el efecto de las variantes sobre los sitios donadores y aceptores, el punto de ramificación, los sitios *ESE* y sitios *ESS*.
- *SpliceAI* v1.3.1 (disponible online: <https://spliceailookup.broadinstitute.org/>); consultado: 2 noviembre 2023) es una de las plataformas más utilizadas actualmente e indica el efecto de las variantes sobre los sitios canónicos de corte y empalme 5' y 3'. Las puntuaciones de *SpliceAI* varían de 0 a 1 y representan la probabilidad de que la variante afecte el proceso de corte y empalme (Valores <0,2; indican probabilidad baja. Valores <0,5; probabilidad media. Valores <0,8; indican alta precisión) (Jagannathan *et al.*, 2019)

El efecto de las sustituciones de aminoácidos en CIC-5 fue analizado con la herramienta *PolyPhen-2*, que usa consideraciones físicas y comparativas para predecir el impacto potencial de una sustitución de aminoácidos en la estructura y función de la proteína humana. Asigna una puntuación que va de 0 a 1, siendo 1 la mayor probabilidad de impacto (disponible online: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>; consultado: 22 junio 2022)(Adzhubei *et al.*, 2010); la herramienta *SIFT* (*Sorting Intolerant From Tolerant*) (disponible online: <http://>

sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT\_seq\_submit2.html; consultado: 22 junio 2022) (Sim *et al.*, 2012), predice si una sustitución de aminoácidos es tolerada o nociva; si la probabilidad es inferior a 0,05 la variante será perjudicial, mientras que valores mayores o iguales a 0,05 serán variantes toleradas. *MutPred2* (disponible online: <http://mutpred.mutdb.org>; consultado: 30 noviembre 2022) se utilizó para predecir el posible efecto fenotípico de la sustitución de un aminoácido en una proteína. Este programa indica el daño sobre la proteína mediante puntuaciones que van de 0 a 1, donde 1 es el mayor efecto (Pejaver *et al.*, 2022).

## **1.2. AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS GENÓMICOS DE *CLCN5* DE PACIENTES Y CONTROLES**

El efecto de las mutaciones de *CLCN5* sobre el procesamiento del pre-ARNm se evaluó mediante un sistema de minigenes y análisis de PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR). Para las construcciones de los minigenes se utilizaron 4 fragmentos que contiene los exones 3, 7, 9 y 10-11 y sus secuencias intrónicas flanqueantes (intrón 2 (172 pb (pares de bases))-exón 3 (100 pb)-intrón 3 (85 pb) (pET01ex3-WT); intrón 6 (196 pb)-exón 7 (81 pb)-intrón 7 (140 pb) (pET01ex7-WT); intrón 8 (104 pb)-exón 9 (187 pb)-intrón 9- (133 pb) (pET01ex9-WT); intrón 9 (162 pb)-exón 10 (399 pb)-intrón 10 (155 pb)-exón 11 (217 pb)-intrón 11- (149 pb) (pET01ex10-11), que fueron clonadas de forma independiente en el vector de expresión pET01 (MoBiTec, Göttingen, Alemania). Estos fragmentos fueron amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando como molde el ADN genómico de pacientes, y/o ADN de individuos sanos. Los cebadores fueron diseñados utilizando los softwares Primer 3 v0.4.0 (disponible online: <https://primer3.ut.ee/>; consultado: 20 octubre 2019) y SnapGene v5.0.4 (disponible online: [www.snapgene.com](http://www.snapgene.com); consultado: 25 octubre 2019) (**Tabla 3**). Las secuencias de los cebadores incluyeron dianas de restricción para las enzimas *XhoI* (CTCGAG), *XbaI* (TCTAGA) y *BamHI* (GGATCC) en sus extremos 5'.

Las reacciones se llevaron a cabo utilizando la polimerasa Kapa Taq PCR (Kapa Biosystems – Hoffman-La Roche, Wilmington, MA, USA), tampón de reacción específico que contiene 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de cada uno de los desoxinucleótidos (dNTPs), 0.5 μM de cada cebador y ADN de cada individuo (aproximadamente 250 ng), en un volumen final de 25 μl.

Las condiciones utilizadas para la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, anillamiento a la temperatura indicada para cada pareja de cebadores durante 30 segundos, y extensión a 72°C durante 1 minuto. Por último, un paso final de extensión a 72°C durante 7 minutos.

**Tabla 3.** Cebadores diseñados para la amplificación de los fragmentos codificantes de *CLCN5*.

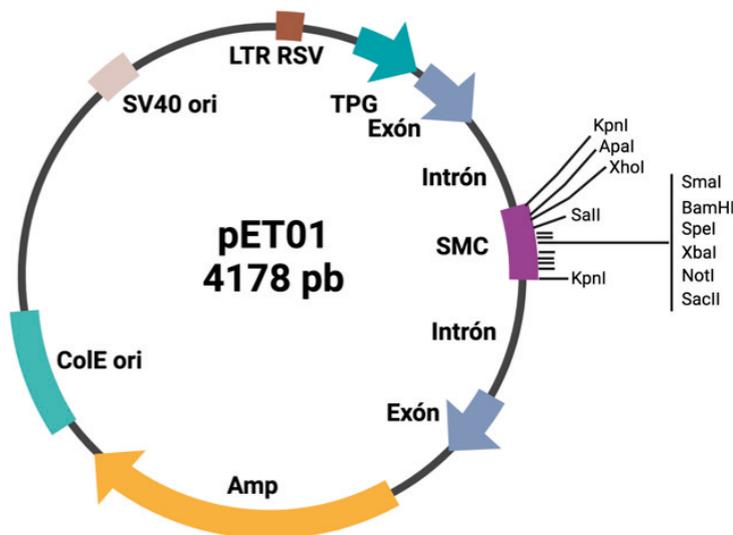
<b>Exones</b>	<b>Cebador directo (5'-3')</b>	<b>Cebador reverso (5'-3')</b>	<b>Tamaño</b>
<i>CLCN5</i> -Ex3	TTTACTCGAGGGTAAACCT- CAAAGTTGTTAGTG	TATAGGATCCGGTAGAAAAA- CAGGAAAACACAG	377 pb
<i>CLCN5</i> -Ex7	TTTTCTCGAGACCTGGT- CAAGCATGTGAAC	TATAGGATCCGTAAAGCAC- CAAGTTGGGGAG	417 pb
<i>CLCN5</i> -Ex9	ATATACTCGAGCCTTTACAGC- CACTTGCTAGCATA	TTTTGGATCCTTTCCTCATCT- GTATACCAGATGC	425 pb
<i>CLCN5</i> - Ex10,11	AATCTCGAGATCGTCTC- CATTGTG	ATGGGCTCTAGACTATC- CACTTTCATC	933 pb

### 1.3. CONSTRUCCIÓN DE MINIGENES

Los minigenes son construcciones plasmídicas generadas mediante técnicas de ADN recombinante, en las que un fragmento del gen en estudio que incluye uno o varios exones y las regiones intrónicas flanqueantes correspondientes, son clonados en un vector de expresión. La expresión transitoria en líneas celulares de esta construcción permite estudiar los patrones de expresión del gen a nivel de ARNm, e identificar elementos reguladores y moduladores del proceso del *splicing* del ARNm.

### 1.4. CLONACIÓN EN VECTOR DE EXPRESIÓN *EXONTRAP* (pET01)

Para la generación de los minigenes se utilizó el vector de expresión Exontrap (pET01), que tiene un tamaño de 4178 pb e incluye la secuencia de 2 exones, 5' y 3' separados por un intrón de 600 pb. Este intrón contiene una región con múltiples dianas de restricción para enzimas de corte único y múltiple, o sitio de multiclonaje. Así mismo, pET01 presenta un promotor eucariótico fuerte denominado “repetición terminal larga” del inglés “*Long Terminal Repeat*” (LTR), obtenido del Virus del Sarcoma de Rous (RSV), una pequeña extensión del gen eucariótico de la fosfatasa, el operón TPG, el origen de replicación ColE1, y el gen *Amp* que le confiere resistencia a la ampicilina. Para su replicación en células eucariotas contiene el origen de replicación SV40 proveniente del Virus del Simio 40 (**Figura 9**).



**Figura 9.** Representación esquemática del vector pET01. Imagen modificada a partir del *ExonTrap Handbook* (MoBiTec 2018).

### 1.5. DIGESTIÓN Y LIGADO DE LOS FRAGMENTOS DE INTERÉS CON EL VECTOR DE EXPRESIÓN pET01

Los fragmentos amplificados y el vector pET01 fueron digeridos usando las enzimas de restricción presentes en el sitio de multiclonaje de pET01 *XhoI*, *XbaI* o *BamHI* (*Thermo Fisher Scientific*, MA, EE. UU.). La herramienta NEBCutter (*New England Biolabs*) (disponible online: <https://nc3.neb.com/NEBcutter/>; consultada: 30 octubre 2019) permitió seleccionar dichas enzimas en función de la ausencia de sus dianas de restricción dentro de la secuencia a amplificar. El ADN fue cuantificado mediante el sistema Nanodrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*, MA, EE. UU.). En cada caso, se llevó a cabo la digestión de 1 µg de ADN con 5U de cada una de las enzimas de restricción utilizando el tampón Tango (*Thermo Fisher Scientific*, MA, EE. UU.), que permite el corte simultáneo por ambas enzimas, e incluye BSA como estabilizador de la reacción, en un volumen final de reacción de 60 µl. Las digestiones fueron incubadas durante 3 horas a 37°C en un bloque térmico. Posteriormente, se comprobó la integridad de la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.

A continuación, se procedió a realizar la reacción de ligado de los fragmentos con el pET01 linearizado (MoBiTec, Göttingen, Alemania) usando la enzima T4 DNA ligasa (*Thermo Fisher Scientific*, MA, EE. UU.) en dos proporciones (molécula:molécula) inserto-vector (5:1 y 3:1), obteniendo que la proporción óptima fue 5:1 y se calculó mediante la siguiente ecuación:

**Proporción 5:1**

$$\frac{50 \text{ ng de vector} \times \text{Kb de inserto}}{\text{Kb de vector digerido}} \times \frac{5}{1} = \text{X ng de inserto}$$

Las mezclas de reacción en cada caso fueron las siguientes:

<b>Reactivos</b>	<b>5:1</b>	<b>3:1</b>
<i>T4 ligasa</i>	1 µl	1 µl
<i>Tampón</i>	1 µl	1 µl
<i>Vector digerido</i>	50 ng	50 ng
<i>Inserto digerido</i>	X ng	X ng
<i>Volumen final</i>	10 µl	10 µl

Las reacciones de ligado fueron incubadas a 16 °C durante toda la noche.

Los productos ligados fueron introducidos mediante transformación en células ultracompetentes de *E.coli* preparadas por en nuestro laboratorio.

### **1.6. PREPARACIÓN DE CÉLULAS ULTRACOMPETENTES *E. COLI XL1 BLUE***

Para la transformación fue necesario preparar células ultracompetentes, siguiendo el protocolo descrito por Inoue (1990). Para ello, partimos de un pre-inóculo de *E. coli XL1-Blue* (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]*) crecido en 25 ml de medio SOB (ver composición en **anexo II**) suplementado con tetraciclina (30 µg/ml) durante 6-8 horas a 37°C con agitación fuerte (250-300 rpm). De este cultivo se tomaron 10 ml para inocular 250 ml de medio SOB con tetraciclina (30 µg/ml). A continuación, se incubó el inóculo a 18 °C con agitación suave (175-200 rpm), y se midió la densidad óptica (DO) a 600 nm hasta que alcanza 0.55. Para frenar el crecimiento, se introdujo el cultivo en hielo por al menos 15 minutos y a continuación se centrifugó 10 minutos a 2500g y 4°C. El precipitado resultante se resuspendió en 80 ml de tampón ITB (ver composición en **anexo II**) y se volvió a centrifugar en idénticas condiciones. Esta vez, el precipitado ser resuspendió en 20ml de tampón ITB al que se añade 1.5 ml de dimetil sulfóxido (DMSO). Esta mezcla se mantuvo en hielo durante 10 minutos, se realizaron alícuotas de 250-500 µl que se almacenaron a -80° C hasta su utilización.

La eficiencia de transformación se define como el número de unidades formadoras de colonias (ufc) producidas con 1 µg de ADN plasmídico, y se mide llevando a cabo un ensayo de transformación con las células ultracompetentes, añadiendo una cantidad conocida de ADN y calculando el número de ufc formadas por µg de ADN. Se espera que esta sea, al menos, del orden de  $1 \times 10^8$  a  $3 \times 10^8$  ufc/mg.

Ecuación (ufc/µg):

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{\text{ufc transformantes}}{\text{ADN plasmídico (ug)}}$$

Donde:

$$\text{ufc transformantes} = \frac{\text{Nº de colonias bacterianas} \times \text{factor de dilución} \times \text{volumen de transformación}}{\text{Volumen plaqueado}}$$

### **1.7. TRANSFORMACIÓN EN CÉLULAS ULTRACOMPETENTES**

Se empleó el protocolo de transformación por choque térmico. Tras la descongelación de las células en hielo, se dispensaron 50 µl de células competentes en tubos de 15 ml de polipropileno enfriados previamente. A cada tubo se le añadieron 2-3 µl de la reacción de ligado de los constructos y se mantuvieron en hielo durante 30 minutos. A continuación, se sumergieron en un baño a 42 °C durante 45 segundos y seguidamente se volvieron a introducir en hielo durante 5 minutos. A cada tubo se le añadieron 900 µl de medio SOC (ver composición en **anexo II**) y se incubaron en agitación suave (150 rpm) a 37 °C durante 1 hora. Pasado ese tiempo, se tomaron alícuotas de 100 µl y se sembraron en placas de medio Luria-Bertoni (LB) en agar suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml (ver composición en **anexo II**). Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche.

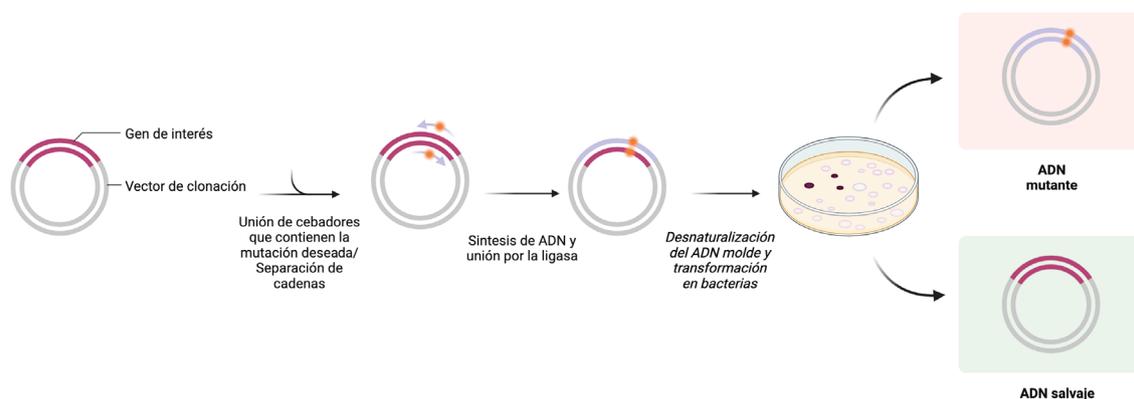
### **1.8. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO Y COMPROBACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES**

La extracción de ADN plasmídico se realizó con el kit *NucleoSpin Plasmid EasyPure* (Macherey-Nagel, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante, y los plásmidos recombinantes se analizaron mediante secuenciación directa realizada por MacroGen España

(Madrid, España), utilizando los cebadores ETprim04 (5'-GGATTCTTCTACACACCC-3') y ETprim05 (5'-TCCACCCAGCTCCAGTTG-3') (MoBITech).

### 1.9. MUTAGÉNESIS DIGERIDA

Las mutaciones seleccionadas para el estudio se introdujeron en los minigenes mediante mutagénesis dirigida utilizando el kit *QuickChange® Lightning* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los productos de reacción se transformaron en células ultracompetentes XL10-Gold. Los cebadores para la mutagénesis se diseñaron utilizando la herramienta bioinformática *QuickChange® Primer Design Program* (disponible online: <https://www.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp>; consultado: 20 octubre 2019) de acuerdo con las pautas descritas en el kit comercial QuickChange® (**Tabla 4**). Para confirmar la presencia de la mutación deseada, todos los constructos se analizaron mediante secuenciación automática directa realizada por Macrogen España (Madrid, España) utilizando los cebadores diseñados para la amplificación de cada fragmento.



**Figura 10.** Representación esquemática del protocolo general de mutagénesis dirigida.

**Tabla 4.** Cebadores utilizados para la mutagénesis dirigida.

<b>Exones</b>	<b>Cebador con sentido (5'-3')</b>	<b>Cebador antisentido (5'-3')</b>
Mutagénesis- c.781G>A (p.G261R)	CTTTGGAGCACCTATAGGT <b>A</b> - GAGTATTATTCAGCCTTG-	TCAAGGCTGAATAATACTC- <b>T</b> ACCTATAGGTGCTCCAAAG
Mutagénesis- c.800A>C (p.E267A)	GTGGAGTATTATTCAGCCTTG- <b>C</b> AGAGGTAACAACCTTTTCATTG	CAATGAAAAGTTGTTACCTCT <b>G</b> - CAAGGCTGAATAATACTCCAC
Mutagénesis- c.1384G>A (p.G462S)	TTATCCCTAGCATGGCTGT- <b>T</b> AGTGCTATAGCAGGT	ACCTGCTATAGCACT <b>T</b> AACAGC- CATGCTAGGGATAA
Mutagénesis- c.1511T>A (p.M504K)	CCCCCGGCCTTTATGCAA <b>A</b> G- GTTGGGGCTG	GCTGCAGCCCTAAC <b>C</b> TTG- CATAAAGGCCG
Mutagénesis- c.1516G>A (p.G506R)	CGGCCTTTATGCAATGGTT <b>A</b> GG- GCTGCAGC	GCTGCAGCC <b>C</b> TAAACCATTG- CATAAAGGCCG
Mutagénesis- c.1517G>A (p.G506E)	CCTTTATGCAATGGTT <b>G</b> AGGCT- GCAGCCTGCTTAG	CTAAGCAGGCTGCAGC <b>C</b> TCAAC- CATTGCATAAAGG
Mutagénesis- c.1534G>C (p.G512R)	GGCTGCAGCCTGCTT <b>A</b> CGT- GAGTAGTGTTC	GCAAACACTACTCAC <b>G</b> TAAG- CAGGCTGCAGCC
Mutagénesis- c.1535G>A (p.G512D)	TGTCTATTTCTTTGCAG <b>A</b> TGGG- GTGACTCGGATG	CATCCGAGTCACCC <b>C</b> ATCTG- CAAAGAAATAGACA
Mutagénesis- c.1639T>C (p.W547R)	GCCATGACAAGCAAG <b>C</b> GGGTG- GCAGATGCT	GAGCATCTGCCAC- CC <b>G</b> CTTGCTTGTTCATGGC

### 1.10. LÍNEAS CELULARES

Las células en cultivo utilizadas para los ensayos de expresión con minigenes fueron dos líneas celulares procedentes de riñón de embrión humano; HEK 293 (ATCC® CRL-1573™), y HEK293T (ATCC CRL-3216™).

### **1.11. MANTENIMIENTO DE CÉLULAS HEK293 Y HEK293T**

Las líneas celulares fueron criopreservadas en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Para su uso, se descongelaron a  $37^{\circ}\text{C}$  e inocularon en 15 ml de medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) con alta concentración de glucosa, DMEM-HG (Sigma-Aldrich) (4mM L-glutamina, 1,5 g/l bicarbonato sódico, 4,5 g/l glucosa) suplementado con suero bovino fetal al 10% y una combinación de antibióticos al 1% (estreptomina/penicilina), previamente equilibrado a  $37^{\circ}\text{C}$ , en atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$ .

Una vez que el cultivo alcanzó una confluencia del 80-90%, las células se subcultivaron cada 48 horas. En cada pase, se eliminó el medio de cultivo, se lavó con 2 ml de tampón PBS (Gibco) (solución salina tamponada con fosfato) y a continuación, se añadió 1 ml de tripsina 1X (Sigma-Aldrich) en tampón PBS y se incubó 1-2 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . A partir de la suspensión celular se realizó una dilución 1/5, añadiendo 4 ml de medio DMEM-HG y 1 ml de la suspensión.

### **1.12. TRANSFECCIÓN DE CULTIVOS CELULARES Y PCR CON TRANSCRIPTASA INVERSA (RT-PCR)**

Para estos experimentos se utilizaron placas de 12 pocillos en las que se inocularon  $0,125 \times 10^5$  células HEK293T por pocillo en 1 ml de medio DMEM-HG (suplementado con 10% suero bovino fetal y 1% estreptomina/penicilina). Una vez alcanzaron una confluencia entre el 80-90%, se transfectaron mediante lipofección utilizando el reactivo JetPRIME (Polyplus Transfection, Illkirch, Francia). La mezcla de transfección fue de 0,8  $\mu\text{g}$  de ADN y 75  $\mu\text{l}$  de JetPrime Buffer. Después de 24h, el ARN fue extraído y purificado utilizando el kit de aislamiento de ARN High Pure (Hoffman-La Roche, Basilea, Suiza) y el kit de ARN NucleoSpin (Macherey-Nagel, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante, y se cuantificó con Nanodrop Lite (*Thermo Fisher Scientific*, MA, EE. UU). La RT-PCR se realizó en dos pasos; un primer paso de síntesis de ADNc, utilizando el kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante, y un segundo paso de amplificación por PCR, con el kit de PCR Kapa Taq (Kapa Biosystems-Hoffman-La Roche) y la polimerasa DreamTaq (*Thermo Fisher Scientific*, MA, EE. UU) utilizando los cebadores ETprim02 (5'-GAGGGATCCGGCTTCCTGGCCC-3') y ETprim03 (5'-CTCCCGGGCCACCTCCAGTGCC-3') (MoBITech). Los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa con el marcador de peso molecular SiZer-100bp DNA Marker (*IntRon Biotechnology DR*, Corea del Sur) y se secuenciaron como se describió anteriormente. El tamaño y la secuencia de cada producto se determinó mediante comparación con la secuencia de referencia *CLCN5* (número de acceso de GenBank NC\_000023.10 y NM\_000084.).

## 2. CREACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS CELULARES QUE EXPRESAN PROTEÍNAS CLC-5 MUTANTES COMO MODELOS DE LA ED1 Y TRATAMIENTO CON CHAPERONAS QUÍMICAS

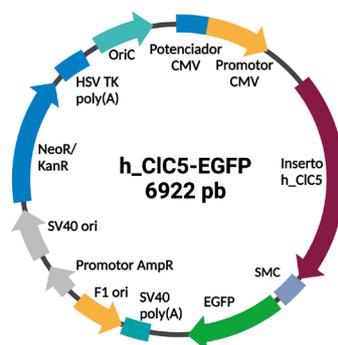
### 2.1. CLONACIÓN DIRECCIONAL DE LA ORF DE CLC-5 EN EL VECTOR pEGFPN1 Y GENERACIÓN DE MUTANTES

La ORF (del inglés “*Open Reading Frame*”; marco abierto de lectura) de la proteína CLC-5 clonada en el vector pcDNA3.1 (sintetizada por GenScript USA Inc.) fue extraída mediante digestión usando las enzimas de restricción *NheI* y *SacII* (New England Biolabs). Posteriormente, para generar una proteína de fusión de la proteína CLC-5 con la proteína verde fluorescente (GFP de sus siglas en inglés, *Green Fluorescent Protein*) se llevó a cabo la clonación direccional de la ORF de CLC-5 en el vector plasmídico de expresión en pEGFPN1, de manera que la GFP queda en C respecto a CLC-5, usando las mismas enzimas de digestión y realizando la ligación como se describió previamente. El vector pEGFPN1 incluye una secuencia que confiere resistencia a los antibióticos de tipo aminoglucósidos como la neomicina/kanamicina, así como secuencias de orígenes de replicación para fagos (f1 ori), *E. coli* (pUC ori) y para células eucariotas (SV40 ori) (Fig. X).

A partir de esta construcción se generaron 4 mutantes de la proteína CLC-5:

- p.(G65R) (*c.193G>A*), localizada en el exón 3 del gen *CLCN5*.
- p.(G462S) (*c.1384G>A*), localizada en el exón 9.
- p.(G466D) (*c.1397G>A*), localizada en el exón 9.
- p.(V523del) (*c.1566\_1568delTGT*), localizada en el exón 10.

Dichas mutaciones fueron introducidas mediante mutagénesis dirigida tal y como se describió previamente. Los cebadores se diseñaron usando la herramienta *QuickChange Primer Design* (<https://www.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp>). Y se clonaron en células ultracompetentes XL1-Blue. Las secuencias fueron verificadas mediante secuenciación (Macrogen, España).

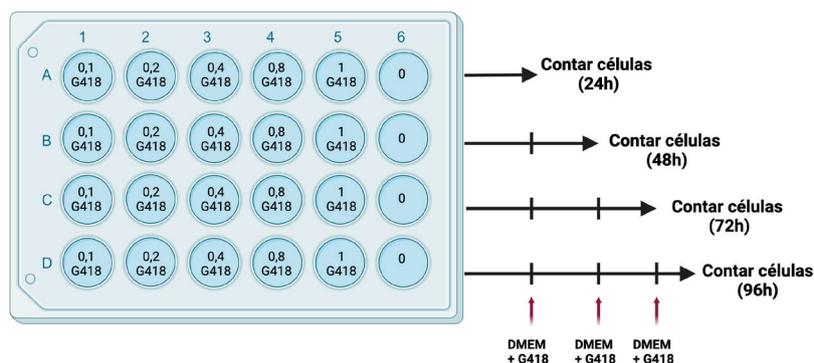


**Figura 11.** Estructura de la construcción plasmídica en el que se incluye la proteína de fusión CLC5-EGFP WT.

## 2.2. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS ÓPTIMA DE GENETICINA (G418) PARA LA SELECCIÓN DE LOS CLONES ESTABLES

La geneticina (G418) es un antibiótico del tipo aminoglucósido, que actúa inhibiendo la síntesis de los polipéptidos mediante el bloqueo del proceso de elongación al unirse a la subunidad 80S del ribosoma, exclusiva de los organismos eucariotas. El plásmido pEGFPN1 utilizado para la construcción en la que se incluye la proteína CIC-5 WT presenta resistencia a los antibióticos de esta clase, por lo que se eligió el G418 para su selección.

Se cultivaron  $0,2 \times 10^5$  células HEK293 /ml por pocillo en medio DMEM-HG a 37°C, en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, y se expusieron a concentraciones crecientes de G418 durante 4 días en placas de 24 pocillos, distribuidas en 5 columnas (4 fueron expuestas a la droga y una se utilizó como control negativo) y 4 filas. Durante 4 días y cada 24 horas se cuantificó el número de células de cada uno de los pocillos de la primera fila, mientras que a el resto de los pocillos solo se les realizó un lavado con medio. Este proceso fue desarrollado a diferentes concentraciones de G418, desde 0,1 a 1 M (0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1M) (Figura 12).



**Figura 12.** Diseño experimental para el estudio dosis-respuesta de células HEK293 ante G418 donde se representan cada una de las concentraciones aplicadas. También se representa la toma de las muestras tras cada día, hasta llegar a las 96 horas.

## 2.3. TRANSFECCIÓN Y SELECCIÓN DE LOS CLONES

Una vez obtenidas las construcciones con la proteína de fusión CIC-5 WT y mutantes, se procedió a la transfección en la línea celular HEK293 mediante lipofección, usando el reactivo *X-tremeGene HP DNA reagent* (Roche) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se sembraron placas de 6 pocillos a  $1 \times 10^6$  células/ml-pocillo en medio DMEM-HG, y tras alcanzar la confluencia entre 80-90%, se procedió a la transfección. La proporción de dilución

de reactivo/ADN usado fue de 4:1 ( $\mu\text{l}$ :  $\mu\text{l}$ ). El diluyente usado fue Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*, MA, EE. UU). Transcurridas 48 horas después de la transfección, se procedió a añadir G418 a 0,8 M (dosis elegida para la selección). Nueve días después, las células se pasaron a placas de 24 pocillos para la selección de clones. Mediante microscopía de fluorescencia se monitorizó la progresión de los clones, estudiando la viabilidad celular para reconocer aquellos que han incorporado el plásmido, seleccionando aquellos con propiedades similares.

Una vez establecidas las líneas celulares que expresan la proteína de fusión WT y mutantes, fueron criopreservadas en nitrógeno líquido a una temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$ , en medio DMEM sin suplementación y con DMSO al 10%. Para su uso posterior, se descongelaron a  $37^{\circ}\text{C}$  e inoculan en 15 ml DMEM-HG suplementado con G418 0,8M.

#### **2.4. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR POR REDUCCIÓN DEL COMPUESTO MTT (BROMURO DE 3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENILTETRAZOLIO) PARA LA DETERMINACIÓN DE LA DOSIS DE CHAPERONAS A ENSAYAR EN CÉLULAS HEK293**

Con el fin de determinar las dosis viables de las diferentes chaperonas químicas a ensayar en la línea celular HEK293, se midieron los niveles de actividad metabólica de las células a través del ensayo colorimétrico con el reactivo MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

Se cultivaron células HEK293 en placas de 96 pocillos a una densidad de  $0,2 \times 10^4$  células/pocillo. Después de alcanzar una confluencia entre 70-80%, se añadieron los fármacos a diferentes concentraciones utilizando DMSO como vehículo, a concentraciones previamente seleccionadas a partir de la bibliografía (Gupta *et al* 2012; Upagupta *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020; Mimori *et al.*, 2019; Ren *et al.*, 2013). Tras 24-48h de tratamiento, se añadió el MTT (12mM) (*Thermo Fisher Scientific*, MA, EE. UU) mezclado en el medio de cultivo y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora y 30 minutos. Para cuantificar la reacción, se disolvió la mezcla de MTT con medio en DMSO (dimetilsulfóxido) (AppliChem PanReac), se incubó durante 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  y se midió absorbancia a una longitud de onda de 570 nm utilizando el espectrofotómetro de microplacas Multiskan™ Sky (*Thermo Fisher Scientific*, MA, EE. UU). Los ensayos se realizaron por triplicado para cada grupo, con un control de vehículo (DMSO) un control de células no tratadas, y un blanco de reacción (pocillos vacíos).

Para determinar el porcentaje de viabilidad de las células, se realizó el siguiente cálculo:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{(\text{Valor medio } A_{570}\text{-blanco})}{(\text{Control-blanco})}$$

## 2.5. TRATAMIENTO CON CHAPERONAS QUÍMICAS

Las chaperonas seleccionadas fueron ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) (Millipore Sigma, Merck, Darmstadt, Alemania) y 4-fenilbutirato de sodio (4-PBA) (*Santa Cruz Biotechnology*, Texas, EEUU). Tras la determinación de las dosis óptimas para el TUDCA (1 mM) y el 4-PBA (2,5 mM) mediante ensayos de viabilidad con MTT, se cultivaron  $1 \times 10^4$  células HEK293/ml, que expresan la proteína de fusión CIC-5 WT o mutantes, en placas de Petri de 35 mm (WPI, Florida, EEUU) en medio DMEM sin rojo fenol (*Gibco, Thermo Fisher Scientific*, MA, EE. UU), hasta alcanzar una confluencia de un 80%. Posteriormente se trataron con 4-PBA o TUDCA durante 24h. Tras ese periodo de incubación, se procedió a la realización de ensayos de citometría de flujo y microscopía confocal.

## 2.6. CITOMETRÍA DE FLUJO

La intensidad de la fluorescencia de la proteína de fusión CIC-5-GFP WT, así como con las mutaciones de clase 1 incluidas, antes y después de los tratamientos fue determinada utilizando el citómetro de flujo CytoFLEX S (Beckman Coulter, EEUU). Para ello las células vivas se cultivaron durante 24h con o sin tratamiento (TUDCA 1mM y 4-PBA 2,5mM), fueron tratadas con tripsina 1X (Sigma-Aldrich) en tampón PBS, se centrifugaron 10 minutos a 1500 rpm y se resuspendieron en PBS fresco para su análisis. La proteína CIC-5-GFP fue excitada con un láser de 488 nm y emisión en el filtro de 525 nm. Se realizó una selección de la muestra en función del tamaño de las células, para diferenciar el grupo de células vivas vs. muertas mediante una gráfica de dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC). La media de la intensidad de la GFP se calculó a partir de 15.000 células vivas por muestra y utilizando un mínimo de 3 muestras. Se realizó una selección adicional para eliminar las células GFP negativas.

## 2.7. MICROSCOPIA CONFOCAL

La expresión de las proteínas de fusión CIC-5 WT y mutantes fue observada utilizando el equipo de microscopía confocal espectral con superresolución LSM980 con AIRYSCAN 2 (Carl Zeiss Iberia, Madrid, España). Las imágenes se adquirieron en secciones medianas x-y en 20 planos focales. Se utilizó un objetivo Plan-Apochromat (Carl Zeiss Iberia) de 63x con una apertura numérica de 1,4 con inmersión en aceite Carl Zeiss™ Immersol™ 23°C (ThermoFischer Scientific). Se utilizó el láser con una onda de excitación 488 nm para la GFP, con un tiempo de exposición de 629 ms. Para el procesamiento de las imágenes se utilizó el software Zen Blue (Zeiss) y el software Fiji (Chindelin *et al.*, 2012).

### 3. TRATAMIENTO DEL RATÓN KI *CLCN5V523DEL* CON ÁCIDO TAUROURSODEOXICÓLICO (TUDCA)

Para este estudio utilizamos el ratón KI *Clcn5Val523del* generado y caracterizado previamente (Perdomo-Ramírez, Tesis Doctoral y manuscrito en preparación). Se seleccionaron dos grupos de ratones macho asignándose como el grupo “Dent” aquellos que portaban la mutación p.(V523del) en el exón 10 del gen *CLCN5*, y como el grupo “WT” aquellos con la secuencia salvaje, determinado mediante secuenciación automática. Los parámetros medidos fueron la  $\beta$ 2-microglobulina, como marcador de PBPM; calcio y fosfato en la orina para determinar la hipercalciuria o hiperfosfaturia, y los volúmenes excretados de orina.

#### 3.1. GENOTIPADO DE LOS RATONES WT Y KI *CLCN5V523DEL*

El genotipo de los ratones se determinó entre las 4 y 6 semanas de edad, a partir de ADN extraído de tejido de la oreja amplificado mediante PCR con cebadores específicos (**Tabla 5**). La extracción y amplificación de ADN se realizó con el kit de genotipado de ratón AccuStart™ II (Quanta Biosciences, Beverly, MA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los amplicones obtenidos se purificaron con NucleoSpin™ Gel and PCR *Clean-up* Kit (Macherey Nagel), y posteriormente se enviaron a Macrogen España para su secuenciación. Las secuencias se compararon utilizando la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con la secuencia de referencia para *Clcn5* (AF134117.1).

**Tabla 5.** Secuencia de cebadores para comprobar la mutación en el exón 10 de *CLCN5* para el genotipado de ratones KI *Clcn5V523del* o WT.

Cebador con sentido	Cebador antisentido
5'-ACTGACTCCCATGCTTTGCT-3'	5'-CATCACATCCATTGCCAGAG-3'

#### 3.2. MANTENIMIENTO DE ANIMALES

Los ratones KI (*Clcn5V523del*) y WT se mantuvieron en el animalario-estabulario del Servicio General de Apoyo a la Investigación (SEGAI) de la Universidad de La Laguna, en jaulas ventiladas individualmente, con cuatro/cinco animales por jaula, bajo condiciones ambientales controladas (temperatura  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ; humedad relativa 60–70 %), libre acceso a comida y agua, y en un ciclo regular de luz/oscuridad de 12/12 h. Este estudio fue aprobado

por el Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal (CEIBA) de la Universidad de La Laguna y la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Aguas del Gobierno de Canarias.

### **3.3. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS**

Los ratones se aclimataron a su entorno durante una semana antes de los experimentos. Antes y después de cada ensayo, se colocaron en jaulas metabólicas con acceso *ad libitum* a dieta y agua normales, donde se tomaron muestras de orina de 24 y 48 horas, se recogieron las medidas de peso corporal y cantidad de alimento y agua ingeridos. Además, se recogieron muestras de sangre por punción en la cola o seno venoso submandibular. Las muestras de orina se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min para eliminar restos, se dividieron en alícuotas y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las muestras de sangre se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 min para la separación del suero. Este se dividió en alícuotas y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

Las muestras se conservaron hasta su análisis con el objeto de medir los parámetros bioquímicos característicos de la ED (calcio, fosfato, creatinina y PBPM).

### **3.4. TRATAMIENTO DEL KI *CLCN5V523* DEL CON TUDCA**

Para llevar a cabo el ensayo, se seleccionaron 4 grupos de individuos de tres meses de edad; ratones WT (vehículo y tratados) y KI (vehículos y tratados). A los ratones seleccionados para la intervención se les administró 250 mg/kg de preparado TUDCA-solución salina intraperitoneal (IP) durante 20 días. Al grupo control de ratones se les administró el mismo volumen de solución salina por vía IP durante el mismo tiempo. La dosis y el tiempo de administración usados en este ensayo se basaron en estudios previos en modelos de ratón con diabetes de tipo 2 (Ozcan *et al.*, 2006).

### **3.5. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS**

Se midieron los siguientes parámetros bioquímicos a partir de muestras orina y sangre:

En orina:

- PBPM ( $\beta$ 2-microglobulina y CC16)
- Fosfato, calcio y creatinina
- N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidasa

En sangre:

- Creatinina sérica

Se cuantificaron los niveles de  $\beta$ 2-microglobulina urinaria como marcador de la PBPM mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (del inglés “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”) utilizando el kit *Mouse Beta-2-Microglobulin* (ab223590) (Abcam, Cambridge, Reino Unido). La CC16 (proteína de la clara 16), otra proteína de BPM, fue cuantificada usando el kit de ELISA *Mouse Clara cell protein* (MBS162262) (MyBiosource, San Diego, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los niveles de creatinina sérica y urinaria se determinaron empleando el kit de ELISA *Mouse Creatinine* (MBS763433) (MyBioSource, San Diego, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los niveles del aclaramiento de creatinina (ACr) se expresaron en ml/min/kg y se calcularon siguiendo la ecuación:

$$ACr \text{ (ml/min/kg)} = \frac{(U \text{ (ml/24h)} \times CrU \text{ (mg/dl)} / CrS \text{ (mg/dl)}) \times 1440}{P \text{ (kg)}}$$

Donde U es el volumen de orina en 24h, CrU se refiere a la concentración de creatinina en orina, CrS a la concentración de creatinina en suero, 1440 resulta de transformar 24 horas en minutos, y P es el peso del animal.

Las concentraciones de fosfato y calcio en la orina se determinaron utilizando los kits colorimétricos *Phosphate Colorimetric* (MAK030) y *Calcium Colorimetric* (MAK022) (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Como marcador de daño renal tubular se cuantificaron los niveles de N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidasa (NAG) utilizando el kit de ELISA *Mouse NAG* (MBS703771) (My BioSource, San Diego, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las reacciones se midieron por espectrofotometría y se cuantificó la absorbancia usando el espectrofotómetro de microplacas Multiskan<sup>TM</sup> Sky (Thermo Fisher Scientific, Inc).

La concentración total de los diferentes parámetros fue calculada multiplicando la concentración obtenida según cada kit por su respectivo volumen de orina obtenido a las 24h.

### **3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos obtenidos de los diferentes experimentos se han analizado empleando estadísticos de resumen: frecuencia relativa de cada categoría, percentiles 50 (5-95) o tertiles, y de escala no normal y media  $\pm$  Desv. Est. (desviación estándar) y de escala no normal según corresponda. La normalidad de los valores medios se estableció según el estadístico Kolmogorov-Smirnov. Las variables de intensidad media de fluorescencia (Bloque 2), así como los niveles de PBPM (Bloque 3) se transformaron logarítmicamente antes del análisis para garantizar la normalidad y reducir la variabilidad. Para determinar las diferencias de media entre los diferentes grupos de estudio, se utilizaron estadísticos paramétricos (T-test) y no paramétricos (Mann-Whitney) para muestras pareadas y no pareadas, de forma general. Específicamente, para el estudio de los datos obtenidos del tratamiento con el TUDCA, se aplicó un modelo mixto de medidas repetidas para estudiar la interacción de todos los factores, así como el efecto individual de cada uno de los factores sobre las variables medidas. Para todos los casos, consideramos como valor significativo el p-valor  $<0,05$ . Los análisis se han realizado mediante el programa SPSS v25.0 (IBM *Statistics*) o por el programa GraphPad Prism 6.0 (Dotmatics, GraphPad Software, San Diego, California, Estados Unidos).







# Resultados



## 1. EFECTO DE LAS PRESUNTAS MUTACIONES DE CAMBIO DE SENTIDO DEL GEN *CLCN5* SOBRE EL PRE-ARNM

### 1.1. ANÁLISIS *IN SILICO* DE LAS MUTACIONES DE CAMBIO DE SENTIDO PRESENTES EN LA BIBLIOGRAFÍA

Con el fin de determinar el posible impacto de mutaciones de cambio de sentido descritas en el gen *CLCN5* (ENST00000307367.2), sobre el procesamiento del pre-ARNm, se seleccionaron 63 mutaciones (**Anexo I**) a partir de la literatura (Mansour-Hendili *et al.*, 2015) y de la base de datos HGMD. Estas se analizaron a nivel computacional o *in silico*, utilizando herramientas informáticas que permiten predecir el efecto de cambios de un único nucleótido tanto en secuencias consenso como en elementos reguladores del proceso de corte y empalme. Los criterios de selección de estas mutaciones fueron: a) que las mutaciones estuvieran localizadas a +70/-70 de los sitios aceptores y donadores exónicos y, b) que al menos 2 de las 3 herramientas bioinformáticas predijeran un efecto sobre el *splicing*.

De las 63 mutaciones, solo 10 cumplieron estos criterios (**Tabla 6**): c.193G>A; p.(-G65R) localizada en el exón 3, c.731C>T; p.(S244L), c.781G>A; p.(G261R) y c.800A>C; p.(E267A), localizadas en exón 7, c.1384G>A; p.(G462S), c.1511T>A; p.(M504K), c.1516G>A; p.(G506R), c.1517G>A; p.(G506E), c.1535G>A; p.(G512D), localizadas en el exón 9, y c.1537G>A; p.(G513R) localizada en el exón 10.

Se añadieron al estudio las mutaciones c.1639T>C; p.(W547R) y c.1641G>T; p.(W547C), ambas localizadas en el exón 10 del gen *CLCN5*, siendo esta última encontrada en un paciente analizado en nuestro centro. Estas mutaciones no cumplen con el criterio de localización establecido (+70/-70 de los sitios aceptores y donadores exónicos), sin embargo, son de interés debido a que en estudios previos de nuestro grupo se observó que una mutación en el mismo codón, p.W547G, incrementa la expresión de una isoforma de la proteína CIC-5 que carece de los exones 10 y 11 (Ramos-Trujillo *et al.*, 2007).

**Tabla 6.** Predicción del efecto de las mutaciones de cambio de sentido de *CLCN5* seleccionadas a partir de la tabla A1(Anexo I) utilizando herramientas bio-informáticas.

Exón	Mutación	Distancia <sup>a</sup>	Clasificación ACMG (VarSome)				Efecto a nivel de proteína					Efecto a nivel de splicing				
			Significado incierto (5 pts)	Probablemente patológico (9 pts)	SIFT (puntuación)	Polyphen2 (puntuación)	MutPred2 (puntuación)	MutPredSplice (puntuación)	SPANR PSI	CADD-splice <sup>b</sup>	Human splicing finder (HSF)	SpliceAI (puntuación) <sup>c</sup>	MutPredSplice (puntuación)	SPANR PSI	CADD-splice <sup>b</sup>	Human splicing finder (HSF)
Ex3	c.193G>A; p.(G65R)	-13	Significado incierto (5 pts)	Probablemente patológico (9 pts)	Nocivo (0.00)	Probablemente dañino (1.00)	Nocivo (0.950)	VAS (0.76)	↓	31	Nuevo sitio aceptor	No efecto (<0.2)				
Ex7	c.731C>T; p.(S244L)	+8	Probablemente patológico (9 pts)	Probablemente patológico (9 pts)	Nocivo (0.00)	Probablemente dañino (0.986)	Nocivo (0.899)	VN (0.34)	↓	26.9	Nuevo sitio aceptor o donador /Nuevo sitio ESS o ESE	0.00				
Ex7	c.781G>A; p.(G261R)	-24	Probablemente patológico (7 pts)	Probablemente patológico (7 pts)	Dañino (0.00)	Probablemente dañino (1.00)	Nocivo (0.958)	VAS (0.93)	↓	33	Nuevo sitio ESS o ESE	Ganancia de un sitio donador (0.55)				
Ex7	c.800A>C; p.(E267A)	-5	Probablemente patológico (8 pts)	Probablemente patológico (8 pts)	Dañino (0.00)	Probablemente dañino (0.987)	Nocivo (0.910)	VN (0.44)	↓	27.9	Nuevo sitio ESS o ESE y rotura de sitio ESS o ESE	No efecto (<0.2)				
Ex9	c.1384G>A; p.(G462S)	+37	Probablemente patológico (9 pts)	Probablemente patológico (9 pts)	Dañino (0.00)	Probablemente dañino (0.999)	Nocivo (0.950)	VAS (0.62)	↓	27.2	Nuevo sitio aceptor o donador	No efecto (<0.2)				
Ex9	c.1511T>A; p.(M504K)	-24	Probablemente patológico (7 pts)	Probablemente patológico (7 pts)	Dañino (0.00)	Probablemente dañino (0.948)	Nocivo (0.951)	VAS (0.7)	↑	26.1	Nuevo sitio aceptor	No efecto (<0.2)				
Ex9	c.1516G>A; p.(G506R)	-19	Probablemente patológico (7 pts)	Probablemente patológico (7 pts)	Dañino (0.01)	Probablemente dañino (1.00)	Nocivo (0.960)	VAS (0.67)	↑	29.9	Nuevo sitio aceptor o donador	No efecto (<0.2)				

Exón	Mutación	Distancia <sup>a</sup>	Clasificación ACMG (VarSome)			Efecto a nivel de proteína				Efecto a nivel de splicing			
			ACMG	SIFT (puntuación)	Polyphen2 (puntuación)	MutPred2 (puntuación)	MutPredSplice (puntuación)	SPANR PSI	CADD-splice <sup>b</sup>	Human splicing finder (HSF)	SpliceAI (puntuación) <sup>c</sup>		
Ex9	c.1517G>A; p.(G506E)	-18	Probablemente patogénico (7 pts)	Dañino (0.00)	Probablemente dañino (0.999)	Nocivo (0.960)	VN (0.24)	↑	27.6	Activación de nuevo aceptor	0,00		
Ex9	c.1534G>C; p.(G512R)	-2	Patogénico (10 pts)	Dañino (0.01)	Probablemente dañino (1.00)	Nocivo (0.928)	VAS (0.8)	↑	33	Rotura de sitio donador	No efecto (<0.2)		
Ex10	c.1535G>A; p.(G512D)	+1	Patogénico (13 pts)	Dañino (0.02)	Probablemente dañino (0.999)	Nocivo (0.931)	VAS (0.81)	↑	32	No efecto	No efecto (<0.2)		
Ex10	c.1537G>A; p.(G513R)	+3	Patogénico (14 pts)	Dañino (0.02)	Probablemente dañino (0.714)	Nocivo (0.911)	VAS (0.92)	--	29.5	Nuevo sitio aceptor	Ganancia de un sitio aceptor (0.22)		
Ex10	c.1639T>C; p.(W547R)	+105	Patogénico (11 pts)	Dañino (0.00)	Probablemente dañino (0.998)	Nocivo (0.932)	--	--	27.6	No efecto	0.00		
Ex10	c.1641G>T; p.(W547C)	+107	Patogénico (11 pts)	Dañino (0.00)	Probablemente dañino (1.00)	Nocivo (0.942)	--	↑	29.2	Nuevo sitio donador	No efecto (<0.2)		

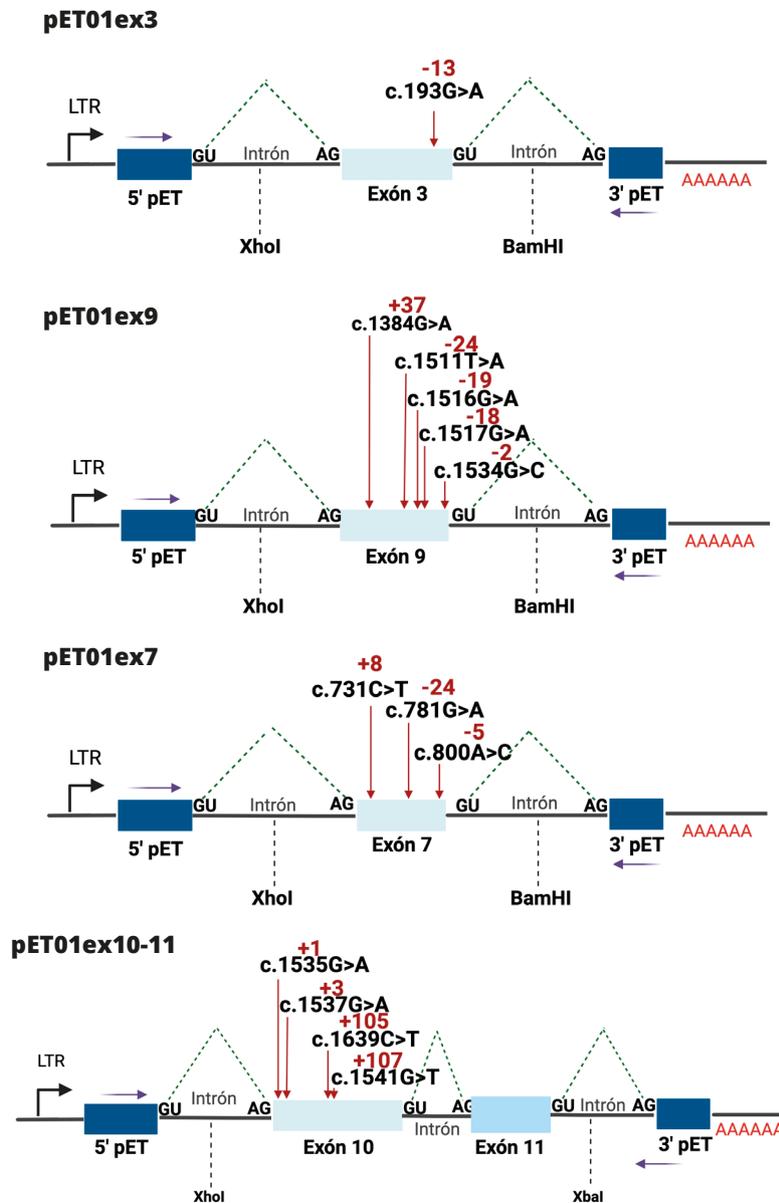
**ESE**: sitio silenciador del *splicing* exónico; **ESE**: sitio potenciador del *splicing* exónico; **VAS**: variante que afecta a sitios de *splicing*; **VN**: variante neutral. (--) No determinado. PSI, porcentaje de transcritos en los que el exón fue procesado. ↑, aumento de los transcritos WT. ↓, disminución del transcrito WT.

<sup>a</sup> Posición en relación con los sitios de *splicing* aceptores (+) o donadores (-).

<sup>b</sup> Puntuación del *CADD-splice*. Si el valor es superior a 20 indica que la variante es dañina.

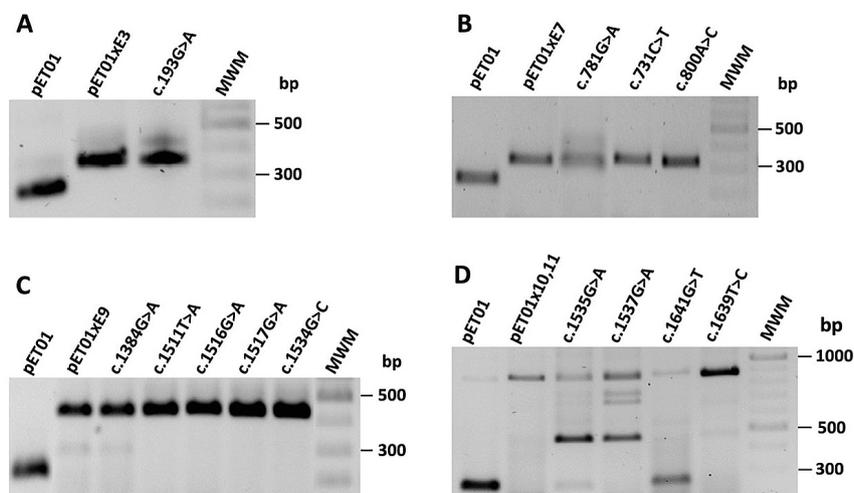
<sup>c</sup> Puntuación del *SpliceAI*. Los valores varían en un rango entre 0-1 y representan la probabilidad que la variante tenga un efecto sobre el *splicing*. Valores <0,2; indican probabilidad baja. Valores <0,5; probabilidad media. Valores <0,8; indican alta precisión.

Construimos 4 minigenes portando el exón 3 (pET01ex3), de 340 pb, el exón 7 (pET01ex7) de 321 pb, el exón 9 (pET01ex9) de 427 pb, y los exones 10 y 11 (pET01ex10,11) de 856 pb, de forma independiente. Las mutaciones de interés se introdujeron en el correspondiente exón (**Figura 13**).



**Figura 13.** Representación esquemática de los minigenes construidos en el vector de expresión pET01. Los exones de *CLCN5* están flanqueados por los exones 5' y 3' de pET01, seguidos de un sitio de poliadenilación (cola poli A). Las líneas rojas indican la ubicación de las mutaciones. Se indica el tamaño de los exones de *CLCN5* y pET01. Los números en rojo indican la posición de las mutaciones con respecto a los sitios aceptores (+) o donadores (-). GU/AG indican los nucleótidos canónicos de los sitios de *splicing*. También se muestran los sitios de restricción para XhoI, BamHI y XbaI. LTR, promotor de repetición larga terminal ("long terminal repeat") del virus del sarcoma de Rous.

Encontramos que todas las construcciones con las secuencias WT produjeron transcritos que contenían su correspondiente exón y solo 3 de las construcciones portadoras de mutaciones dieron lugar a alteraciones del procesamiento del pre-ARNm (c.1535G>A, c.1537G>A y c.1641G>T). El resto de las construcciones portadoras de mutaciones produjo transcritos que contenían su correspondiente exón procesado de manera correcta.



**Figura 14.** Electroforesis en geles de agarosa mostrando los resultados del análisis de RT-PCR de transcritos expresados a partir de minigenes de *CLN5* que contienen los exones WT y mutantes. **A)** Construcciones con el exón 3 de *CLN5*. **B)** Construcciones con el exón 7. **C)** Construcciones con el exón 9. **D)** Construcciones con los exones 10 y 11. Las mutaciones en el exón 10 c.1535G>A, c.1537G>A y c.1641G>T generaron productos de ARNm del mismo tamaño que el WT junto a productos de tamaño alterado.

## 1.2. MUTACIONES PRESENTES EN EL MINIGÉN CON LOS EXONES 10 Y 11 QUE MODIFICAN LA EXPRESIÓN DEL PRE-ARNM

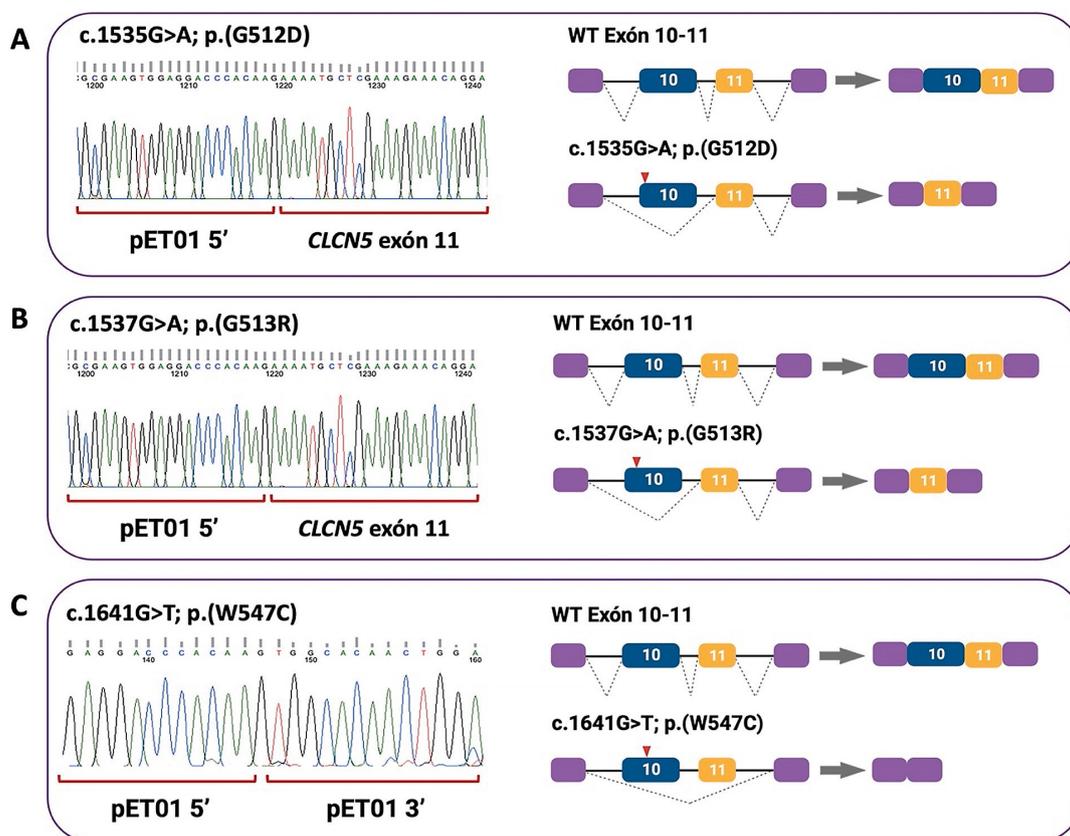
La mutación c.1535G>A; p.(G512D) (**Tabla 6 y Figura 13**), localizada en la posición +1 con respecto al sitio 5' del exón 10 (tgcag**AT**GGGG; el nucleótido afectado por las variantes aparece en negrita y el motivo AG correspondiente al sitio de *splicing* del aceptor en el intrón 9 está subrayado). Las secuencias intrónicas y exónicas están en minúsculas y mayúsculas, respectivamente, a lo largo del texto). Las herramientas informáticas *MutPredSplice* y *CADD-splice*, predicen que esta mutación altera los sitios de *splicing* (**Tabla 6**). Sin embargo, el análisis con *NNsplice* mostró que la puntuación del sitio aceptor de *splicing* apenas varía a consecuencia de la mutación (0.99 a 0.98) y *SpliceAI* no predice cambios en los sitios de *splicing* (**Tabla 6**). Para estudiar el efecto de esta variante creamos un minigén que contiene los exones 10 y 11, así como sus secuencias intrónicas flanqueantes (pET01ex10-11) (**Figura 13**). Los minigenes WT y mutantes fueron transfectados en células HEK293T de forma independiente y se analizaron mediante RT-PCR. Los resultados de la electroforesis revelaron un patrón de bandas diferentes para el minigén WT y mutante (**Fi-**

**gura 14**). La construcción WT generó el producto de *splicing* esperado con un tamaño de 850 pb, consistente con el transcrito WT; así como una banda de aproximadamente 450 pb (**Figura 14**). Mediante secuenciación automática directa se confirmó que esta banda de pequeño tamaño se corresponde con la exclusión del exón 10 del transcrito (**Figura 15**). La herramienta de análisis de secuencias de HSF (**Tabla 7**) mostró que la mutación c.1535G>A genera 3 elementos exónicos silenciadores del *splicing* (ESS) superpuestos, no presentes en la secuencia WT: un motivo Sironi1 (gcagATGG) (Sironi *et al.*, 2004), dos motivos Sironi2 (agATGGG y gATGGGG) y un sitio de reconocimiento para las hnRNPA1 (gATGGG) (**Figura 16 y Tabla 7**). La herramienta *FAS-hex3 ESS* (Wang *et al.*, 2004) mostró la presencia de dos motivos hexámeros *ESS* causados por la mutación, ausentes en la secuencia WT: gATGGG y ATGGGG, que coinciden con el motivo *ESS* hnRNPA1, y con uno de los motivos Sironi2, respectivamente. Estos motivos *ESS* creados por la mutación, localizados al inicio del exón 10, podrían estar disminuyendo la incorporación del exón 10 al ARN mensajero maduro en nuestro sistema de minigenes.

La mutación **c.1537G>A; p.(G513R)** fue identificada en un paciente analizado en nuestro centro (**Tabla 6**) y se localiza en la posición +3 con respecto al sitio 5' aceptor de *splicing* del exón 10 (tgcagGTAGGG). Las herramientas *MutPredSplice*, *CADD-splice* y *SpliceAI* sugieren que la variante puede alterar el *splicing* del pre-ARNm de *CLCN5* (**Tabla 6**). El análisis de la puntuación de los sitios aceptores con el *NNsplice* indica que la mutación no genera cambios en estos sitios (0.99). Para investigar las consecuencias de la variante c.1537G>A en el procesamiento del pre-ARNm, usamos minigenes que incluían a los exones 10 y 11 (pET01ex10-11) (**Figura 13**). Los minigenes WT y mutantes fueron transfectados en células HEK293T de forma independiente y se analizaron mediante RT-PCR. La secuenciación directa mostró que, el minigén mutante (c.1537G>A; p.(G513R)) generó un producto de 450 pb que se correspondería con la exclusión del exón 10, así como una banda de aproximadamente 850 pb que se corresponde con los exones 10 y 11 correctamente procesados (**Figura 14 y 15**). Dos bandas adicionales de aproximadamente 700 y 750 pb fueron observadas (**Figura 14**), pero no fue posible su separación para el análisis por secuenciación automática. La herramienta de análisis de secuencias de HSF, mostró la presencia en la secuencia mutante de diferentes motivos *ESS* superpuestos, incluyendo un motivos Sironi2 (GTAGGGT) y un sitio de reconocimiento para las hnRNPA1 (TAGGGT) (**Figura 16 y Tabla 7**). Adicionalmente, esta región contiene 3 hexámeros *FAS-hex3* superpuestos (GGTAGG, TAGGGT and AGGGTG), no presentes en la secuencia WT (**Tabla 7**). La presencia de estos motivos *ESS* al inicio del exón 10 a causa de la mutación podría dar lugar a que la maquinaria de corte y empalme no reconociera el sitio aceptor canónico del exón 10 resultando en su exclusión.

La variante c.1641G>T; p.(W547C) (**Tabla 6**), también identificada en un paciente analizado en nuestro centro, está localizada en la posición +107 con respecto al sitio 5' aceptor de *splicing* del exón 10 (AAGTGTGTGG). El análisis de la secuencia mutante con el *CADD-splice* sugiere

que existe un efecto sobre el procesamiento del pre-ARNm, sin embargo, el *SpliceAI* no predice cambios en los sitios de *splicing* (Tabla 6). El *NNsplice* no indica ningún cambio en la puntuación del sitio aceptor de *splicing* causado por la mutación (0.99). La herramienta HSF identificó la presencia de 3 motivos Sironi2 (AGTGTGT, TGTGTGG and TGTGGCA) (Figura 16 y Tabla 7). Superponiéndose a estos motivos encontramos un hexámero *ESS FAS-hex3* (GTGTGG) (Figura 16). El análisis de la RT-PCR del minigén mutante (c.1641G>T; p.(W547C) y la secuenciación automática directa revelaron una banda correspondiente al transcrito WT y otra de pequeño tamaño de 240 pb, correspondiéndose a la unión de los dos exones presentes en el vector pET01 (Figura 14 y 15). En este sentido, la mutación c.1641G>T; p.(W547C) estaría causando la exclusión de los exones 10 y 11 en nuestro minigén (Figura 15) probablemente por unión de represores del *splicing* que reconocen a los motivos *ESS*. Curiosamente, el análisis de HSF de la variante c.1639T>C; p.(W547R), localizada en la posición +105 del sitio aceptor y a solo dos nucleótidos de distancia de la variante c.1641G>T; p.(W547C), no predice la generación de sitios *ESS* y no mostró una síntesis aberrante del pre-ARNm en nuestro sistema de minigenes (Tabla 7).



**Figura 15.** Resultados de la secuenciación de los productos alterados obtenidos de la RT-PCR de la construcción con los exones 10-11 del gen *CLCN5*, y representación esquemática de los mismos. **A)** Mutación c.1535G>A; p.(G512D). **B)** Mutación c.1537G>A; p.(G513R). **C)** Mutación c.1541G>T; p.(W547C).

**Tabla 7.** Sitios *ESS* en el exón 10 de *CLCN5* causados por las mutaciones c.1535G>A, c.1537G>A, c.1639T>G, c.1639T>C y c.1641G>T, según la herramienta bioinformática HSF.

Posición	ESS	Secuencia WT	Secuencia mt c.1535G>A	WT VC	VC	ΔVC
1	Motivo Sironi1	--	GCAGaTGG	NP	62,20	Novo
1	Motivo Sironi2	--	AGaTGGG	NP	82,65	Novo
1	ESS hnRNPA1	--	GaTGGG	NP	66,79	Novo
1	Motivo Sironi2	--	GaTGGGG	NP	80,51	Novo

Posición	ESS	Secuencia WT	Secuencia mt c.1537G>A	WT VC	VC	ΔVC
1	Motivo Sironi2	--	GaGGGT	NP	64,4	Novo
2	Motivo Sironi2	TGGGGTG	--	71,04	NP	Ninguno
2	ESS hnRNPA1	--	TaGGGT	NP	99,41	Novo

Posición	ESS	Secuencia WT	Secuencia mt 1639T>G	WT VC	VC	ΔVC
100	Motivo Sironi2	--	GCAAGgG	NP	62,31	Novo
101	ESS hnRNPA1	--	CAAGgG	NP	65,13	Novo
101	Motivo Sironi2	--	CAAGgGG	NP	70,66	Novo
101	Motivo Sironi1	CAAGTGGG	CAAGgGGG	75,17	75,17	0
102	ESS hnRNPA1	AAGTGG	AAGgGG	67,03	82,27	-15,24
102	Motivo Sironi2	--	AAGgGGG	NP	64,21	Novo
102	Motivo Sironi1	--	AAGgGGGT	NP	61,16	Novo
103	Motivo Sironi2	AGTGGGT	AGgGGGT	81,60	69,06	12,54
104	Motivo Sironi2	--	GgGGGTG	NP	67,96	Novo
105	Motivo Sironi2	TGGGTGG	gGGGTGG	71,04	67,96	3,08

Posición	ESS	Secuencia WT	Secuencia mt c.1641G>T	WT VC	VC	ΔVC
101	Motivo Sironi1	CAAGTGGG	CAAGTgG	75,17	61,64	13,54
102	ESS hnRNPA1	AAGTGG	--	67,03	NP	--
103	Motivo Sironi2	AGTGGGT	AGTgGT	81,60	64,69	-1,87
105	Motivo Sironi2	TGGGTGG	TGtGTGG	71,04	83,58	-16,19
106	Motivo Sironi2	GGGTGGC	--	66,88	NP	--
107	Motivo Sironi2	GGTGGCA	tGTGGCA	69,67	72,75	-12,54

Posición	ESS	Secuencia WT	Secuencia mt 1639T>C	WT VC	VC	ΔVC
101	Motivo Sironi1	CAAGTGGG	CAAGcGGG	75,17	75,17	0
102	ESS hnRNPA1	AAGTGG	AAGcGG	67,03	67,03	0
103	Motivo Sironi2	AGTGGGT	AGcGGGT	81,60	69,06	12,54
105	Motivo Sironi2	TGGGTGG	cGGGTGG	71,04	61,17	9,87
101	Motivo Sironi2	CAAGTGGG	CAAGcGGG	75,17	75,17	0
102	ESS hnRNPA1	AAGTGG	AAGcGG	67,03	67,03	0

WT, secuencia salvaje; mt, secuencia con la mutación; los nucleótidos afectados por la mutación se muestran en letras minúsculas; -, sin cambios; VC, valores consenso de *Human Splicing Finder* (cuanto mayor sea la puntuación, mayor será la confianza de que los factores trans correspondientes reconozcan el sitio); ΔVC, WT VC- VC mutante (si las diferencias son negativas, la confianza de que se forme el ESS a consecuencia de la mutación es mayor); NP, VC no presentes; Ninguno, no hay diferencias VC; *Novo*, motivos ESS que solo se observan en secuencia mutante.

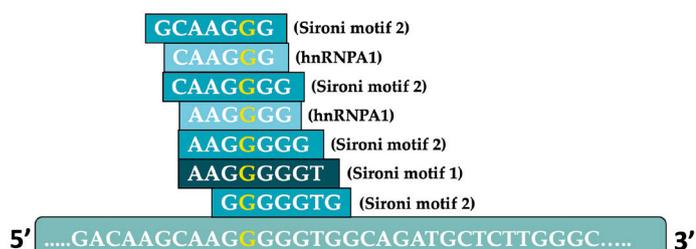
#### c.1535G>A

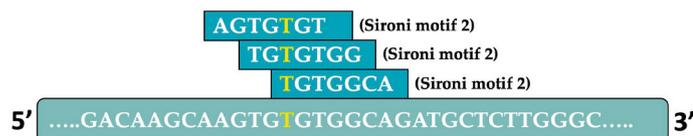


#### c.1537G>A



#### c.1639T>G (Ramos-Trujillo et al., 2007)



**c.1641G>T**

**Figura 16.** Representación esquemática de los ESS generados por las mutaciones en el exón 10 de *CLCN5* c.1535G>A, c.1537G>A, c.1639T>G, y c.1641G>T, según la herramienta bioinformática HSF. Las secuencias intrónicas están en minúsculas y las secuencias exónicas en mayúsculas; Los ESS mostrados son secuencias *de novo* o con  $\Delta CV$  negativo.

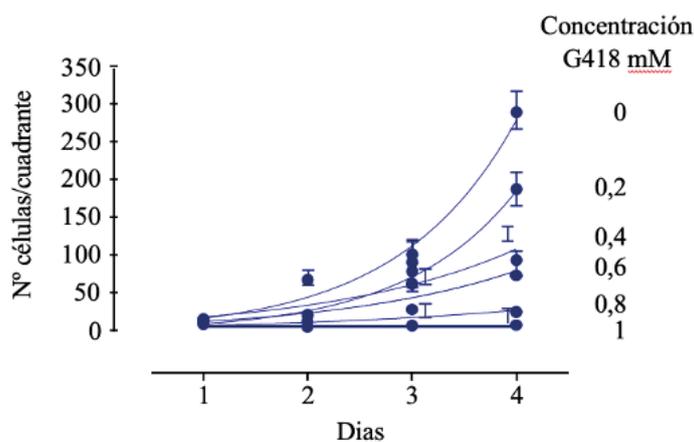
### 1.3. MUTACIONES QUE NO DIERON LUGAR A ALTERACIONES DEL PRE-ARNM EN NUESTRO SISTEMA DE MINIGENES.

También, estudiamos una variante en el exón 3, c.193G>A; p.(G65R), ubicada en la posición -13 con respecto al sitio donador del intrón 3; tres variantes en el exón 7, c.731C>T; p.(S244L), ubicada en la posición +8 con respecto al sitio aceptor del intrón 6, c.781G>A; p.(G261R), ubicado en la posición -24 con respecto al sitio de *splicing* donador del intrón 7 y c.800A>C; p.(E267A), ubicada en la posición -5 con respecto al sitio donador del intrón 7; y cinco variantes en el exón 9, c.1384G>A; p.(G462S), ubicada en la posición +37 con respecto al sitio de *splicing* aceptor del intrón 8, c.1511T>A; p.(M504K), ubicada en la posición -24 con respecto al sitio de *splicing* donador del intrón 9, c.1516G>A; p.(G506R), ubicada en la posición -19 con respecto al sitio de *splicing* donador del intrón 9, c.1517G>A; p.(G506E), ubicada en la posición -18 con respecto al sitio de *splicing* donador del intrón 9, y c.1534G>C; p.(G512R), ubicada en la posición -1 con respecto al sitio de *splicing* donador del intrón 9 (**Figura 13**). El análisis bioinformático de estas variantes sugirió posibles alteraciones en el procesamiento del pre-ARNm (**Tabla 6**). La variante c.193G>A; p.(G65R) generó un nuevo sitio aceptor en el exón 3 según HSF (**Tabla 6**), pero *SpliceAI* no predijo cambios en los sitios de empalme (**Tabla 6**). Para las tres variantes localizadas en el exón 7 se predijo la generación de sitios *ESS* y la pérdida de sitios *ESE* según HSF, una reducción en el número de transcritos según *SPANR* y una ganancia de un sitio donador para la variante c.781G>A; (p.G261R) según *SpliceAI* (**Tabla 6**). Según *MutPredSplice* y *CADD-splice*, las variantes del exón 9 c.1384G>A; p.(G462S), c.1511T>A; p.(M504K), c.1516G>A; p.(G506R) y c.1534G>C; p.(G512R) causan la interrupción del *splicing* del pre-ARNm (**Tablas 6**). Para las variantes c.1517G>A; p.(G506E), c.1384G>A; p.(G462S) y c.1511T>A; p.(M504K), el HSF predijo que podrían generar sitios *ESS* (**Tabla 6**). Según *SpliceAI*, ninguna de estas variantes altera los sitios de *splicing* (**Tabla 6**). El estudio funcional de todas estas mutaciones en nuestro sistema de minigenes no confirmó ninguna de estas predicciones (**Figura 14**).

## 2. CREACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS CELULARES QUE EXPRESAN PROTEÍNAS CLC-5 MUTANTES COMO MODELOS DE LA ED1 Y TRATAMIENTO CON CHAPERONAS QUÍMICAS

### 2.1. DETERMINACIÓN DE DOSIS Y TIEMPO ÓPTIMOS DE EXPOSICIÓN DE LAS CÉLULAS HEK293 A LA GENETICINA (G418).

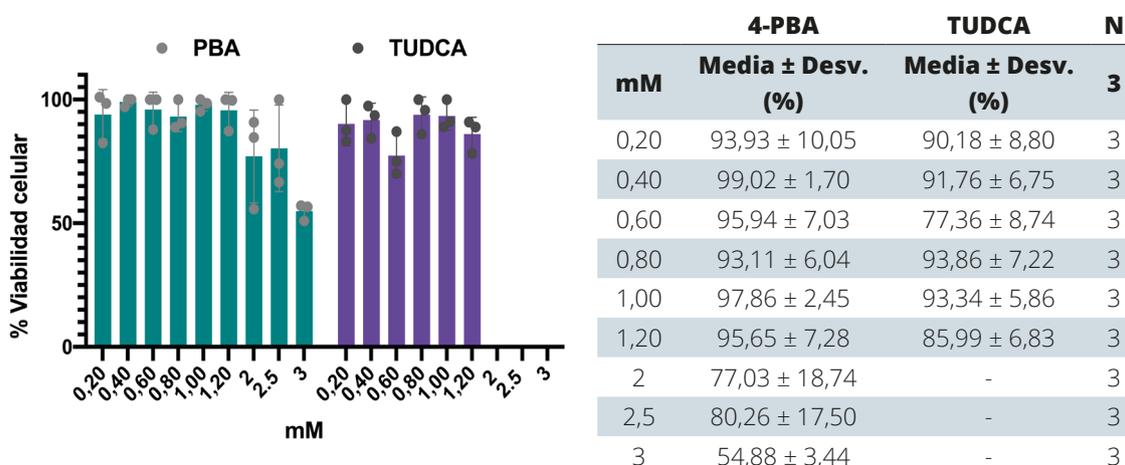
El primer paso crítico para la generación de líneas celulares estables es determinar la concentración óptima de antibióticos para seleccionar colonias celulares estables; la concentración óptima depende del tipo de célula. Una curva de selección es un experimento de dosis-respuesta en el que las células se someten a cantidades crecientes de antibiótico para determinar la concentración mínima de antibiótico necesaria para matar todas las células en el transcurso de una semana. El efecto de la exposición de las células HEK293 ante G418 se evaluó en base a dos aspectos: la concentración de G418 y el tiempo de exposición. Observamos que, sin fármaco, las células crecían exponencialmente, mientras que al aumentar la concentración de G418 en este patrón se reducía. Por tanto, a 0,8 M las células aún podrían crecer a un ritmo deseable mientras se conserva la presión selectiva sobre el plásmido insertado (**Figura 17**). En este sentido, generamos una referencia para el reconocimiento posterior de aquellas células que habían incorporado el plásmido. Se expusieron las células transfectadas a la concentración de G418 elegida y se observó una velocidad de crecimiento más rápida, lo que indica que el plásmido se integró con éxito.



**Figura 17.** Curva dosis-respuesta de tratamiento con G418 en las células HEK293.

## 2.2. DETERMINACIÓN DE LAS DOSIS DE 4-PBA Y TUDCA MEDIANTE ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

Para determinar las dosis óptimas de ensayo de las chaperonas químicas 4-PBA y TUDCA en el ensayo de viabilidad celular, se midieron los niveles de la actividad metabólica de las células HEK293 mediante el ensayo con el compuesto MTT, con el fin de establecer dosis que no disminuyeran significativamente el crecimiento celular. En la **figura 18** se recogen las dosis ensayadas, así como los valores medios del porcentaje de viabilidad obtenidos después de 24 horas de exposición a la acción de las chaperonas.



**Figura 18.** Porcentaje de viabilidad obtenido de las células HEK293 tratadas con diferentes dosis de 4-PBA y TUDCA.

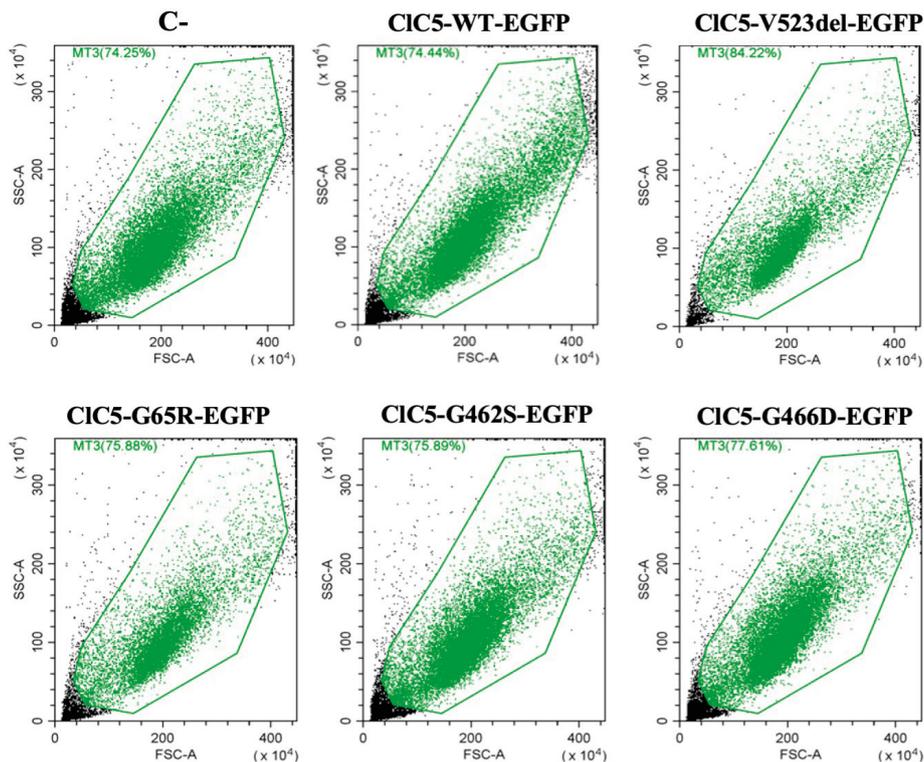
Respecto a las dosis estudiadas en el ensayo preliminar con 4-PBA, observamos que la concentración de 3 mM disminuye la viabilidad celular en un 50% (**Figura 18**), mientras que para las concentraciones inferiores la viabilidad se reduce entre un 5 y un 20% (**Figura 18**). En este sentido, consideramos que la dosis de 2,5 mM puede ser buena candidata para el ensayo en mutaciones de clase 1, con el fin de reducir el mal plegamiento y restaurar, al menos parcialmente el funcionamiento de ClC-5, ya que es la dosis más alta que no genera una reducción significativa de la viabilidad celular.

En el ensayo con TUDCA se observó una reducción del 25% de la población celular a una concentración de 0,6 mM (**Figura 18**), siendo superior dicha reducción en comparación con dosis superiores, donde la viabilidad celular vuelve a aumentar. En este caso, también seleccionamos la dosis más alta con menor efecto sobre la reducción de la población celular, correspondiente a 1 mM (**Figura 18**).

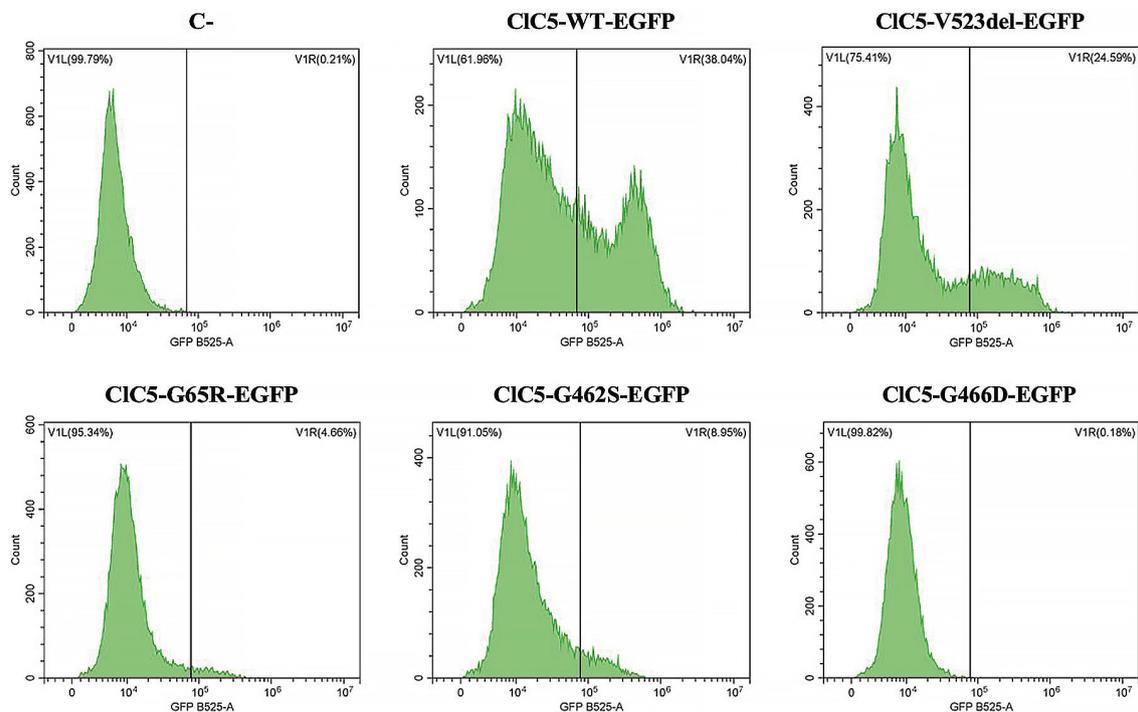
### 2.3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE FLUORESCENCIA DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN CIC-5-EGFP SALVAJE Y MUTANTES EN EL GRUPO CONTROL Y EN LOS GRUPOS TRATADOS CON TUDCA Y 4-PBA

Se cuantificaron los niveles de fluorescencia de las proteínas de fusión CIC-5-EGFP y mutantes, mediante excitación con un láser de 488 nm y con emisión en el filtro de 525 nm.

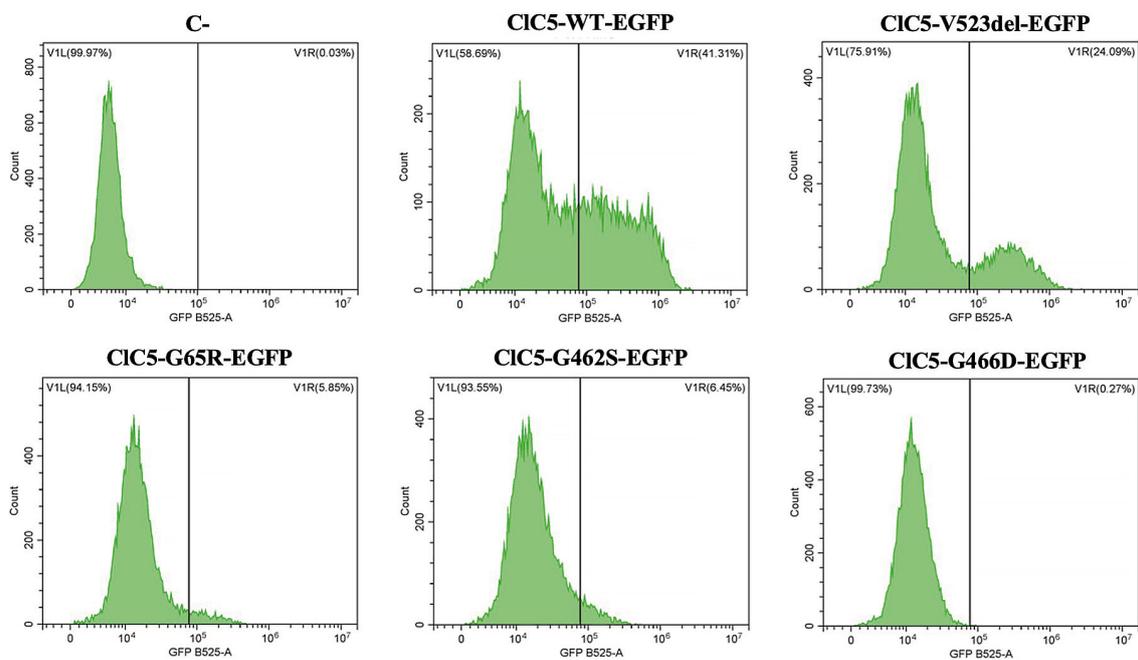
En primer lugar, se realizó una selección de la muestra en función del tamaño celular, para diferenciar células vivas respecto a células muertas, a partir de una gráfica de dispersión frontal (FSC, de inglés “*Forward Scatter*”) y lateral (SSC, de inglés “*Side Scatter*”) (**Figura 19**). Se observa que todas las muestras fueron seleccionadas de la misma manera, de forma que la cuantificación es igual en todas ellas, aunque se aprecia la variación del número de células vivas presentes en cada muestra (**Figura 19**). Seguidamente, se cuantificó la intensidad de la EGFP frente al número de células vivas seleccionadas (**Figura 20, 21 y 22**). A partir de esta selección se determinó la media de la intensidad de la GFP, estableciendo el valor fijo de 15.000 células vivas por muestra. Así mismo, el número de células HEK293 transfectadas fue calculado eliminando el número de células HEK293 no transfectadas (control negativo).



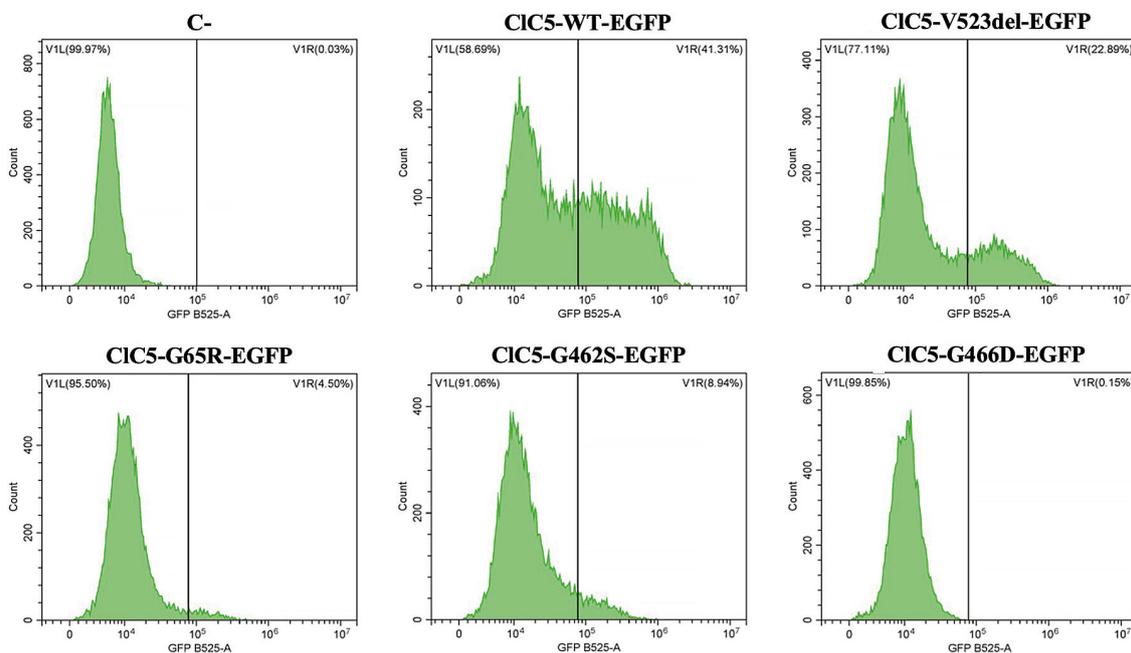
**Figura 19.** Gráfico de dispersión de puntos en que se representa SSC vs. FSC. Se aprecia la selección de diferentes muestras de célula viva en el canal del láser 488 nm.



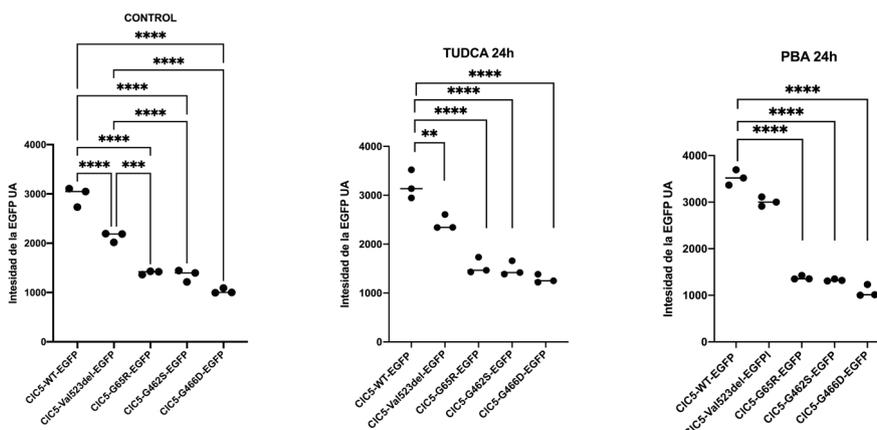
**Figura 20.** Histogramas en los que se compara el número de células vivas frente a la intensidad generada por la proteína de fusión CIC5-EGFP y las proteínas de fusión mutantes, sin tratamiento aplicado.



**Figura 21.** Histograma en el que se compara el número de células vivas frente a la intensidad de la fluorescencia generada por la proteína de fusión CIC5-EGFP y las proteínas de fusión mutantes después de aplicar el tratamiento con 4-PBA.



**Figura 22.** Histograma en el que se compara el número de células vivas frente a la intensidad de la fluorescencia generada por la proteína de fusión CIC5-EGFP y las proteínas de fusión mutantes después de aplicar el tratamiento con TUDCA.



	<b>Control</b>	<b>TUDCA</b>	<b>4-PBA</b>	<b>N</b>
	<b>Media ± Desv.</b>	<b>Media ± Desv.</b>	<b>Media ± Desv.</b>	
	<b>AU</b>	<b>AU</b>	<b>AU</b>	
CIC-5-WT	2963 ± 201,0	3200 ± 293,0	3528 ± 165,5	3
CIC-5-V523del	2133 ± 100,0	2430 ± 152,5	3009 ± 98,98	3
CIC-5-G65R	1406 ± 36,64	1543 ± 166,3	1376 ± 42,75	3
CIC-5-G462S	1352 ± 121,3	1489 ± 148,8	1326 ± 21,95	3
CIC-5-G466D	1029 ± 53,94	1285 ± 87,03	1081 ± 130,2	3

**Figura 23.** Cuantificación de niveles de expresión de la proteína de fusión CIC-5-EGFP y mutantes, tanto en la población de células vivas en el grupo control (sin tratamiento). UA, unidades arbitrarias. Las diferencias fueron estimadas mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una-vía. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.

En el ensayo control (sin tratamiento) se observó que las células que expresan la proteína de fusión CIC5-EGFP muestran niveles significativamente de la intensidad de fluorescencia elevados ( $p < 0,0001$ ) en comparación con las células que expresan la proteína mutada (**Figura 23**). Por otro lado, los valores de intensidad de fluorescencia son significativamente mayores en las células que expresan la proteína de fusión CIC5-V523del-EGFP ( $p < 0,0001$ ) en comparación con las células que expresan las proteínas de fusión con las mutaciones p.(G65R), p.(G462S) y p.(G466D) (**Figura 23**).

En el ensayo de tratamiento con TUDCA (1 mM), se observó un aumento significativo de la intensidad de la fluorescencia en las células que expresan CIC5-V523del-EGFP al compararlo con la expresión del mutante sin tratar ( $p < 0,05$ ) (**Figura 23**). Sin embargo, se siguen observando diferencias significativas con respecto al CIC5-EGFP WT ( $p < 0,01$ ). Para el resto de mutantes parece haber un incremento de los valores medios de expresión de las proteínas de fusión, pero los datos no son significativos (**Figura 23**). Respecto al tratamiento con 4-PBA (2,5 mM) también observamos un incremento de los valores de intensidad de fluorescencia para las células que expresan CIC-5-V523del-EGFP que, además, son significativamente más elevados ( $p < 0,001$ ) en comparación con el tratamiento con TUDCA, y no se aprecian diferencias significativas en relación con la proteína de fusión CIC5-WT-EGFP (**Figura 23**). No observamos un aumento de la expresión de las proteínas de fusión con mutaciones en los residuos de glicina respecto al tratamiento con el 4-PBA (**Figura 23**).

#### ***2.4. DETERMINACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y AGREGACIÓN DE LAS PROTEÍNAS WT Y MUTANTES CLC-5-EGFP EN LA LÍNEA CELULAR HEK293 Y CUANTIFICACIÓN, EN EL GRUPO CONTROL Y EN LOS GRUPOS TRATADOS CON TUDCA Y 4-PBA.***

Se comprobó la selección del plásmido pEGFPN1 WT y con las mutaciones p.(V523del), p.(G65R), p.(G462S) y p.(G466D) y, se determinó la distribución subcelular de la proteína CIC-5 y se cuantificaron los niveles de intensidad fluorescencia por microscopia confocal.

##### ***2.4.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES PREVIA A LOS TRATAMIENTOS CON CHAPERONAS QUÍMICAS.***

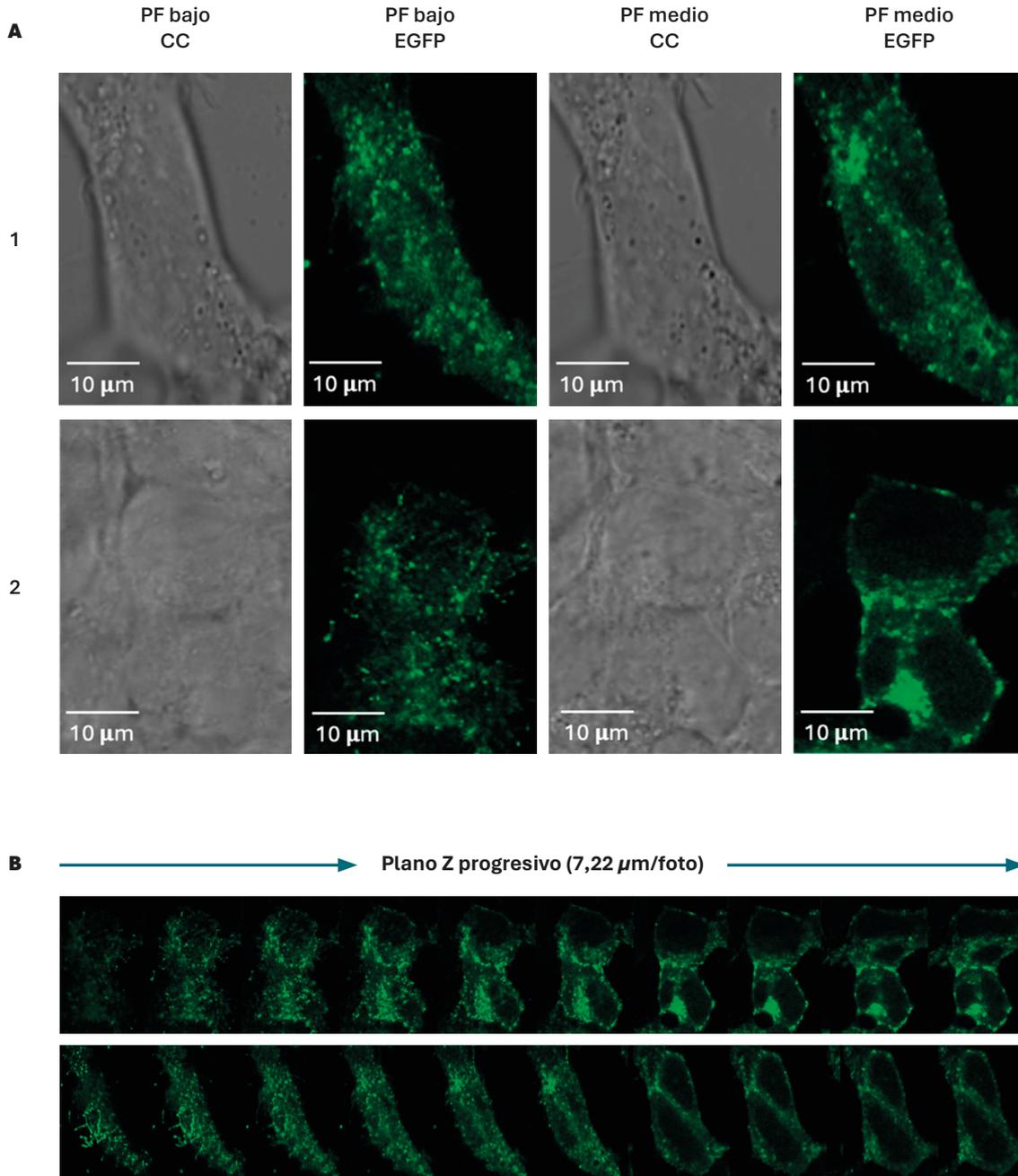
Para el grupo de células que expresan la proteína de fusión (CIC5-EGFP) (**Figura 24**), analizamos dos planos principales; el plano focal bajo (PFB) y el plano focal medio (PFM), tanto para la imagen correspondiente a la fluorescencia emitida por la proteína CIC5-EGFP (EGFP) como para el campo claro (CC). En el PFB de fluorescencia se apreciaron gránulos verdes de pequeño tamaño que se corresponden con la proteína de fusión CIC5-EGFP (**Figura 24. A**). Estos gránulos se observaron distribuidos dispersos a lo largo de todo el plano y aparentemente concentrados en

los filopodios de las células HEK293. Estas prolongaciones son zonas de alto recambio celular y de procesos de endocitosis, por lo que la presencia de la proteína CIC5-EGFP en vesículas de endocitosis es esperada. En el caso del PFM se pudo visualizar la presencia de la proteína de fusión en los bordes de las células, con especial enriquecimiento en las regiones intercelulares (**Figura 24. A**). Al observar las imágenes del plano Z progresivo (**Figura 24. B**), que recorre desde el PF más bajo al más alto, pudimos ver cómo la distribución de la proteína está polarizada, es decir, se localizó mayoritariamente en la parte basal y central de las células, apreciándose las uniones célula-célula por medio de la membrana plasmática, donde ocurre un aumento de la intensidad de la fluorescencia.

En el caso de las células que expresan la proteína de fusión CIC5-V523del-EGFP (**Figura 25**) en el PFB pudimos observar los gránulos fluorescentes de pequeño tamaño, pero con menor intensidad de fluorescencia en comparación con las células que expresan la proteína de fusión WT (**Figura 25. A**). En el PFM de las imágenes de fluorescencia se observaron gránulos verdes en el citoplasma y en el borde de la membrana de las células, pero no se apreció la acumulación de la proteína en las zonas intercelulares, a pesar de la presencia de otras células observadas en el CC (**Figura 25.A**). Respecto al plano Z progresivo (**Figura 25. B**), vimos cómo en los planos más altos la proteína se acumula dentro del citoplasma. Para esta mutación se podría decir que los niveles de expresión de la proteína CIC5-V523del-EGFP se ven alterados, así como su localización, tanto en el PFB como en el PFM.

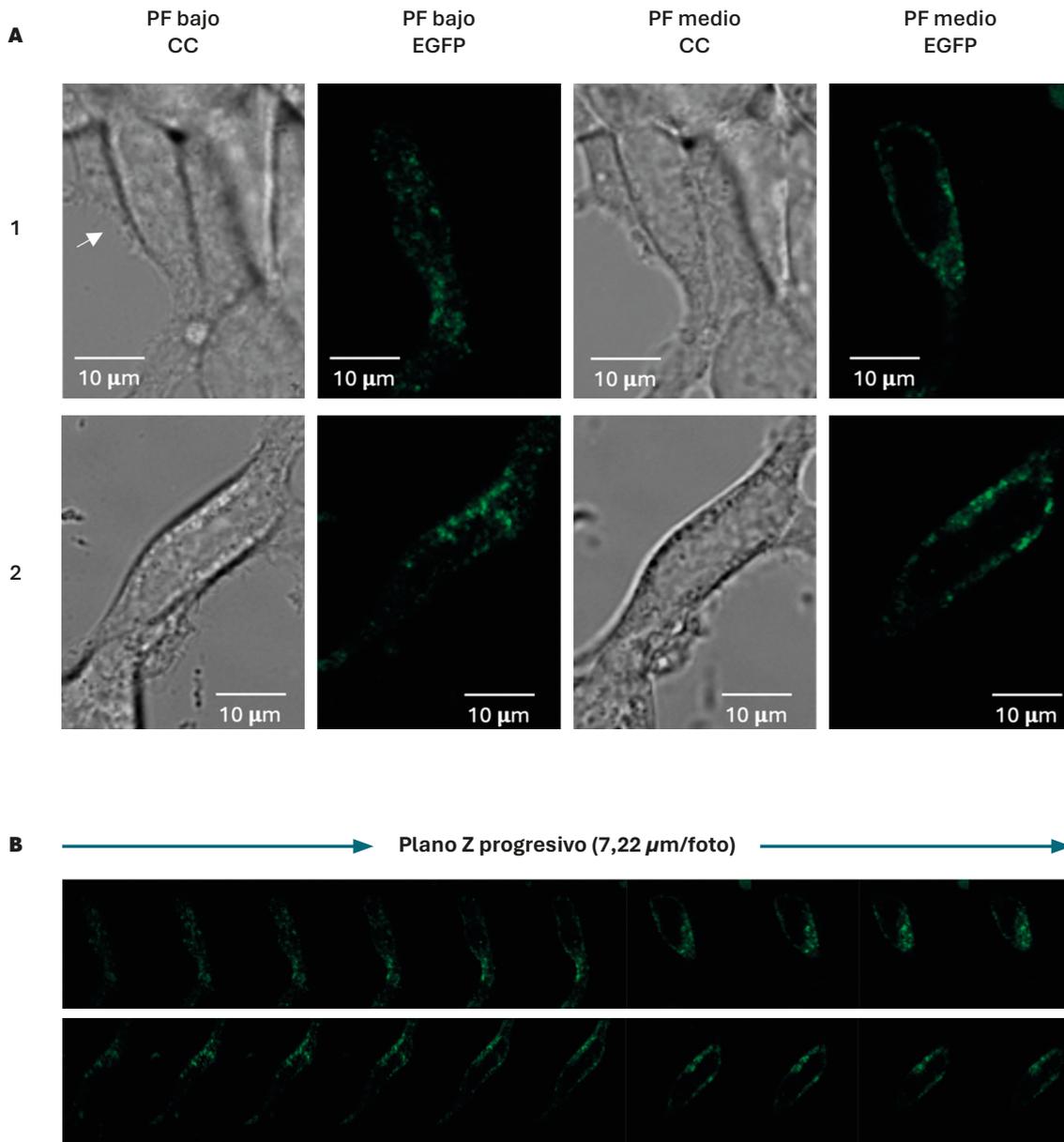
Para las líneas celulares que expresan las proteínas de fusión CIC5-G65R-EGFP (**Figura 26**), CIC5-G462S-EGFP (**Figura 27**) y CIC5-G466D-EGFP (**Figura 28**), lo primero que se destaca es que la presencia reducida de la proteína CIC-5 por una disminución significativa de la intensidad de la fluorescencia ( $p < 0,05$ ) en comparación con las células que expresan la proteína de fusión WT (**Figura 26, 27 y 28. A**). Como consecuencia de la poca visibilidad de la proteína de fusión en las imágenes originales obtenidas tuvimos que editar los valores de brillo y contraste, para así poder observar la localización y la agregación de CIC-5. La imagen original fue capturada a una profundidad de color de 16 bits, que tiene un rango de 0-65535. Para los mutantes CIC5-G65R-EGFP (**Figura 25**) y CIC5-G462S-EGFP (**Figura 26**), el rango se redujo hacia los valores 0-16000, mientras que, para la construcción con el mutante CIC5-G466D-EGFP, el rango se cambió a 0-10000 (**Figura 28**). En la imagen obtenida para la EGFP, se apreciaron apenas gránulos verdes correspondientes a las proteínas de fusión en el PFB, y en algunos casos, gránulos de mayor tamaño, pudiéndose tratar de aglomerados de la proteína en esta zona a causa de la mutación. En el PFM no observamos la presencia de proteínas de fusión mutantes en la membrana de las células. En el caso del mutante CIC5-G65R-EGFP (**Figura 26. A**) observamos acumulaciones de CIC-5 en el citoplasma. Para ninguno de estos mutantes observamos enriquecimiento en la zona intercelular a pesar de que en el CC pudimos observar la presencia de células HEK293 agrupadas entre ellas. Basándonos en estas observaciones, podemos decir que las mutaciones en residuos de glicina seleccionadas generan alteraciones de la expresión de la proteína de fusión, así como cambios en la localización y la agregación en comparación con la WT.

## CIC5-WT-EGFP



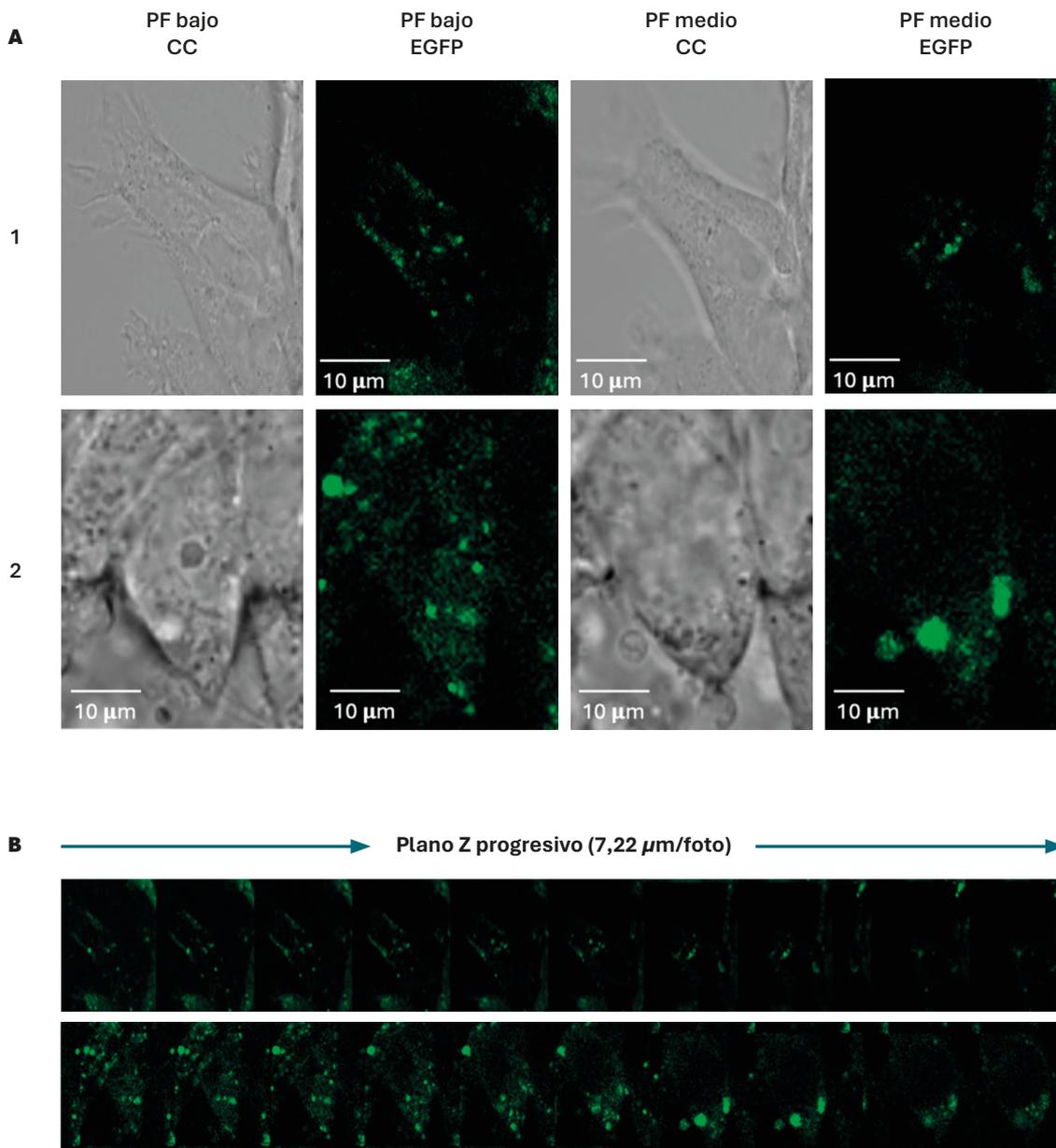
**Figura 24.** Expresión de la proteína CIC5-WT-EGFP en células HEK293 sin tratamiento. A) Se representan los diferentes planos focales tanto para las imágenes obtenidas en CC como para la EGFP. B) Plano Z progresivo obtenido para cada una de las imágenes de fluorescencia mostradas en A. Las imágenes de fluorescencia para la EGFP fueron obtenidas utilizando los siguientes parámetros (Ganancia del detector: 600V; Compensación del detector: -3; Ganancia digital del detector: 0,3).

## CIC5-V523del-EGFP



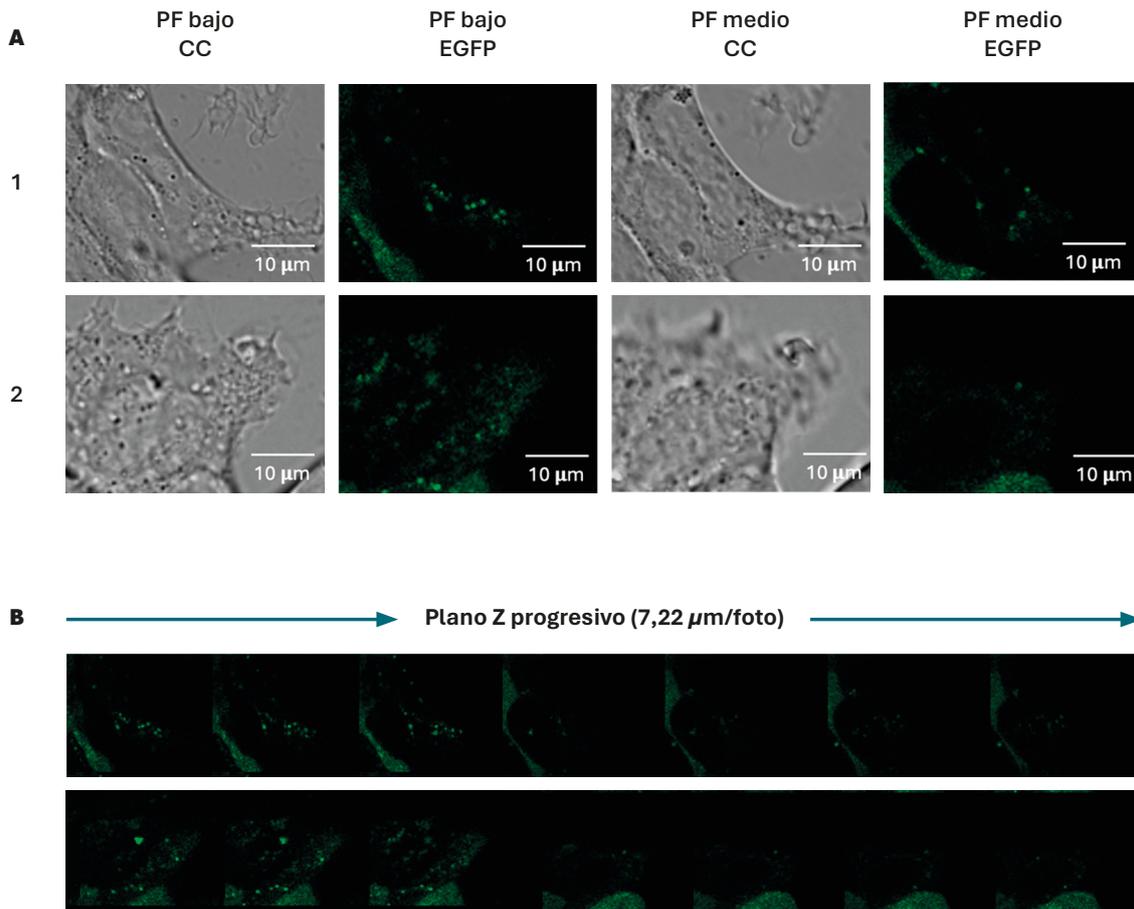
**Figura 25.** Expresión de la proteína mutante CIC5-V523del-EGFP en células HEK293 sin tratamiento. **A)** Se representan los diferentes planos focales tanto para las imágenes obtenidas en CC como para la EGFP. En el PFB en CC de la imagen 1 y 2, se observa la presencia de 2 células (1) y 1 célula (2). **B)** Plano Z progresivo obtenido para cada una de las imágenes de fluorescencia mostradas en A. Las imágenes de fluorescencia para la EGFP fueron obtenidas utilizando los siguientes parámetros (Ganancia del detector: 600V; Compensación del detector: -3; Ganancia digital del detector: 0,3).

## CIC5-G65R-EGFP



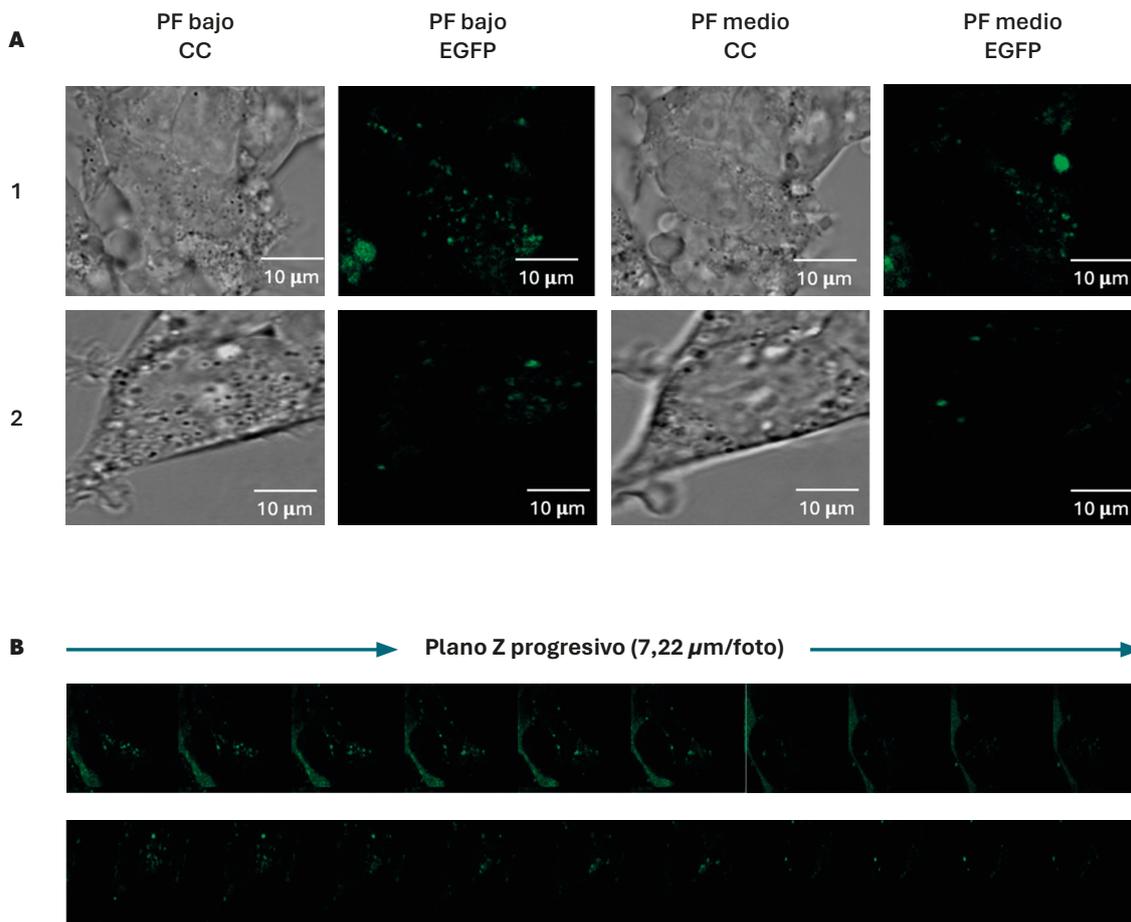
**Figura 26.** Expresión de la proteína mutante CIC5-G65R-EGFP en células HEK293 sin tratamiento. **A)** Se representan los diferentes planos focales tanto para las imágenes obtenidas en CC como para la EGFP. En el PFB en CC de la imagen 1 y 2, se observa la presencia de 4 células (1) y 1 célula (2). **B)** Plano Z progresivo obtenido para cada una de las imágenes de fluorescencia mostradas en A. Las imágenes de fluorescencia para la EGFP fueron obtenidas utilizando los siguientes parámetros (Ganancia del detector: 600V; Compensación del detector: -3; Ganancia digital del detector: 0,3).

## CIC5-G462S-EGFP



**Figura 27.** Expresión de la proteína mutante CIC5-G462S-EGFP en células HEK293 sin tratamiento. **A)** Se representan los diferentes planos focales tanto para las imágenes obtenidas en CC como para la EGFP. En el PFB en CC de la imagen 1 y 2, se observa la presencia de 2 células (1) y 1 célula (2). **B)** Plano Z progresivo obtenido para cada una de las imágenes de fluorescencia mostradas en A. Las imágenes de fluorescencia para la EGFP fueron obtenidas utilizando los siguientes parámetros (Ganancia del detector: 600V; Compensación del detector: -3; Ganancia digital del detector: 0,3).

## CIC5-G466D-EGFP



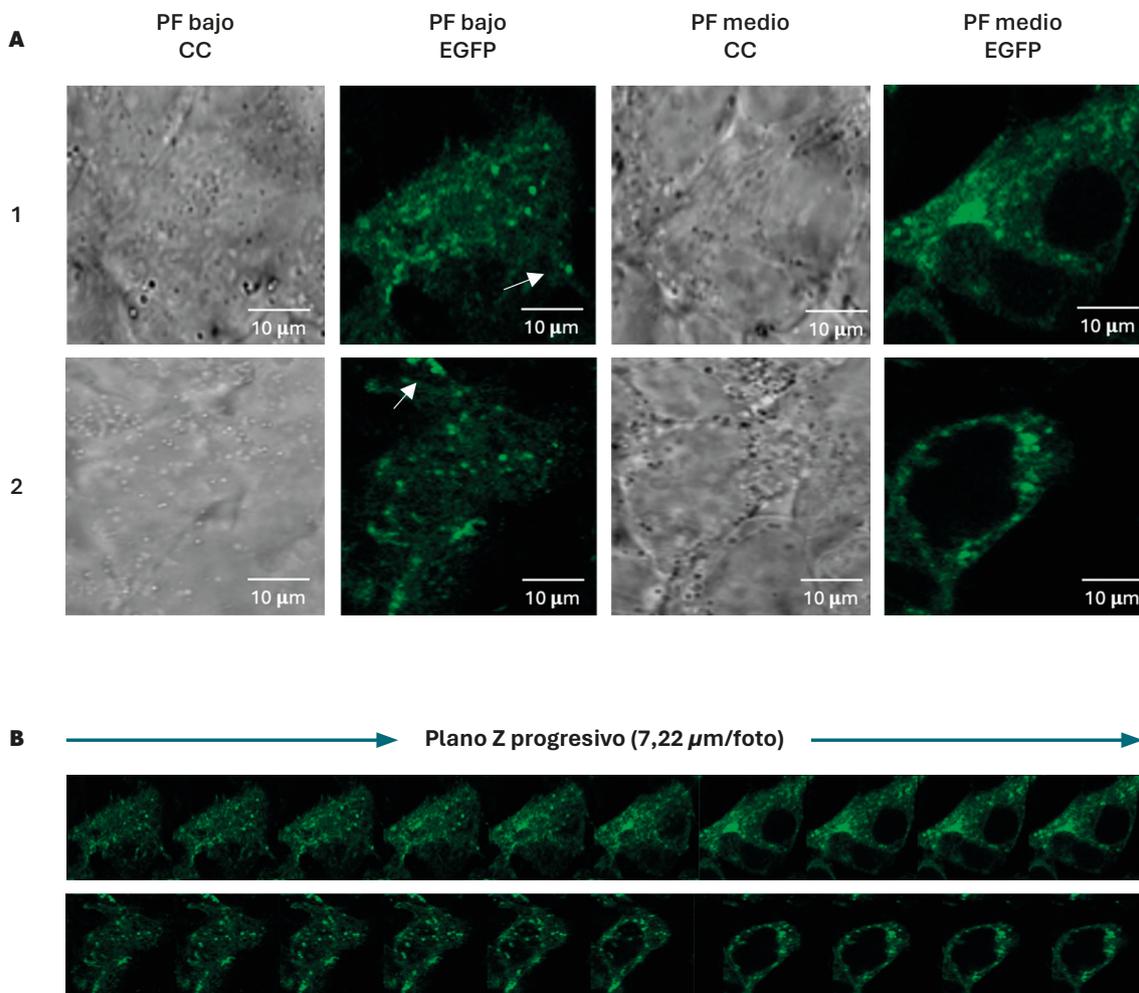
**Figura 28.** Expresión de la proteína mutante CIC5-G466D-EGFP en células HEK293 sin tratamiento. A) Se representan los diferentes planos focales tanto para las imágenes obtenidas en CC como para la EGFP. En el PFB en CC de la imagen 1 y 2, se observa la presencia de varias células (1) y 1 célula (2). B) Plano Z progresivo obtenido para cada una de las imágenes de fluorescencia mostradas en A. Las imágenes de fluorescencia para la EGFP fueron obtenidas utilizando los siguientes parámetros (Ganancia del detector: 600V; Compensación del detector: -3; Ganancia digital del detector: 0,3).

### 2.4.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES TRATADAS CON 4-PBA.

Con respecto a la línea celular que expresa la proteína de fusión CIC5-V523del-EGFP (**Figura 29**), para el PFB en imágenes de EGFP, pudimos observar mayor presencia de los gránulos correspondientes a la proteína de fusión y cierta localización en los filopodios (**Figura 29.A**). En el PFB para el CC pudimos observar gran cantidad de vesículas. En el PFM de imágenes

de EGFP pudimos observar la acumulación de la proteína mutante en zonas intercelulares, rasgo característico de localización de la proteína WT, a diferencia de en las mismas células sin tratar (**Figura 25**). Por otro lado, la intensidad de la fluorescencia de la EGFP aumentó en ambos planos, no observándose diferencias significativas con respecto a la proteína de fusión WT ( $p > 0,05$ ) (**Figura 37. B y C**). Podemos decir, por tanto, que el tratamiento con 4-PBA aumenta la presencia de CIC5-V523del-EGFP en el PFB y en el PFM, y modifica su localización.

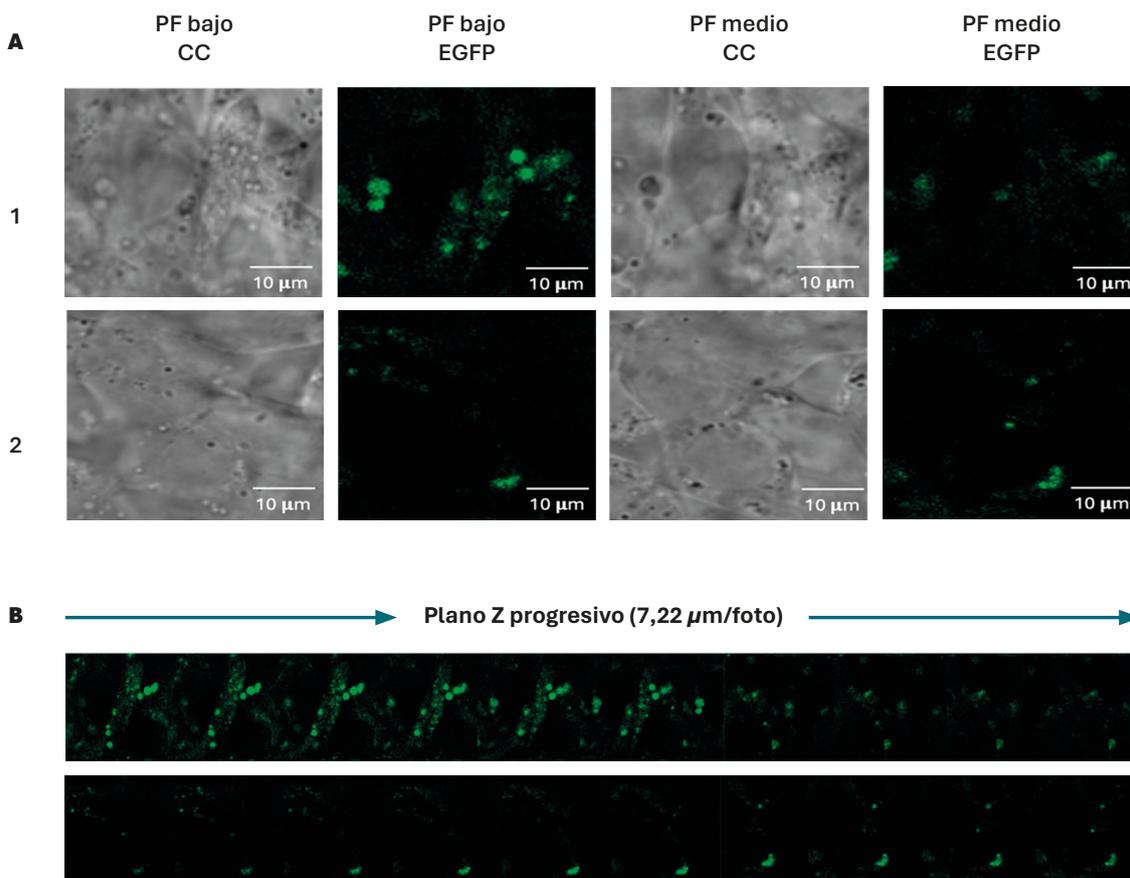
### 4-PBA CIC5-V523del-EGFP



**Figura 29.** Expresión de la proteína mutante CIC5-V523del-EGFP en células HEK293 tratadas con 4-PBA. A) Se representan los diferentes planos focales tanto para las imágenes obtenidas en CC como para la EGFP. B) Plano Z progresivo obtenido para cada una de las imágenes de fluorescencia mostradas en A. Las imágenes de fluorescencia para la EGFP fueron obtenidas utilizando los siguientes parámetros (Ganancia del detector: 600V; Compensación del detector: -3; Ganancia digital del detector: 0,3).

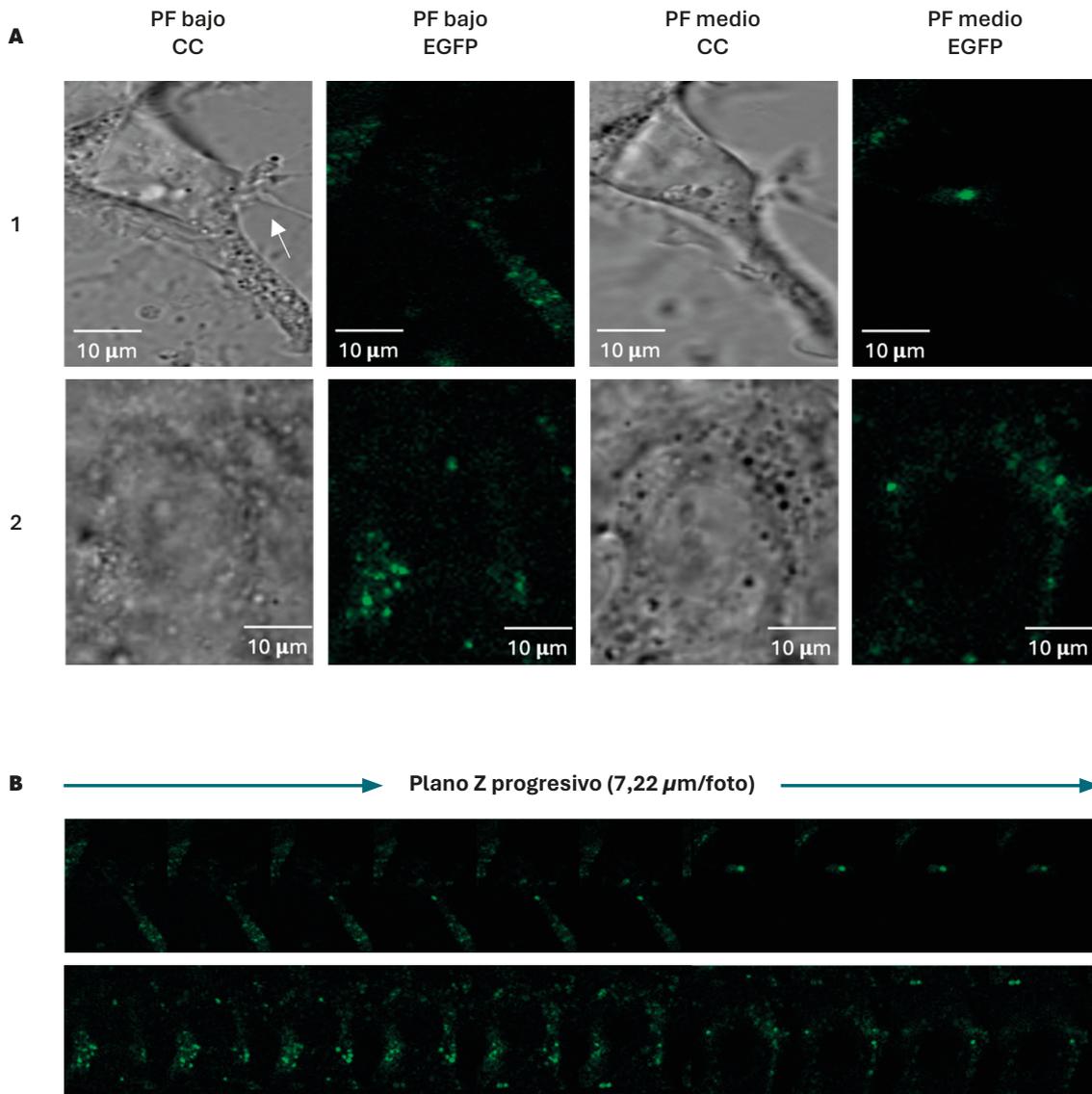
En los ensayos con las líneas celulares que expresan las proteínas de fusión con las mutaciones en residuos de glicina p.(G65R) (**Figura 30**), p.(G462S) (**Figura 31**) y p.(G466D) (**Figura 32**) tratadas con 4-PBA aparentemente se observó en todos los casos una mayor presencia de gránulos verdes en el PFB para EGFP a consecuencia del tratamiento con 4-PBA. Sin embargo, solo se apreció un aumento del valor medio de la intensidad de la fluorescencia para el mutante p.(G466D) (de 104,8 AU a 212 AU) (**Figura 37. B**), aunque no significativo. En el caso del PFM apenas se detectó presencia de las proteínas mutantes (**Figura 30, 31 y 32**). En estos casos, parece haber un cambio desde el punto de vista cualitativo de la presencia de las proteínas CIC5-EGFP mutantes en el PFB como resultado del tratamiento con esta chaperona.

### 4-PBA CIC5-G65R-EGFP



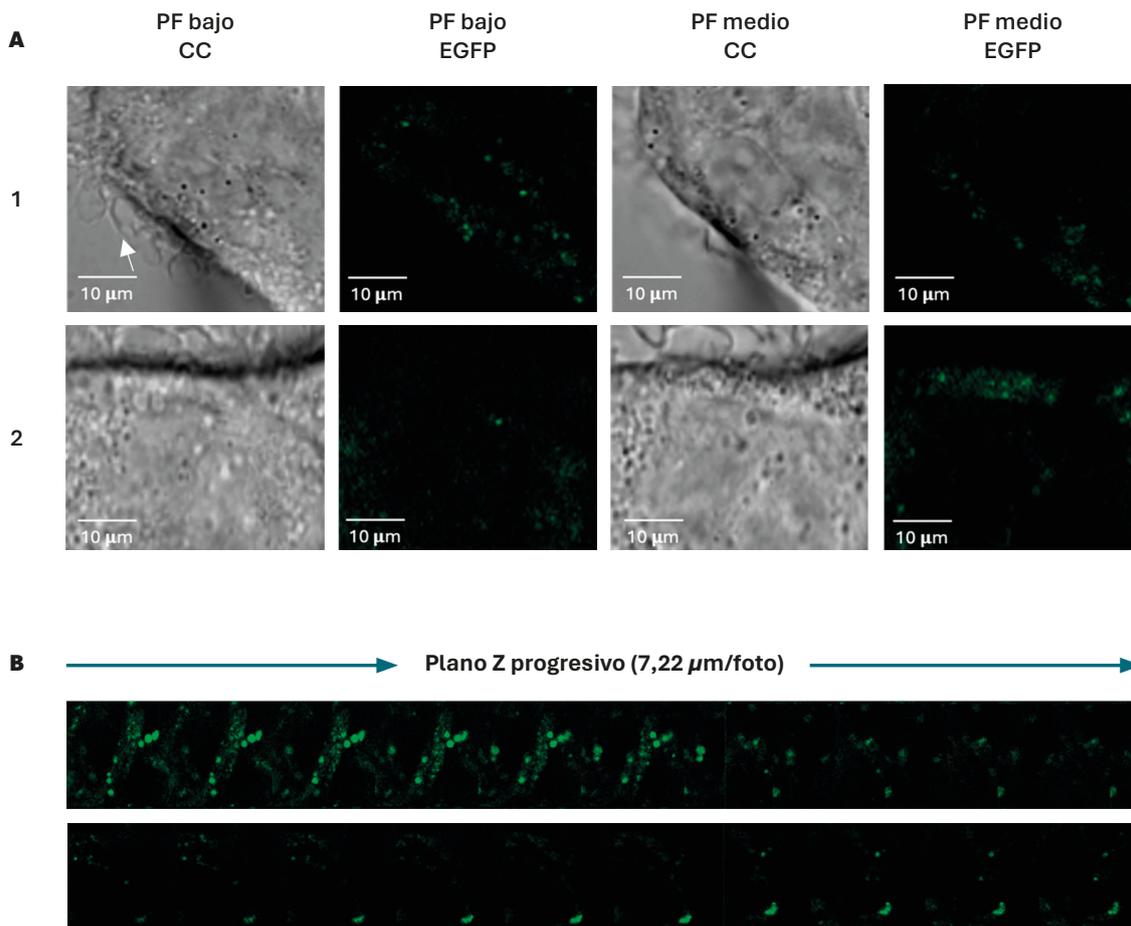
**Figura 30.** Expresión de la proteína mutante CIC5-G65R-EGFP en células HEK293 tratadas con 4-PBA. A) Se representan los diferentes planos focales tanto para las imágenes obtenidas en CC como para la EGFP. B) Plano Z progresivo obtenido para cada una de las imágenes de fluorescencia mostradas en A. Las imágenes de fluorescencia para la EGFP fueron obtenidas utilizando los siguientes parámetros (Ganancia del detector: 600V; Compensación del detector: -3; Ganancia digital del detector: 0,3).

### 4-PBA CIC5-G462S-EGFP



**Figura 31.** Expresión de la proteína mutante CIC5-G462S-EGFP en células HEK293 tratadas con 4-PBA. A) Se representan los diferentes planos focales tanto para las imágenes obtenidas en CC como para la EGFP. B) Plano Z progresivo obtenido para cada una de las imágenes de fluorescencia mostradas en A. Las imágenes de fluorescencia para la EGFP fueron obtenidas utilizando los siguientes parámetros (Ganancia del detector: 600V; Compensación del detector: -3; Ganancia digital del detector: 0,3).

### 4-PBA CIC5-G466D-EGFP

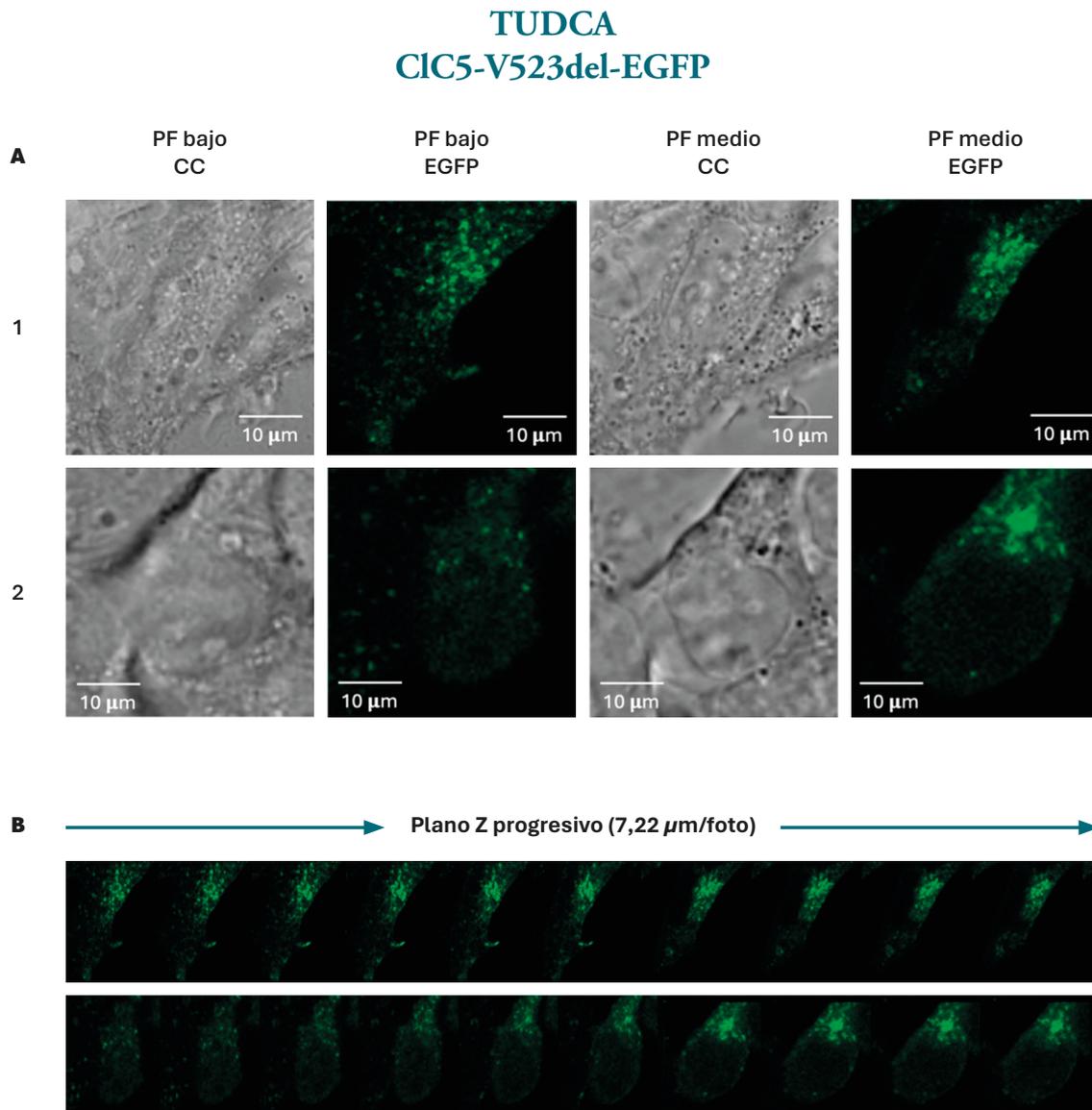


**Figura 32.** Expresión de la proteína mutante CIC5-G466D-EGFP en células HEK293 tratadas con 4-PBA. A) Se representan los diferentes planos focales tanto para las imágenes obtenidas en CC como para la EGFP. B) Plano Z progresivo obtenido para cada una de las imágenes de fluorescencia mostradas en A. Las imágenes de fluorescencia para la EGFP fueron obtenidas utilizando los siguientes parámetros (Ganancia del detector: 600V; Compensación del detector: -3; Ganancia digital del detector: 0,3).

#### 2.4.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES TRATADAS CON TUDCA

Con respecto a la línea celular que expresa la proteína de fusión CIC5-V523del-EGFP (**Figura 33**), en el PFB de fluorescencia, en ambas imágenes pudimos ver un aumento de la presencia de los gránulos correspondientes a la proteína de fusión, así como cierta localización en los filopodios. Se apreció un aumento de la intensidad de la fluorescencia como respuesta al tratamiento con el TUDCA, ya que el valor de la significancia cambia con respecto al control ( $p < 0,05$ ) (**Figura 37**.

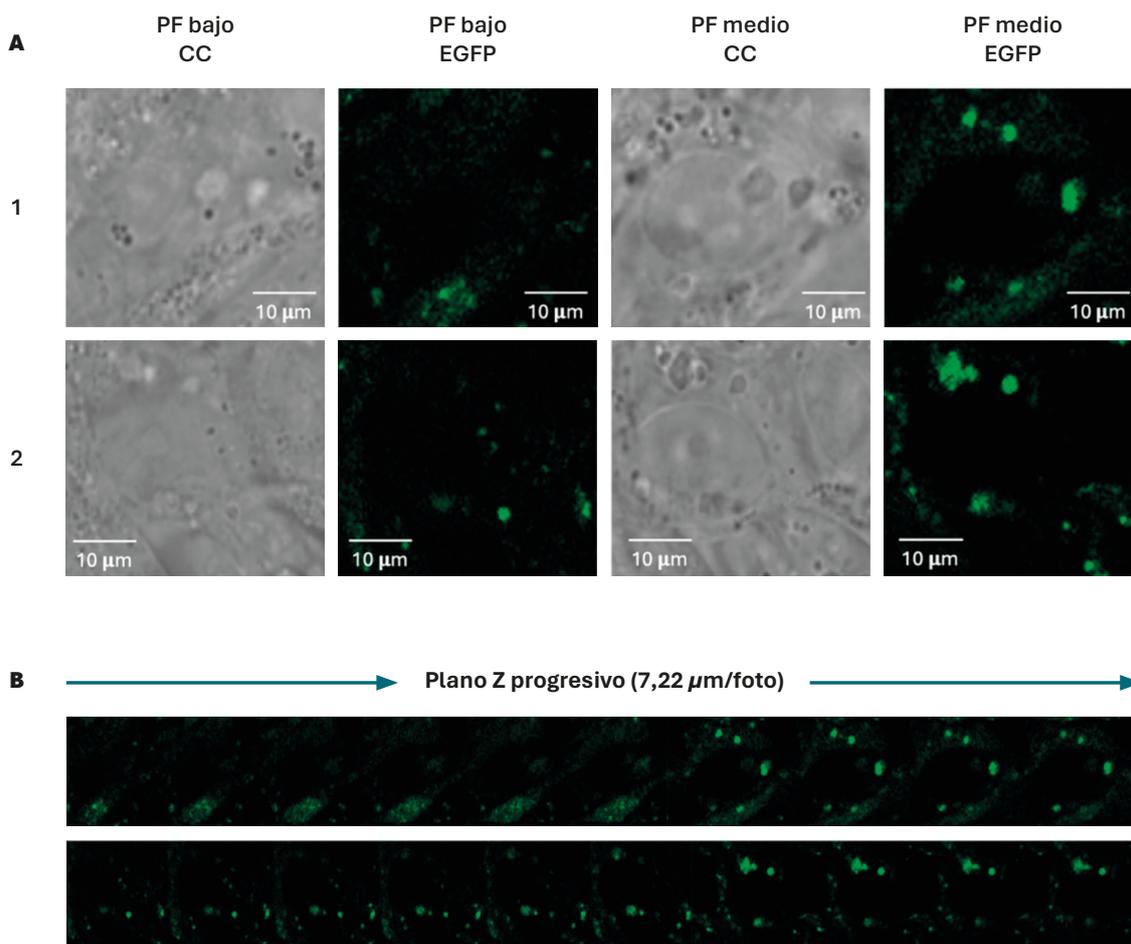
**B).** En el PFB para el CC pudimos ver gran cantidad de vesículas, así como filopodios adheridos al plano (flecha blanca). En el PFM de EGFP se observó el aumento de la proteína mutante, cambio que también apareció en tratamiento con el 4-PBA a diferencia de los mutantes no tratados. Para este plano, también se observó un aumento de la intensidad de la fluorescencia ( $p < 0,01$ ) (**Figura 37. B**). Por lo que podemos decir que el tratamiento con TUDCA aumentó la expresión de CIC5-V523del-EGFP en el PFB, PFM y modificó su localización.



**Figura 33.** Expresión de la proteína mutante CIC5-V523del-EGFP en células HEK293 tratadas con TUDCA. A) Se representan los diferentes planos focales tanto para las imágenes obtenidas en CC como para la EGFP. B) Plano Z progresivo obtenido para cada una de las imágenes de fluorescencia mostradas en A. Las imágenes de fluorescencia para la EGFP fueron obtenidas utilizando los siguientes parámetros (Ganancia del detector: 600V; Compensación del detector: -3; Ganancia digital del detector: 0,3).

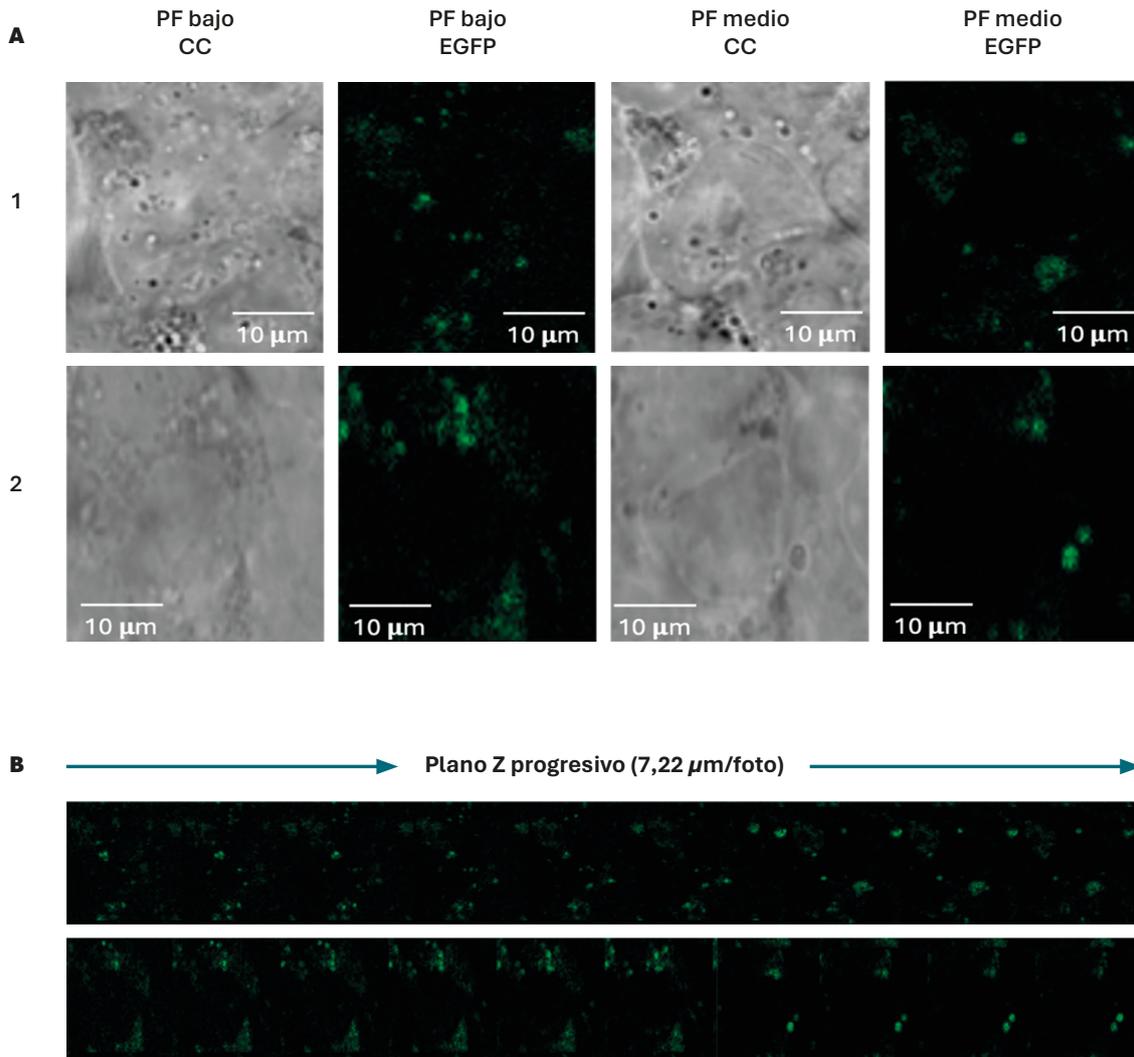
En el caso de las líneas celulares que expresan las proteínas de fusión con las mutaciones en residuos de glicina p.(G65R) (**Figura 34**), p.(G462S) (**Figura 35**) y p.(G466D) (**Figura 36**), en el PFB, observamos un ligero aumento de la intensidad de la fluorescencia en el mutante CIC5-G65R-EGFP (de 125,5 a 393,8 AU) (**Figura 37. B**). Sin embargo, los gránulos eran de gran tamaño por lo que consideramos que no hay cambios morfológicos significativos para este mutante como consecuencia del tratamiento. Para las otras dos proteínas de fusión mutantes no se observaron cambios en el PFB y, para ninguna de las tres se observaron cambios en el PFM para la EGFP. De forma general, se puede decir que no hubo cambios en la localización, la agregación y expresión de la proteína CIC-5 en las diferentes mutaciones como resultado del tratamiento con TUDCA.

### TUDCA CIC5-G65R-EGFP



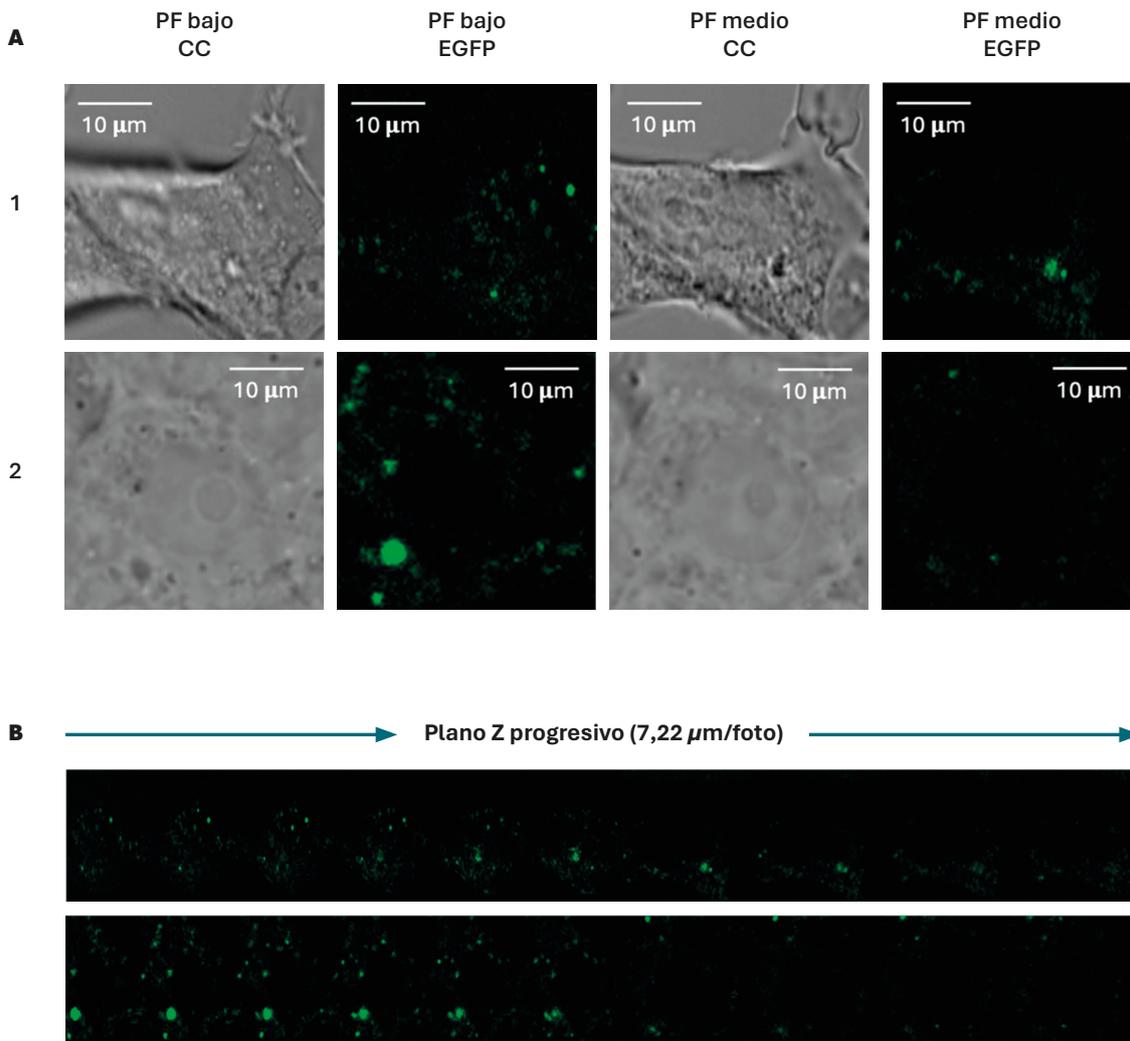
**Figura 34.** Expresión de la proteína mutante CIC5-G65R-EGFP en células HEK293 tratadas con TUDCA. A) Se representan los diferentes planos focales tanto para las imágenes obtenidas en CC como para la EGF. B) Plano Z progresivo obtenido para cada una de las imágenes de fluorescencia mostradas en A. Las imágenes de fluorescencia para la EGFP fueron obtenidas utilizando los siguientes parámetros (Ganancia del detector: 600V; Compensación del detector: -3; Ganancia digital del detector: 0,3).

## TUDCA CIC5-G462S-EGFP

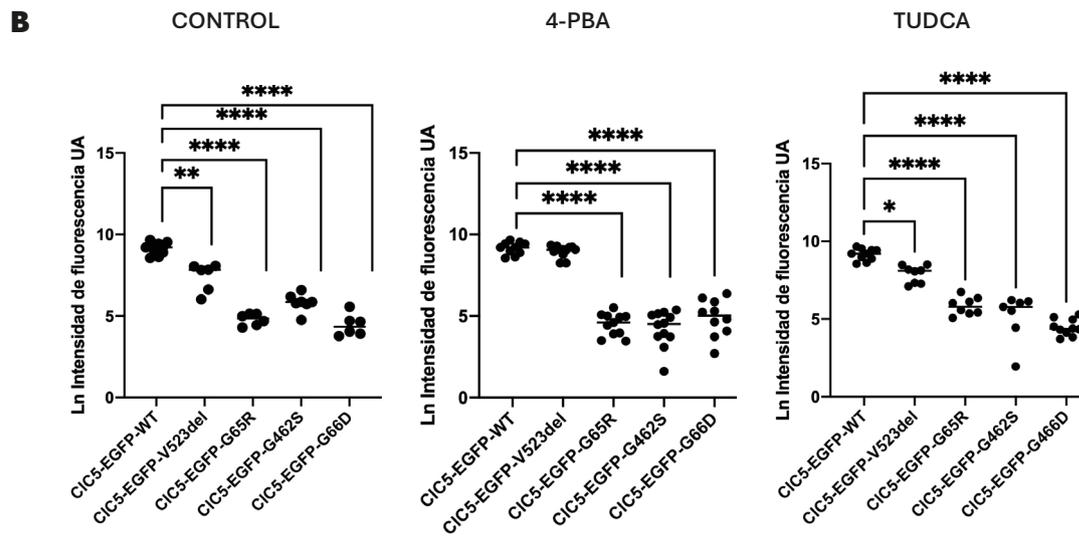
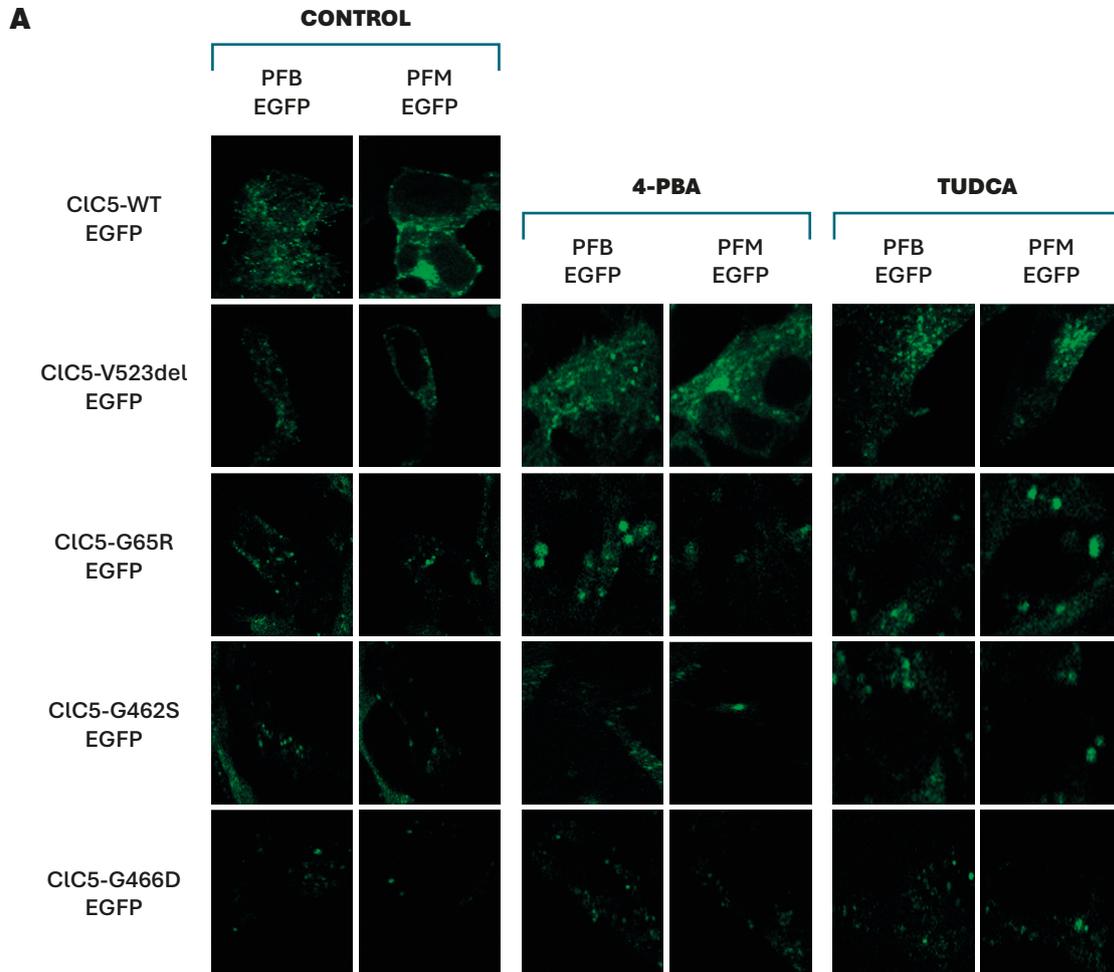


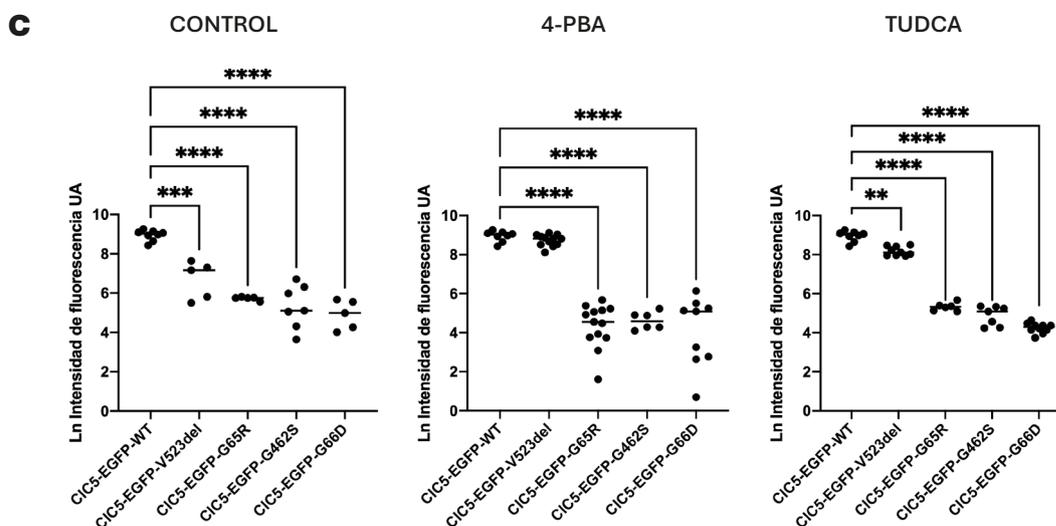
**Figura 35.** Expresión de la proteína mutante CIC5-G462S-EGFP en células HEK293 tratadas con TUDCA. A) Se representan los diferentes planos focales tanto para las imágenes obtenidas en CC como para la EGFP. B) Plano Z progresivo obtenido para cada una de las imágenes de fluorescencia mostradas en A. Las imágenes de fluorescencia para la EGFP fueron obtenidas utilizando los siguientes parámetros (Ganancia del detector: 600V; Compensación del detector: -3; Ganancia digital del detector: 0,3).

## TUDCA CIC5-G466D-EGFP



**Figura 36.** Expresión de la proteína mutante CIC5-G466D-EGFP en células HEK293 tratadas con TUDCA. A) Se representan los diferentes planos focales tanto para las imágenes obtenidas en CC como para la EGFP. B) Plano Z progresivo obtenido para cada una de las imágenes de fluorescencia mostradas en A. Las imágenes de fluorescencia para la EGFP fueron obtenidas utilizando los siguientes parámetros (Ganancia del detector: 600V; Compensación del detector: -3; Ganancia digital del detector: 0,3).





**Figura 37.** Comparación de los resultados obtenidos en las líneas celulares no tratadas (control) y tratadas con 4-PBA y TUDCA para los PFB y PFM. A) Imágenes de fluorescencia de las células HEK293 con las construcciones WT y mutantes en los diferentes planos (PFB y PFM) así como controles y tratadas con TUDCA y 4-PBA. B) Valores de intensidad media de fluorescencia en el PFB obtenidos para líneas celulares expresando las proteínas de fusión WT y mutantes, controles y tratadas con 4-PBA y TUDCA. C) Valores de intensidad media de fluorescencia para el PM, obtenidos para líneas celulares expresando las proteínas de fusión WT y mutantes, no tratadas y tratadas con 4-PBA y TUDCA. UA, unidades arbitrarias. Los valores fueron transformados a escala logarítmica (Ln) con el fin de poder observar comparaciones entre grupo. Las diferencias fueron estimadas mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una-vía. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,000$ .

**Tabla 8.** Resumen de los efectos observados en la agregación, la expresión y la localización de la proteína CIC5-EGFP mutantes, con los tratamientos con 4-PBA y TUDCA.

	4-PBA	TUDCA
<b>CIC5-Val523del-EGFP</b>	Aumenta la presencia de la proteína de fusión en los PFB y en el PFM. Se observa la proteína CIC-5 en los filopodios y acumulaciones en las zonas intercelulares, similar a lo observado en el WT.	Aumenta la presencia de la proteína de fusión el PFM. Se observa la proteína CIC-5 en los filopodios, pero apenas se aprecian acumulaciones en las zonas intercelulares.
<b>CIC5-G65R-EGFP</b>	No se observan cambios significativos en los PFB o PFM.	No se observan cambios significativos en los PFB o PFM.
<b>CIC5-G462S-EGFP</b>	Se aprecian mayores agregados de la proteína CIC-5 en el PFB.	No se observan cambios significativos en los PFB o PFM.
<b>CIC5-G466D-EGFP</b>	Se aprecian mayores agregados de la proteína CIC-5 en el PFB.	No se observan cambios significativos en los PFB o PFM.

### 3. TRATAMIENTO DEL RATÓN KI *Clcn5V523del* CON ÁCIDO TAUROURSODEOXICÓLICO (TUDCA)

Para valorar el efecto terapéutico del tratamiento con TUDCA en nuestro modelo de ratón de la ED1, se analizó la PBPM, usando como marcador las concentraciones urinarias de  $\beta$ 2-microglobulina, así como los niveles de calcio y fósforo en orina, el volumen de orina excretada, el volumen de agua ingerida y el peso de los ratones. Para cada uno de estos parámetros, se establecieron valores de debut en base a la distribución de los datos (percentiles 25, 50 y 75) observados al comparar ratones WT (sanos) y ratones KI (enfermos), con la finalidad de determinar el valor patológico que presenta un ratón KI para cada parámetro (**Tabla 9**).

**Tabla 9.** Valores debut determinados para cada uno de los parámetros analizados en los ratones KI *Clcn5V523del*.

Ratones KI	PBPM	Hipercalciuria	Hiperfosfaturia
Valores debut en ratones KI	$\geq 150$ ng/24h	$\geq 0,05$ mg/24h	$\geq 3$ mg/24h

Como valores de referencia o basales de estos parámetros se utilizaron los datos obtenidos en la caracterización previa del modelo de ratón KI *Clcn5V523del* (Perdomo-Ramírez, Tesis Doctoral y manuscrito en preparación) a los 3 meses de edad (T0), a los 3 meses y 20 días (T20) y 4 meses de edad (T30) (**Tabla 10**). Se observó que los ratones KI presentan niveles de excreción en orina de  $\beta$ 2-microglobulina de fósforo y calcio significativamente mayores respecto a los WT ( $p < 0,05$  en los tres casos). Respecto a la excreción de orina, nuestro modelo presenta poliuria con valores cercanos a la significancia ( $p = 0,065$ ). Además, se observó una tendencia al aumento en todos los parámetros a los 4 meses de edad en los ratones KI, pero sin valores significativos.

**Tabla 10.** Valores de referencia de los parámetros clínicos característicos de la ED1 observados en el modelo KI *Cln5V523del* a los 3 y 4 meses de edad.

<b>Parámetros bioquímicos</b>	<b>WT (3 meses)</b>	<b>KI (3 meses)</b>	<b>KI (4 meses)</b>	<b>N</b>
<b>Orina excretada (ml)</b>	0,68 ± 0,26	0,79 ± 0,41 <sup>a</sup>	1,1 ± 0,62	WT: 13; Dent: 29
<b>Agua ingerida (ml)</b>	2,57 ± 0,64	3,41 ± 0,68	3,94 ± 1,79	WT: 13; Dent: 29
<b>PBPM (β2-microglobulina) (ng/ml)</b>	33,73 ± 28,86	626,98 ± 922,92 <sup>a</sup>	738,63 ± 1155,80	WT: 13; Dent: 29
<b>Fosfato en orina (mg/24h)</b>	2,08 ± 2,33	3,61 ± 2,32 <sup>a</sup>	4,72 ± 2,78	WT: 13; Dent: 29
<b>Calcio en orina (mg/24h)</b>	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,03	WT: 13; Dent: 29

<sup>a</sup> Existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre ratones WT y KI. Las diferencias estadísticas fueron analizadas mediante el estadístico U de Mann-Whitney.

### 3.1. VALORES DE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD DE *DENT-1* EN EL GRUPO DE RATONES *KI* UTILIZADOS EN EL ENSAYO CON *TUDCA*

Los ratones KI utilizados en este ensayo presentan las principales manifestaciones fenotípicas de la ED1 en comparación con los ratones WT: elevados niveles de diuresis ( $p < 0,05$ ), de PBPM ( $p < 0,05$ ), hipercalciuria ( $p < 0,01$ ) e hiperfosfaturia ( $p < 0,05$ ), lo que concuerda con lo observado en la caracterización del modelo (**Tabla 10**).

### 3.2. DETERMINACIÓN DE LA PBPM (β2-MICROGLOBULINA)

Los datos obtenidos de β2-microglobulina en orina presentaron una dispersión elevada. De forma general, los niveles de β2-microglobulina aumentaron 75 veces con respecto al grupo WT control (valor medio=38,85± 27,71 ng/24h). Se analizaron los datos de la PBPM en ratones KI que cumplían con el criterio de debut, sin embargo, las diferencias entre ratones WT y KI no eran significativas ( $p=0,414$ ) debido a la elevada dispersión de la variable, por lo que se llevó cabo una segmentación de los datos en tres niveles en función de los percentiles 25, 50 y 75: bajo (150,00-434,29 ng/24h; N=6), medio (434,29-1955,30 ng/24h; N=8) y alto (1955,21-3445,57 ng/24h; N=6), obteniendo diferencias significativas entre los ratones WT y KI del grupo medio ( $p=0,0007$ ).

El análisis estadístico mostró que el tratamiento con TUDCA disminuyó significativamente los niveles de  $\beta$ 2-microglobulina del grupo medio ( $p=0,007$ ) de ratones KI comparando T0 y T20 (**Figura 38**), con una reducción del valor medio de la PBPM del 56%. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas al compararlos con el grupo no tratado ( $p=0,480$ ) (**Tabla 11**).

### **3.3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXCRECIÓN URINARIA DE FOSFATO**

Los niveles de fosfato urinario se incrementaron 4 veces en la orina de los ratones KI en comparación con el grupo WT (valor medio= 1,09 mg/24h). Una vez tratados con TUDCA, se observaron diferencias significativas ( $p=0,040$ ) entre los grupos KI tratados comparando T0 y T20 (**Figura 38**) con una reducción de los valores medios de fosfato en la orina del 28%. No se apreciaron diferencias significativas entre controles y tratados, a pesar de los valores medios del grupo KI control son más elevados que el grupo KI tratado a T20 (**Tabla 11**).

### **3.4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXCRECIÓN URINARIA DE CALCIO**

El grupo KI mostró un incremento de 2 veces el valor medio de calcio urinario comparado con los ratones WT (valor medio=0,04 mg/24h). Observamos una reducción significativa ( $p=0,036$ ) de este parámetro en los ratones KI tratados con TUDCA en comparación al T0, en concreto, una disminución del 33% (**Figura 38 y Tabla 11**).

### **3.5. DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE ORINA EXCRETADA**

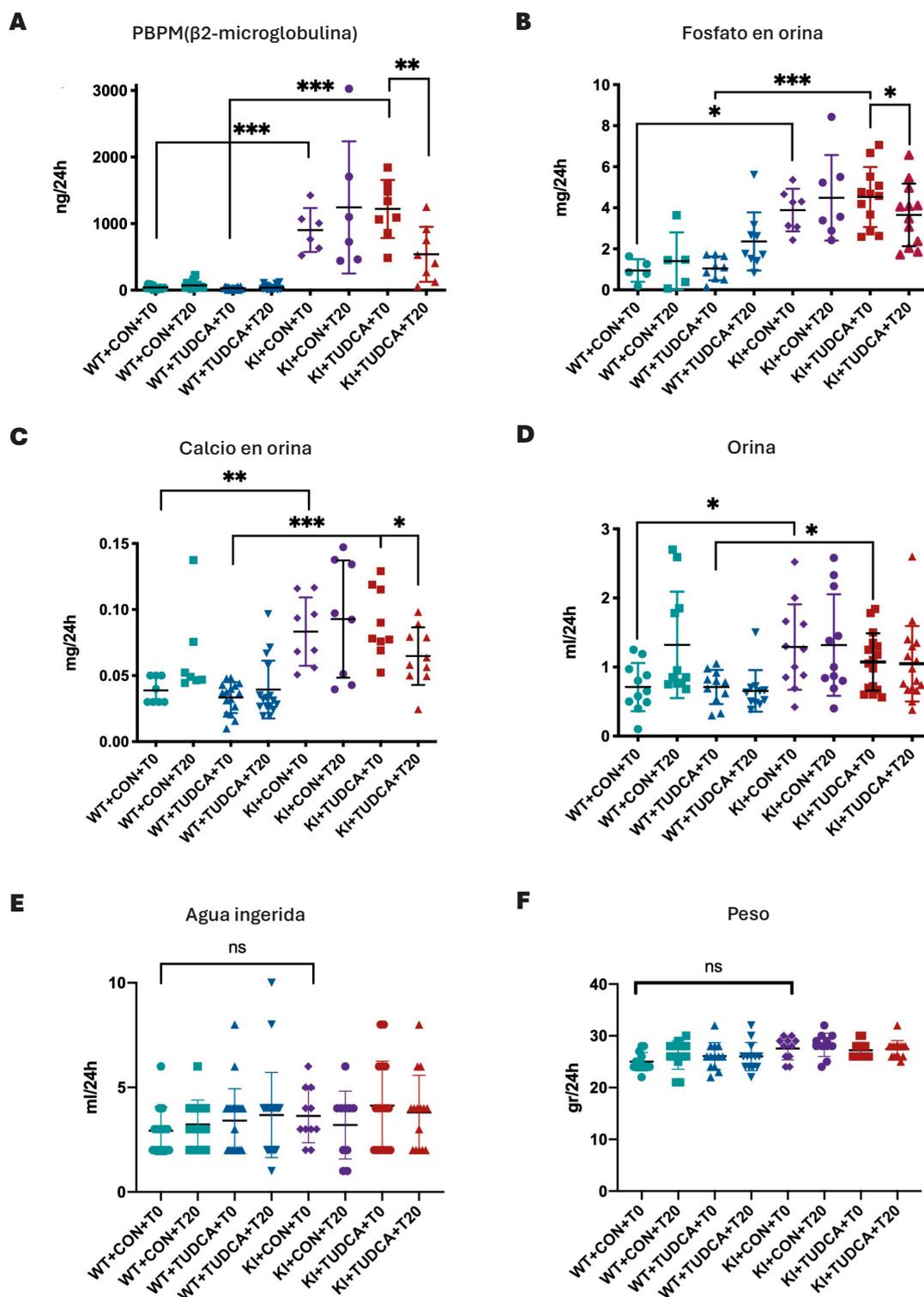
Los niveles de orina excretada por los ratones KI fueron 1,8 veces superiores en comparación con el grupo WT (valor medio=0,71 ml) ( $p=0,01$ ). El tratamiento con TUDCA no afectó a los volúmenes de orina excretados manteniéndose superiores después del tratamiento ( $p=0,299$ ) (**Figura 38 y Tabla 11**).

### **3.6. DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE AGUA INGERIDA**

El volumen de agua ingerida a T0 fue similar entre los grupos de ratones KI y WT ( $p=0,146$ ). El tratamiento con el TUDCA no generó cambios en dichos niveles ( $p=0,692$ ) (**Figura 38 y Tabla 11**).

### **3.7. DETERMINACIÓN DEL PESO CORPORAL**

Se recogieron los valores del peso de los ratones WT y KI durante todo el tratamiento como principal medida de bienestar de los animales. Para esta variable no se observaron diferencias significativas entre ratones WT y KI a T0 ( $p=0,120$ ). El tratamiento con el TUDCA no generó cambios en dichos niveles ( $p=0,781$ ) (**Figura 38 y Tabla 11**).



**Figura 38.** Características fenotípicas determinadas para la ED1. **A)** Valores de  $\beta$ 2-microglobulina (PBPM). **B)** Valores de fosfato en orina en ratones. **C)** Valores de calcio en orina. **D)** Valores de orina excretada en ratones. **E)** Valores de agua ingerida. **F)** Peso corporal de los ratones WT y KI no tratados (CON) y tratados (TUDCA); T0: inicio del experimento; T20: final del experimento \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**Tabla 11.** Marcadores de la ED1 medidos en los ratones KI *Cln5V523* del a T0 y T20.

	<b>KI+CON+T0</b>	<b>KI+CON+T20</b>	<b>KI+TUDCA+T0</b>	<b>KI+TUDCA+T20</b>
<b>β2-microglobulina (ng/24h)</b>	903,28 ± 330,65 (n=6)	1244,0 ± 993,6 (n=6)	1220,05±435,36 (n=8)	539,06 ± 412,79 (n=8) ***
<b>Fosfato en la orina (mg/24h)</b>	3,89 ± 1,03 (n=7)	4,49 ± 2,08 (n=7)	4,53 ± 0,89 (n=12)	3,65 ± 1,53 (n=12) *
<b>Calcio en orina (mg/24)</b>	0,08 ± 0,03 (=8)	0,09 ± 0,04 (=8)	0,09 ± 0,02 (=10)	0,06 ± 0,02 (=8) *
<b>Orina excretada (ml/24h)</b>	1,29 ± 0,61 (N=11)	1,32 ± 0,74 (N=11)	1,07 ± 0,42 (N=16)	1,05 ± 0,55 (N=16)
<b>Agua ingerida (ml/24h)</b>	3,64 ± 1,29 (N=11)	3,20 ± 1,62 (N=11)	4,13 ± 2,13 (N=16)	3,80 ± 1,78 (N=16)
<b>Peso (g)</b>	27,55 ± 2,21 (N=11)	28,27 ± 2,24 (N=11)	27,20 ± 1,47 (N=16)	27,40 ± 1,68 (N=16)

KI no tratados (CON) y tratados (TUDCA); T0: inicio del experimento; T20: final del experimento \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p>0,001. Las diferencias fueron determinadas mediante las comparaciones por parejas con ajuste de Bonferroni a partir de un modelo mixto de medidas repetidas. Datos mostrados en forma de media ± desviación estándar.

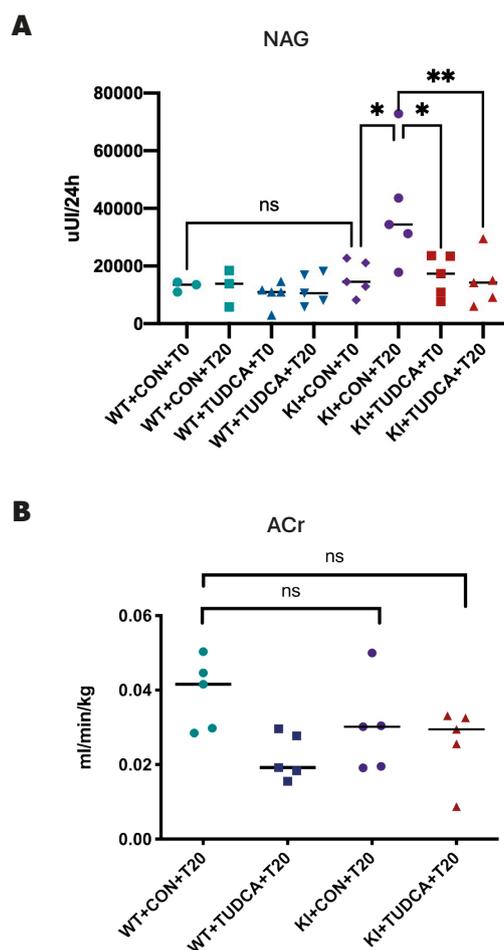
### **3.8. CUANTIFICACIÓN DE LA EXCRECIÓN DE LA N-ACETYL-β-GLUCOSAMINIDASA (NAG) COMO MARCADOR DE PBPM Y DE DAÑO TUBULAR**

En el caso de los ratones KI a T0, observamos que los valores de excreción de NAG no son significativamente diferentes a los observados en los ratones WT a T0 (p=0,464), sin embargo, la excreción de NAG aumenta en los ratones KI no tratados a T20 respecto a T0 (p=0,014) (**Figura 39 y Tabla 12**). Estos datos sugieren que, a los 3 meses y 20 días de edad,

el modelo presentaría daño en las células del túbulo proximal. Cabe destacar que observamos que la excreción de NAG disminuye significativamente ( $p=0,006$ ) a los 20 días en los ratones KI tratados con TUDCA, con una reducción del 63%. Esto confirma la función de NAG como marcador de PBPM, además de como marcador de daño tubular.

### 3.9. ACLARAMIENTO DE CREATININA COMO MARCADOR DE LA FUNCIÓN RENAL

Basándonos en los resultados obtenidos tanto para la creatinina sérica como para el ACr en los ratones WT y KI a T20 tratados con TUDCA o controles (**Figura 39 y Tabla 12**), no se observan diferencias significativas entre estos grupos ( $p=0,6$  y  $p=0,2$ , respectivamente), por lo que nuestro modelo no muestra a los 3 meses de edad signos de fallo renal.



**Figura 39.** Marcadores de daño tubular y daño renal. **A)** Valores de excreción de NAG y **B)** Aclaramiento de creatinina (ACr) en ratones WT y KI no tratados (CON) y tratados (TUDCA); T0: inicio del experimento; T20: final del experimento. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

**Tabla 12.** Marcadores de daño tubular (NAG), daño renal (creatinina sérica y aclaramiento de la creatinina) en ratones KI *Cln5V523del*.

	<b>KI+CON+T0</b>	<b>KI+CON+T20</b>	<b>KI+TUDCA+T0</b>	<b>KI+TUDCA+T20</b>
<b>NAG (uUI/24h)</b>	15889 ± 5986 (n=5)	39977 ± 20574 (n=5)	16594 ± 7201 (n=5)	14805 ± 9015** (n=5)
<b>Creatinina sérica (mg/dl)</b>	0,51 ± 0,07 (n=7)	0,51 ± 0,1 (n=7)	0,56 ± 0,07 (n=9)	0,49 ± 0,1 (n=9)
<b>ACr (ml/min/kg)</b>	0,038 ± 0,009 (=5)	0,020 ± 0,006 (=5)	0,029 ± 0,013 (=5)	0,026 ± 0,010 (=5)

KI no tratados (CON) y tratados (TUDCA); T0: inicio del experimento; T20: final del experimento. \*p<0,05; \*\*\*p<0,001. Las diferencias fueron estimadas mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una-vía. Datos mostrados en forma de media ± desviación estándar.





# Discusión



La enfermedad de Dent es una tubulopatía renal rara, de herencia recesiva ligada al cromosoma X. Entre las principales características fenotípicas encontramos la PBPM, hiper calciuria, nefrocalcinosis y nefrolitiasis, así como el fallo renal progresivo. Se presenta en la infancia o en la adolescencia y afecta de manera más severa a los varones que a las mujeres. En la edad adulta, los pacientes evolucionan con frecuencia hacia la insuficiencia renal crónica (Wang *et al.*, 2016). Otras manifestaciones clínicas son muy variables, representando un síndrome de Fanconi parcial (Claverie-Martín *et al.*, 2011). Esta enfermedad está causada por mutaciones en los genes *CLCN5* en un 50-60% de los casos (Enfermedad de Dent-1) y en el gen *OCRL*, en un 15% (enfermedad de Dent-2). El porcentaje restante (10-15%) no presenta mutaciones en estos genes, clasificándose como ED de tipo 3 (ED3) (Anglani *et al.*, 2015).

En nuestro estudio, nos centramos en la determinación del efecto de mutaciones exónicas del gen *CLCN5* sobre el procesamiento del pre-ARNm, comenzando con un estudio *in silico* donde 63 mutaciones de cambios de sentido de *CLCN5* identificadas en la bibliografía fueron analizadas usando diferentes herramientas bioinformáticas, obteniendo que solo para 12 se predecía un efecto sobre el *splicing* del pre-ARNm. Se llevó a cabo a continuación un análisis *in vitro* mediante minigenes y RT-PCR, y encontramos que 3 de ellas son variantes tanto de cambio de sentido como variantes que causan un defecto del pre-ARNm.

Además de esto, también nos enfocamos en la búsqueda de estrategias terapéuticas para el tratamiento de la ED1. Utilizando la línea celular HEK293, en la cual se introdujo un vector de expresión de una proteína de fusión CIC-5-EGFP WT y con 4 mutaciones de clase 1 (p.(G466D), p.(G462S), p.(G65R) y p.(V523del), se llevó a cabo un estudio sobre la expresión, localización y formación de agregados de CIC-5-EGFP, observando alteraciones significativas en la presencia de CIC-5-EGFP a causa de las mutaciones. Posteriormente se probó el efecto de las chaperonas hidrofóbicas TUDCA y 4-PBA en estas líneas celulares, con el fin de mejorar, al menos parcialmente los niveles de expresión y la localización de la proteína CIC-5-EGFP mutante, obteniendo resultados positivos en la recuperación de ambos parámetros de CIC-5-EGFP con la variante p.(V523del). Esta misma estrategia fue aplicada en el ratón KI *Cln5V523del*, el cual expresa las principales características de la ED1, entre las que encontramos la PBPM, hiper calciuria e hiperfosfaturia, observándose la reducción significativa de estos parámetros con el tratamiento con TUDCA, por lo que esta chaperona podría tener un posible uso terapéutico en los pacientes con la ED1.

## 1. EFECTO DE LAS MUTACIONES DE CAMBIOS DE SENTIDO EN EL GEN *CLCN5* SOBRE EL PRE-ARNM MEDIANTE ENSAYOS CON MINIGENES

La alteración del procesamiento del pre-ARNm por mutaciones intrónicas o exónicas es una causa de enfermedad bien establecida (Arnous *et al.*, 2023; Wang & Cooper, 2007; Scotti & Swanson, 2016). Recientemente, se ha hecho evidente que las mutaciones exónicas que afectan este proceso son más prevalentes que lo predicho a partir de las observaciones anteriores (Soukariéh *et al.*, 2016). Para mejorar el diagnóstico genético de enfermedades hereditarias y el diseño de nuevas estrategias terapéuticas es necesario evaluar las consecuencias a nivel biológico y clínico de variantes que afectan presuntamente al proceso de corte y empalme (Wai *et al.*, 2019).

Existen cada vez más evidencias de que casi cualquier tipo de modificación en la secuencia de nucleótidos puede tener un efecto en el procesamiento del pre-ARNm, a través de la interrupción de las secuencias consenso involucradas, mediante la creación de nuevos sitios, el favorecimiento del uso de sitios crípticos o afectando a sitios reguladores. Como resultado, cada alteración nucleotídica podría considerarse un candidato potencial para alteraciones de *splicing* (Cartegni *et al.*, 2000; Dehainault *et al.*, 2007; Zatkova *et al.*, 2004). Esto se cumple invariablemente cuando se trata de modificaciones en los dinucleótidos altamente conservados AG/GT en los extremos de los intrones, sin embargo, cuando se trata de variaciones en posiciones menos definidas resulta más difícil predecir el efecto potencial en el *splicing*. Desafortunadamente, para la mayoría de los laboratorios de diagnóstico es prácticamente inviable probar funcionalmente cada modificación de nucleótidos encontrada al nivel de RNA. Por este motivo las herramientas bioinformáticas que predicen el impacto de las variantes en el proceso de corte y empalme son de gran utilidad en un primer término como evidencia complementaria para la evaluación de mutaciones. El uso de algoritmos que permitan predicciones correctas y fiables del impacto de las variantes es de gran importancia y se ha desarrollado enormemente en los últimos años (Houdayer *et al.*, 2008; Hellen, 2009).

Además, hay que destacar la necesidad de utilizar diferentes herramientas ya que algunos algoritmos se basan únicamente en la predicción del efecto en secuencias consenso, que permite el análisis de variantes intrónicas cercanas a los sitios aceptor o donador y sitio de ramificación (*NNsplice*, *HSE*, *CADD-Splice*, *SPARN*), otros en la predicción de sitios reguladores en secuencias exónicas (*HSE*, *SpliceAI*, *Sironi database*) y otros consisten en análisis más complejos de variantes exónicas basado en métodos de aprendizaje automático (*MutPred Splice*). Además de predicciones bioinformáticas, se requieren ensayos funcionales que utilicen ARN de pacientes o en su defecto, sistemas de minigenes, para determinar el verdadero efecto de

una variante genética (Richards *et al.*, 2015). Las muestras de ARN de los tejidos de los pacientes, y en concreto de riñón de sujetos en edad pediátrica, son generalmente problemáticas de obtener, y los ensayos con sistemas de minigenes son una alternativa práctica (Singh & Cooper 2006), ya que diversos estudios han mostrado un alto grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con ellos y aquellos obtenidos a partir de ARN del paciente (Tournier *et al.*, 2008; Steffensen *et al.*, 2014; Van der Klift *et al.*, 2015). Un estudio funcional reciente de mutaciones intrónicas en *CLCN5* ubicadas cerca de los extremos de los exones (3 a 17 nucleótidos) utilizando ensayos con minigenes ha demostrado que cinco de estas variantes producen ARNm alterados y se concluyó que son patogénicas (Inoue *et al.*, 2020). También se han utilizado minigenes para estudiar mutaciones que afectan el dinucleótido canónico de los sitios de corte y empalme, que generalmente se consideran patogénicos ya que resultan en una ausencia total de la proteína debido a la degradación del transcrito mediante el mecanismo *Nonsense Mediated Decay* (NMD) (Kurosaki *et al.*, 2019).

En nuestro estudio, seleccionamos 63 variantes de cambio de sentido presentes en *CLCN5* de la literatura (Mansour-Hendili *et al.*, 2015) que estaban ubicadas a menos de 70 nucleótidos de los sitios de empalme donador o aceptor (**Anexo I**). De estas, solo 12 variantes mostraron efectos potenciales sobre el *splicing* del pre-ARNm con al menos dos de las tres herramientas bioinformáticas descritas en materiales y métodos (**Tabla 6**). Las variantes seleccionadas fueron: c.193G>A; p.(G65R) en el exón 3, c.731C>T; p.(S244L), c.781G>A; p.(G261R) y c.800A>C; p.(E267A) en el exón 7, c.1384G>A; p.(G462S), c.1511T>A; p.(M504K), c.1516G>A; p.(G506R), c.1517G>A; p.(G506E) y c.1534G>C; p.(G512R) en el exón 9, c.1535G>A; p.(G512D), c.1537G>A; p.(G513R) y c.1639T>C; p.(W547R) en el exón 10. El análisis de estas variantes con herramientas bioinformáticas *SIFT*, *PolyPhen2* y *MutPred2* predicen sustituciones de aminoácidos que afectan la función de la proteína CLC-5 (**Tabla 6**). Según VarSome, estos cambios probablemente sean patogénicos, excepto p.(G65R), que se clasificó de significado incierto. Las predicciones a nivel de ARNm para estas variantes incluyeron la generación de nuevos sitios de *splicing* donadores o aceptores, la inactivación de un sitio de *splicing* y la generación o inactivación de sitios ESS o ESE (**Tabla 6**).

Las mutaciones de *splicing* han sido divididas en cinco categorías: Tipo I, mutaciones clásicas en el sitio de *splicing* que conducen a la omisión de exón; tipo II, aquellos cambios intrónicos de un solo nucleótido que crean sitios de empalme *de novo* y conducen a la inclusión de un exón críptico; tipo III, aquellos cambios exónicos de un solo nucleótido que crean sitios de empalme *de novo* cuyo uso resulta en la pérdida de una parte del exón; tipo IV, aquellas mutaciones que interrumpen el uso del sitio de empalme y dan como resultado

la activación de sitios de empalme crípticos exónicos o intrónicos; y tipo V, alteraciones de la secuencia exónica que provocan omisión de exones. Las mutaciones exónicas que afectan el proceso de corte y empalme son por tanto las de tipo III y V (Wimmer *et al.*, 2007) y pueden bien introducir un nuevo sitio de corte y empalme 5' o 3' o activar un sitio críptico, lo que causaría la pérdida de un fragmento del exón, o bien causar la pérdida de un sitio *ESE*, lo que causaría, a su vez, la pérdida de un exón completo (Anna & Monika, 2018).

En nuestro estudio utilizamos el sistema de minigenes que hemos empleado con éxito en trabajos anteriores para analizar funcionalmente las 12 mutaciones seleccionadas a partir de nuestro análisis computacional previo (González-Paredes 2014, 2016; Suárez-Artiles, 2018; Perdomo-Ramírez 2019 a, b).

Las mutaciones exónicas en el gen *CLCN5* c.1535G>A (Tosetto *et al.*, 2009) y c.1537G>A (Hoopes *et al.*, 2004), ubicadas cerca del extremo 5' del exón 10 (posiciones +1 y +3, respectivamente), no producen un cambio en la puntuación del sitio aceptor de corte y empalme según la herramienta *NNsplice*, sin embargo, encontramos que ambas mutaciones generan diferentes motivos ESS superpuestos. Esos sitios *ESS* funcionarían interactuando con proteínas represoras del proceso de corte y empalme, las proteínas de la familia heterogénea de ribonucleoproteínas nucleares (hnRNP) (como la hnRNPA1) (Pozzoli & Sironi 2005). Estas ribonucleoproteínas contienen dominios de unión a ARN, para unirse al pre-ARNm naciente y a un dominio inhibidor involucrado en las interacciones proteína-proteína. Se ha propuesto que las hnRNP cubren una región en el exón y compiten con los potenciadores del corte y empalme que bloquean su unión (Caceres & Kornbliht 2002; Pozzoli & Sironi 2005). Sugerimos que la unión de los represores a los sitios ESS generados por las mutaciones c.1535G>A y c.1537G>A podría impedir el reconocimiento de la maquinaria de empalme en el sitio aceptor canónico induciendo la eliminación del exón 10.

En el caso de la mutación c.1641G> T, ubicada a 107 nucleótidos del extremo 5' del exón 10, también observamos que se generan varios motivos ESS superpuestos, pero esto resulta en la omisión no solo del exón 10 sino también del exón 11. Hemos demostrado en ensayos previos, usando ARN de los linfocitos de un paciente, que la mutación c.1639T>G, que se encuentra en el mismo codón que c.1641G>T, aumenta la expresión de la isoforma de ARNm que carece de los exones 10 y 11 (Ramos-Trujillo 2007). Esta mutación c.1639T>G también genera varios sitios ESS superpuestos en la misma región (**Figura 16**). Tosetto y colaboradores han identificado previamente una mutación diferente, pero en el mismo nucleótido, la c.1639T>C, en otro paciente con la ED1 (Tosetto *et al.*, 2009). Sorprendentemente, esta mutación no genera sitios ESS y no altera el empalme del pre-ARNm. A partir de

estos resultados, llegamos a la conclusión de que la unión de los represores a las ESS en esta región podría desplazar las proteínas reguladoras positivas u otros factores específicos, lo que provocaría la omisión de los exones 10 y 11. Esto, sumado al pequeño tamaño del intrón 10 (155 pb), podría disminuir la inclusión del exón 10 en el ARNm maduro, y la pérdida subsecuente de sitios reguladores en *cis* dentro de este exón podrían incapacitar a la maquinaria de *splicing* para el reconocimiento del exón 11 a través del intrón (Fox-Walsh et al., 2005), resultando en la pérdida de los dos exones. Sería de interés realizar más estudios orientados a comprender el mecanismo subyacente a este fenómeno. Los resultados de nuestros estudios mostraron que los minigenes que contienen las mutaciones c.1535G>A; p.(G512D), c.1537G>A; p.(G513R) y c.1641G>T; p.(W547C) producen dos transcritos diferentes del alelo mutado, uno con el tamaño correspondiente que contiene los exones 10 y 11, y otro que es más corto y carece del exón 10. Este resultado es comúnmente observado en mutaciones exónicas que afectan el procesamiento del pre-ARNm (Nisiim-Rafinia & Kerem 2002). Por lo tanto, sugerimos que estas variantes actúan a nivel tanto de proteína como de ARN, causando tanto la alteración del pre-ARNm como el correspondiente cambio de aminoácidos. La misma suposición se aplicaría a la mutación c.1639T>G previamente estudiada; p.(W547G) (Ramos-Trujillo et al., 2007). La expresión de proteínas y los estudios electrofisiológicos han demostrado que esta mutación produce una expresión superficial reducida de la proteína mutante CIC-5 y corrientes drásticamente reducidas en la membrana plasmática (Grand et al., 2011). Todos estos resultados ejemplifican cómo diferentes mecanismos moleculares contribuyen a establecer la patogenicidad de una mutación.

La ausencia del exón 10 en el ARNm como resultado de las mutaciones c.1535G>A y c.1537G>A conduciría a una unión aberrante de los exones 9 y 11 sin cambio en la ORF. Si se expresara la proteína CIC-5 mutante, carecería de 133 aminoácidos (residuos de aminoácidos 512 a 645), los cuales incluyen parte de las  $\alpha$ -hélices O, P, Q y R, y el dominio CBS1 (Dutzler et al., 2002). Por otro lado, la omisión de los exones 10 y 11 inducida por la mutación c.1641G>T daría como resultado la unión de los exones 9 y 12 con alteración del ORF y la generación de un codón de parada de 13 aminoácidos corriente abajo (la nueva secuencia sería: Gly-Asp-Cys-Leu-Glu-Ser-Leu-Pro-Lys-Arg-Met-Cys-STOP). La proteína CIC-5 mutante, si se expresara, carecería de los últimos 230 aminoácidos, incluida parte de las  $\alpha$ -hélice O, P, Q y R, y los dominios CBS1 y CBS2 ubicados en el extremo carboxi-citoplasmático de la proteína CIC-5.

Utilizando herramientas bioinformáticas y el análisis funcional con un sistema de minigenes, hemos descrito las alteraciones de tres presuntas variantes sin sentido de *CLCN5* en el proceso de *splicing* del pre-ARNm. Dos de estas variantes, cercanas al extremo 5' del exón 10,

generan sitios ESS superpuestos que podrían impedir el reconocimiento del sitio de empalme aceptor, provocando la omisión del exón 10. Los resultados de nuestro estudio también mostraron que una presunta variante sin sentido de *CLCN5* ubicada en el exón 10 a más de cien nucleótidos de un sitio de empalme da como resultado la omisión de los exones 10 y 11, probablemente a través de la generación de motivos ESS. Nuestros resultados resaltan la importancia de realizar estudios funcionales para caracterizar el efecto de las mutaciones en el proceso de *splicing* del pre-ARNm, y muestran que la alteración de este proceso contribuye a la patogenicidad de una variante en ED1. La caracterización de los efectos de las variantes sobre el proceso de corte y empalme del pre-ARNm será de gran utilidad para el diagnóstico de la enfermedad y para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

## 2. CARACTERIZACIÓN DE MODELOS CELULARES Y TRATAMIENTO CON CHAPERONAS QUÍMICAS

En este trabajo hemos seleccionado variantes previamente descritas en pacientes con la ED1 (Ramos-Trujillo *et al.*, 2007 y 2013) con el fin de generar modelos celulares que nos permitan ensayar moléculas con potencial terapéutico. Las mutaciones seleccionadas fueron tres variantes de cambio de sentido, p.(G65R), p.(G462S) y p.(G466D), y una delección, p.(V523del). Las tres mutaciones de cambio de sentido afectan a residuos de glicina localizados en secuencias GXXXG de empaquetamiento de hélices  $\alpha$  de dominios de transmembrana (Russ & Engelman, 2000), por lo que probablemente alteran el plegamiento de las proteínas CLC-5 mutantes con la subsecuente pérdida de estabilidad y su retención en el RE. La mutación p.(V523del) ha sido identificada anteriormente en varios pacientes no relacionados entre sí de distintas partes del mundo, lo que podría significar que se trata de una mutación de punto caliente (Wu *et al.*, 2009; Ramos-Trujillo *et al.*, 2013; Sekine *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2014; Hureaux *et al.*, 2019), y da lugar a la pérdida de tres nucleótidos (TGT) en el exón 10 de *CLCN5*. Estudios previos de co-localización llevados a cabo en nuestro laboratorio expresando de manera transitoria proteínas CLC-5 portadoras de estas mutaciones mostraron que todas ellas quedan retenidas en el RE, en mayor o menor grado, están ausentes de la membrana plasmática y son degradadas por diferentes vías, como la respuesta a proteína mal plegada (Unfolded Protein Response o UPS) o las vías proteosomal, lisosomal o autofagosomal (D'Antonio *et al.*, 2013), por lo que las consideramos mutaciones de clase 1 (Lourdel *et al.*, 2011).

En enfermedades causadas por mal plegamiento de las proteínas, las chaperonas de bajo peso molecular estabilizan la proteína diana permitiéndole salir del RE y ser transportada a través del Golgi hasta su destino final. En función del grado de especificidad en su modo de acción y su capacidad para unirse a la proteína diana, las chaperonas se clasifican en químicas y farmacológicas (Cortez & Sim, 2014). Estas moléculas de pequeño tamaño resultan por tanto de gran interés para el potencial tratamiento de canalopatías asociadas con proteínas mal plegadas o inestables, como es el caso de la fibrosis quística (Zeitlin *et al.*, 2002).

En este estudio seleccionamos dos chaperonas químicas, 4-PBA y TUDCA, ya aprobadas para su uso en humanos por la FDA (US Food and Drug Administration) y por la EMA (European Medicines Agency), y comprobamos su efecto en los niveles de expresión y la localización subcelular de las proteínas CLC-5 mutantes. Seleccionamos estas moléculas buscando seguir una estrategia de reposicionamiento de fármacos que permita acelerar, en caso de resultados favorables, el desarrollo del proceso de aplicación clínica en pacientes con ED (Pushpakom *et al.*, 2019).

Para crear nuestros modelos, generamos una construcción plasmídica pEGFP-CIC5 salvaje (WT) y con diferentes mutaciones que fueron incluidas mediante mutagénesis dirigida, y las introdujimos en la línea celular de riñón embrionario humano HEK293, la cual es comúnmente utilizada en experimentos *in vitro* para la determinación de la localización y funcionamiento de la proteína CIC-5 (Smith *et al.*, 2010; Gorvin *et al.*, 2013; Alekov *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2020). Los clones capaces de expresar de manera estable en el tiempo la proteína de fusión correspondiente fueron seleccionados usando el antibiótico G418, y caracterizamos y cuantificamos dicha expresión mediante citometría de flujo y microscopia confocal.

Nuestros resultados mostraron que la proteína de fusión CIC5-EGFP WT y mutantes (**Figura 37**) presentaban diferencias en el tamaño, posición del núcleo y la distribución de CIC-5, lo que valida estas líneas celulares como modelo para el estudio de la ED1 y el ensayo de fármacos.

La variante p.(G65R) afecta a la  $\alpha$ -hélice B, necesaria para la formación de la interfase de los monómeros y del poro (Wu *et al.*, 2003; Mansour-Hendili *et al.*, 2015), mientras que las mutaciones p.(G462S) y p.(G466D) se localizan en la  $\alpha$ -hélice N, involucrada en la selectividad del filtro de Cl<sup>-</sup> (Pusch *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2003; Grand *et al.*, 2009; Mansour-Hendili *et al.*, 2015). Mediante estudios de electrofisiología se ha observado que alteraciones en otras glicinas, p.(G462V) (Ludwing *et al.*, 2005) y p.(G470R) (Mansour-Hendili *et al.*, 2015) afectan la estabilidad de la hélice impidiendo el plegamiento apropiado de los monómeros y causando una rápida degradación de CIC-5 (Lourdel *et al.*, 2012). Esto explicaría los menores niveles de expresión observados de estas proteínas mutantes en microscopía confocal y en citometría de flujo. La variante p.(V523del) genera la delección de un residuo de valina altamente conservado localizado en la hélice P de CIC-5, y necesario para la unión de los monómeros y formación del poro (Wu *et al.*, 2003 y 2009). Se ha determinado por estudios de electrofisiología que dicha mutación causa la pérdida de la conductividad de la proteína (Wu *et al.*, 2009). Mediante estudios de co-localización en células epiteliales del túbulo proximal renal (RPTEC/TERT1) se observó que una parte de la proteína CIC-5 con esta mutación quedaba retenida en el RE, pero el resto no aparecía en los endosomas tempranos (EE1) ni membrana plasmática, como cabría esperar (Duran *et al.*, 2021). Esto coincidiría con nuestras observaciones, donde la proteína CIC5-EGFP con la delección de la valina 523 se acumula principalmente en el interior celular, aparentemente en parte retenida en el RE, pudiendo haber el resto avanzado en su tráfico en cierto grado, pero sin llegar a su localización final.

Respecto al tratamiento con los fármacos 4-PBA y TUDCA, se seleccionaron a partir de la bibliografía y se comprobaron mediante ensayos de viabilidad celular, las dosis que pudieran tener efecto sobre el posible mal plegamiento de la proteína CIC-5 a causa de las

mutaciones, sin afectar la viabilidad celular. Seleccionamos para el TUDCA la dosis de 1 mM y para el 4-PBA la dosis de 2,5 mM, (Gupta *et al.*, 2012; Upagupta *et al.*, 2017; Momiri *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2021; Ren *et al.*, 2021).

Para la línea celular que expresa la proteína CIC-5 con la variante p.(V523del) observamos un aumento significativo de los valores de fluorescencia de CIC5-EGFP medidos por citometría de flujo y microscopía confocal al tratar con TUDCA y 4-PBA ( $p < 0,05$  y  $p < 0,001$ , respectivamente), siendo mayor la media obtenida con la segunda chaperona. Para el resto de las variantes p.(G65R), p.(G462S) y p.(G466D), no se observó un efecto a causa del tratamiento con TUDCA. En este sentido, la mejora de la síntesis y localización de la proteína CIC5-EGFP con la variante p.(V523del) y no en el resto de las variantes que afectan al aminoácido glicina podría estar explicado por el propio efecto de las mutaciones sobre CIC-5, ya que estas últimas causan una expresión significativamente menor de la proteína en las células, mientras que con p.(V523del), la cantidad de proteína expresada es significativamente mayor. Esto, junto con la observación de su localización más allá del RE, nos llevaría a replantear la clasificación de la variante p.(V523del) como de clase 1 a no clasificada o indeterminada. Las proteínas mutantes de clase 1 que afectan a las glicinas en los motivos GXXXG parecen ser retenidas en el RE en su totalidad y degradadas rápidamente, y por tanto ser más difícil revertir su defecto por efecto de las chaperonas químicas. Esto coincide con lo observado por Liu y colaboradores (Liu *et al.*, 2021), que introdujeron mutaciones de clase 1, de clase 2 y no clasificadas, es decir, mutaciones que no encajaban en la definición de las clases, en CIC-5 en HEK293T, trataron con 4-PBA y concluyeron que, para las mutaciones de clase 1 no se consigue restaurar la función de la proteína CIC-5, pero si se recupera la conductividad para el resto de mutantes (p.(G57V) y p.(R280P)). Sería de interés poder realizar estudios de electrofisiología e inmunohistoquímica en nuestro modelo celular que expresa la proteína CIC-5 con la delección de la valina 523, para determinar si la funcionalidad de la proteína es alterada por la mutación y si la restauración de su localización mediante los tratamientos consiguen restaurar la actividad de CIC-5 en la membrana, y establecer en qué orgánulos se encuentra la proteína mutante, mediante co-localización con RE, endosomas y membrana plasmática.

La diferencia en el efecto observado entre el TUDCA y el 4-PBA se podría explicar por las diferentes estructuras químicas de cada chaperona (Upagupta *et al.*, 2017) y sus mecanismos de acción (Cortez & Sim 2014; Xing *et al.*, 2023). El 4-PBA presenta una estructura con una larga cadena hidrocarbonada con un grupo aromático terminal y un extremo hidrofílico (Upagupta *et al.*, 2017), mientras que el TUDCA es un ácido biliar altamente hidrofílico (Pubchem; disponible online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>; consultado: 13 Nov 2023). Tanto el 4-PBA como el TUDCA han demostrado su eficacia en estudios *in vitro* e *in vivo* en el tratamiento de diferentes

enfermedades. En un ensayo realizado por Upagupta y colaboradores (Upagupta *et al.*, 2017) comparando la capacidad y eficacia de diferentes chaperonas químicas para reducir la formación de agregados de proteínas causantes de estrés en el RE en una línea de células epiteliales del túbulo proximal (HK-2), el 4-PBA mostró mejores resultados que el TUDCA. Sin embargo, el 4-PBA tiene el inconveniente de que para su uso terapéutico son necesarias dosis elevadas (Cortez & Sim, 2014) y que, entre los efectos secundarios comunes, se puede producir acidosis renal tubular (disponible online: <http://sideeffects.embl.de/drugs/4775/>; consultado: 13 Noviembre 2023). Por este motivo, en pacientes con afectación renal, como los de ED1, habría que valorar su uso en bajas dosis y monitorizar su impacto en la función renal. El TUDCA no presenta efectos secundarios a nivel renal. Hasta el momento se ha descrito la diarrea como efecto secundario más común en pacientes que han ingerido altas dosis de TUDCA (1000-1500 mg/diarios) para el tratamiento de la cirrosis biliar primaria (Crosignani *et al.*, 1996).

Con este trabajo hemos creado y caracterizado nuevos modelos celulares que expresan de forma estable proteínas ClC-5 mutantes para el ensayo de moléculas con potencial terapéutico, como las chaperonas químicas, y que permitirán estandarizar y sistematizar el cribado previo de moléculas para su posterior uso en modelos *in vivo*.

Además, estos modelos nos permitirán avanzar en el conocimiento de las rutas implicadas en la degradación de las proteínas mutantes, lo que permitirá identificar potenciales dianas terapéuticas y marcadores para ED1.

### 3. TRATAMIENTO DEL RATÓN KI *Clcn5V523del* CON ÁCIDO TAUROURSODEOXICÓLICO (TUDCA)

Como se ha visto en nuestros resultados, el tratamiento con las chaperonas químicas 4-PBA y TUDCA de un modelo celular que expresa la proteína de fusión CIC5-EGFP con la mutación p.(V523del), favorece la recuperación de la distribución y los niveles de expresión de la proteína mutante de forma comparable a la proteína salvaje (Lazaridis *et al.* 2001; Paumgartner & Beuers, 2004), por lo que el siguiente paso fue el ensayo de estas chaperonas en nuestro modelo animal.

El 4-PBA fue ensayado en estudios previos, mostrando reducciones significativas de los niveles de PBPM, el calcio excretado y el volumen de orina excretada (Perdomo-Ramírez, Tesis Doctoral y manuscrito en preparación). En este estudio, realizamos el ensayo con TUDCA en nuestro modelo KI *Clcn5V523del*, basándonos en ensayos previos realizados en modelos de ratón con diabetes de tipo 2 para la selección de la dosis y el tiempo de administración (Ozcan *et al.*, 2006).

Los ratones KI *Clcn5V523del* utilizados en este ensayo presentaron diuresis elevada ( $p < 0,05$ ), PBPM ( $p < 0,05$ ), hipercalciuria ( $p < 0,01$ ) e hiperfosfaturia ( $p < 0,05$ ). Como consecuencia de la inexistencia de antecedentes de uso de modelos animales de la ED1 para el ensayo de fármacos, se hizo necesario establecer valores de referencia propios en nuestro ratón KI *Clcn5V523del* que señalaran el inicio del rango patológico para los diferentes parámetros. Esto lo hicimos en base a la distribución de los datos (percentiles 25, 50 y 75) comparando ratones WT (sanos) y ratones KI (enfermos) (PBPM  $\geq 150$  ng/24h; Hipercalciuria  $\geq 0,05$  mg/24h; Hiperfosfaturia  $\geq 3$ mg/24h)

Para el parámetro de PBPM se seleccionó como marcador la  $\beta 2$ -microglobulina en la orina de 24h, ya que se considera, junto con la N-Acetyl- $\beta$ -glucosaminidasa (NAG) uno de los marcadores más fiables para la lesión tubular renal, así como uno de parámetros que más precozmente se alteran (García-Nieto *et al.*, 1990). Los valores medios de excreción urinaria de  $\beta 2$ -microglobulina en los ratones KI fueron 75 veces superiores a los ratones WT, y después del tratamiento con TUDCA durante 20 días se observó una reducción del 56%. Sin embargo, la elevada dispersión de los datos no permite observar diferencias significativas entre el grupo KI control a T20 frente al grupo KI tratado con TUDCA a T20 (**Figura 38**). Por este motivo ensayamos la medida de otra proteína de BPM, la *Clara Cell Protein* (CC16), que tiene un peso molecular de 16 kDa y se expresa en el epitelio pulmonar (Bernard & Lauwerys, 1995). La CC16 es usada, en la clínica, como marcador de PBPM y, su excreción en pacientes muestra una alta correlación con la de la  $\beta 2$ -microglobulina, ya que ambas comparten los

mismos mecanismos de filtración glomerular y reabsorción tubular (Martín-Granado *et al.*, 2009). Sin embargo, los niveles de CC16 mostraron la misma dispersión de datos que en el ensayo de la  $\beta$ 2-microglobulina (**Anexo I**). Debemos destacar por tanto como limitación de este estudio la enorme variabilidad encontrada en los datos de PBPM, usando tanto la  $\beta$ 2-microglobulina como la CC16, aunque algunos estudios han mostrado que esta situación también se da en humanos, donde la variabilidad observada es muy similar (Martín-Granado *et al.*, 2009). Por otro lado, en el modelo KO de Guggino, los datos cuantitativos de CC16 también presentaron una elevada variabilidad (Wang *et al.*, 2000), así como la proteinuria total calculada por Stechman y colaboradores en ratones de la cepa C57BL/6, en el que la desviación de los datos prácticamente alcanzó un 100% (Stechman *et al.*, 2010). Por otro lado, Stechman y colaboradores, también atribuyeron esta variabilidad en los modelos murinos a factores aleatorios como la jerarquía social de los individuos dentro de la camada, que puede llevar al ratón a sufrir agresiones y, por tanto, un mayor nivel de estrés o los cambios en el comportamiento (Sharp *et al.*, 2003; Späni *et al.*, 2003). Además, también hay que tener en cuenta otros factores de estrés en los animales, como su manejo por parte del investigador (Champy *et al.*, 2004; Van Loo *et al.*, 2004a/b).

Además de los marcadores descritos para la PBPM, analizamos el daño tubular a través de la cuantificación de NAG. El NAG es una enzima lisosomal del túbulo proximal del riñón que se excreta en la orina y que se libera como consecuencia de un daño en el túbulo proximal (García-García *et al.*, 2016; Hosohata *et al.*, 2021). En la clínica se utiliza como marcador temprano de daño renal causado por exposición a nefrotóxicos, retraso en la función del injerto renal, en la enfermedad glomerular crónica, así como la nefropatía diabética. Específicamente, en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, se ha observado un aumento de NAG incluso antes del aumento de la albuminuria, por lo que asumen que la disfunción tubular puede desarrollarse más temprano que el daño glomerular (Kim *et al.*, 2016). En este sentido, los niveles determinados en el grupo KI a T0 son similares a los observados en los ratones WT, sin embargo, este nivel se duplica a los 3 meses y 20 días en los ratones KI controles, de manera que desarrollan el daño tubular con el tiempo. Después del tratamiento con el TUDCA observamos que la excreción de NAG disminuye significativamente ( $p < 0,05$ ) en los ratones KI T20 con una reducción del 63% (**Figura 39**).

Nuestro modelo KI presentó niveles significativamente elevados ( $p < 0,05$ ) en la excreción de fosfato urinario, siendo 4 veces superior a los observados en el WT. Sin embargo, tras ser tratados con TUDCA se apreció una reducción significativa del 28% ( $p < 0,05$ ) al comparar el grupo KI tratado a T0 con respecto al T20 (**Figura 39**). No observamos diferencias entre

el grupo KI control a T20 frente al KI tratado a T20, ya que la dispersión de ambos datos es elevada, y al menor número de ratones KI en el grupo control, lo que limita la comparación de estos resultados. Los niveles de fosfato urinario excretado cuantificados en nuestros modelo KI *Clcn5V523del* son similares (**Tabla 11**) a los descritos en el modelo KO desarrollado por Guggino y colaboradores ( $3,9 \pm 1,0$ ;  $3,4 \pm 1,5$  mg/24h).

Respecto a la excreción urinaria de calcio, los ratones KI presentaron niveles 2 veces superiores con respecto a los observados para el WT ( $p < 0,01$ ). Se redujeron estos niveles en un 33% en los ratones KI tratados con TUDCA a T20 comparado con el T0 (**Figura 39**). En este caso, la diferencia observada entre el grupo KI control y tratado a T20 es cercana a la significancia ( $p = 0,06$ ), de modo que, posiblemente si aumentáramos el tamaño muestral, este dato podría ser significativo. La presencia de la hipercalciuria, así como de hiperfosfaturia en este modelo KI *Clcn5V523del* nos indica una posible relación con la alteración del metabolismo de calcio y fosfato, ya observada previamente en otros modelos *in vitro* y animales (Anglani *et al.*, 2019), cuya reabsorción parcial o total ocurre en el túbulo proximal. La desregulación de la proteína CIC-5 a causa de la delección de la valina 523 generaría un defecto en la acidificación de los endosomas tempranos primordial en el proceso de endocitosis (Clague *et al.*, 1994), dando lugar a la desregulación de los receptores megalina-cubilina (Piwon *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2003; Erdmann *et al.*, 2007) causando un defecto en la captación de la PTH. Esta hormona participa en el metabolismo del calcio controlando la reabsorción del 15% del calcio por parte de las CTP (Navarro-Moreno & Ramos, 2006; Blaine, Chonchol & Levi, 2014; Moor & Bonny, 2016); así como en la regulación del co-transportador NaPi-II-a implicado en la reabsorción del fosfato en las CTP (Hilpert *et al.*, 1999).

En este sentido, la chaperona TUDCA podría estar actuando en la recuperación del proceso de endocitosis relacionado con los receptores de megalina y cubilina, mejorando la captación de proteínas de BPM así como de la PTH, ya que a nivel celular observamos una mejora de la localización de CIC-5 con la mutación p.(V523del) tras el tratamiento con esta chaperona (resultados Bloque 2). Además, en el estudio sobre las características fenotípicas de la ED1 presentes en el ratón KI *Clcn5V523del*, se observa una disminución de la PBPM, así como de los niveles de calcio y fosfato excretados como consecuencia del TUDCA.

Para valorar la función renal se suele utilizar la TFG, que corresponde al volumen en que una sustancia es filtrada por el riñón por unidad de tiempo (Molina *et al.*, 2022). Este valor puede variar en función de la edad, sexo y masa corporal. La creatinina es el biomarcador endógeno que se suele utilizar para la estimación de la TFG porque es un compuesto de desecho generado por el organismo a partir de la degradación de la creatina, que en condiciones

normales se produce a una tasa constante desde el tejido muscular. Se trata de una molécula de pequeño tamaño (113 Da) que se filtra libremente a nivel glomerular, no es reabsorbida a nivel tubular y se excreta a través de la orina, por lo que la cantidad absoluta excretada debería ser constante entre individuos con la misma producción de creatinina y función renal estable (Huidobro *et al.*, 2018). Comúnmente, se estimaba la TFG en base a los valores de creatinina sérica, sin embargo, diversos estudios (Jabary *et al.*, 2006; Zamora *et al.*, 2007), señalan que este dato puede subestimar el funcionamiento renal, ya que los pacientes pueden presentar valores dentro de la normalidad, pero con una disminución significativa de la TFG. En este sentido, se ha demostrado que el aclaramiento de la creatinina puede ser un mejor parámetro para estimar la TFG, ya que compara sus niveles en suero y orina para medir la cantidad eliminada por los riñones por unidad de tiempo (Wallace, 1998).

Los valores obtenidos para los niveles de creatinina sérica y el aclaramiento de la creatinina en los ratones KI a T20 tanto controles como tratados, no muestran diferencias significativas en relación con la media observada en los WT, sugiriendo que la filtración de la creatinina no está alterada como consecuencia de la mutación. Este resultado concuerda con otras investigaciones realizadas en ratones KO *Clcn5*, en los cuales los niveles de aclaramiento de creatinina no se vieron alterados a los 3 meses (Wang *et al.*, 2000; Yadav *et al.*, 2022) sin embargo, si se observó un aumento de estos niveles en los ratones KO de 6 meses de edad (Cebotaru *et al.*, 2005). Que exista un aumento en el daño tubular renal determinado por el NAG y no en la función renal por el aclaramiento de la creatinina se explicaría porque el primero es un marcador temprano (García-Nieto *et al.*, 1990) que se relaciona con la disfunción tubular, mientras que el segundo, mide la función renal global (Gallo, 2001), indicándonos que la función renal general de nuestro ratón KI *Clcn5V523del* no se ve alterada por la mutación p.(V523del) a los tres y cuatros mes de edad.

Por otro lado, los niveles de orina excretados por los ratones KI fueron 1,8 veces superiores en comparación con el grupo WT, sin embargo, esta característica no se vio reducida a causa del tratamiento. Este parámetro fue observado también en los 3 modelos de ratones KO (Wang *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2007; Piwon *et al.*, 2000; Günther *et al.*, 2003; Yadav *et al.*, 2022). Respecto a los niveles de agua ingerida y al peso de los ratones WT y KI, a T0 y T20, no se observaron diferencias significativas ( $p=0,146$ ;  $p=0,120$ ; respectivamente), por lo que, en nuestro caso, los ratones KI no muestra incremento en ingesta de agua, ni variaciones en el peso a consecuencia de la mutación p.(V523del), coincidiendo con los resultados observados en los ratones KI de caracterización (Perdomo-Ramírez, Tesis Doctoral y manuscrito en preparación). Así mismo, estos síntomas suelen ser de aparición minoritaria en la ED (Luis-Yanes, García-García & García-Nieto, 2023).

El ensayo pre-clínico de medicamentos ya comercializados para el tratamiento de enfermedades diferentes a aquellas para las que fueron aprobados inicialmente (reposicionamiento de fármacos) permite avanzar hacia su aplicación rápida en pacientes, debido a que ya se conocen sus efectos secundarios, su farmacogenética y farmacodinámica, pudiendo evitar las fases I y II de los ensayos clínicos, las cuales se pueden alargar durante años. Así mismo, el reposicionamiento de fármacos tiene especial importancia en enfermedades huérfanas, donde la investigación de nuevos fármacos es limitada debido a los altos coste y una demanda específica para cada enfermedad (Sardana *et al.*, 2011). En estos casos, el uso de modelos animales ha cobrado especial relevancia, siendo un método ampliamente aplicado para determinar la efectividad del fármaco frente a enfermedades diferentes (Aggarwal *et al.*, 2022). Sin embargo, uno de los retos de la utilización de modelos animales en el reposicionamiento de fármacos es imitar la enfermedad humana en el modelo elegido (Aggarwal *et al.*, 2022). Nuestro modelo animal para la ED1 presenta la principal sintomatología observada en humanos, por lo que es una herramienta excelente para el ensayo de fármacos, ya comercializados o no, y en general cualquier nueva estrategia terapéutica.

En nuestro caso, hemos observado que el tratamiento con la dosis de TUDCA ensayada da lugar a una disminución en la excreción de  $\beta$ 2-microglobulina, calcio y fosfato en orina, así como una reducción del daño tubular (NAG) en el ratón KI *Cln5V523del*. Estos datos indican que el TUDCA podría ser un tratamiento candidato hacia la fase clínica en pacientes con ED1 y resultar efectivo en la ralentización del avance de esta enfermedad, debido a que ya se encuentra comercializado y probándose en diferentes ensayos clínicos para enfermedades neurodegenerativas (Khalaf *et al.*, 2022).





# Conclusiones

---



## CONCLUSIONES

1. Las herramientas bioinformáticas son de gran utilidad en la predicción del efecto de presuntas mutaciones de cambio de sentido sobre el proceso de *splicing* del pre-ARNm.
2. Tres de las trece mutaciones clasificadas como de cambio de sentido en el gen *CLCN5* (**c.1535G>A**, **c.1537G>A** y **c.1641G>T**) actúan como mutaciones que también afectan al *splicing*, y su efecto es más drástico que el esperado por el cambio de un aminoácido por otro.
3. Nuestros resultados resaltan la importancia de evaluar los efectos de mutaciones de cambio de sentido en el gen *CLCN5* mediante ensayos de minigenes.
4. Las proteínas de fusión CIC5-EGFP con las mutaciones p.(V523del), p.(G65R), p.(G462S) y p.(G466D) presentan alteraciones en la localización subcelular y en la expresión en comparación con la proteína CIC-5 EGFP WT.
5. Los tratamientos con 4-PBA y TUDCA en modelos celulares de la enfermedad de Dent-1 generan cambios en la localización y aumentan la expresión de la proteína CIC-5 mutante p.(V523del).
6. El desarrollo de modelos celulares de la enfermedad de Dent-1 es de gran utilidad para el ensayo pre-clínico de moléculas con potencial terapéutico de manera rápida y efectiva.
7. El tratamiento de nuestro modelo animal KI *Clcn5V523del* con el fármaco TUDCA disminuye la principal característica observada en la enfermedad de Dent-1, la PBPM, así como la hiperfosfaturia e hipercalciuria, por lo que podría ser una potencial estrategia terapéutica para los pacientes con ED1 causada por proteína CIC-5 retenida en RE.





# Bibliografía

---



- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S., & Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, 7(4), 248-249. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>
- Aguirre-Meñica M, & Luis-Yanes MI. (2014). Tubulopatías. *Protoc diagn ter pediatr*, 135-153.
- Aggarwal, M., Mehta, T.A., Das, A., Das, A., Shruthi, N.R., Pathak, S. (2022). Repurposing of Drug: Utility of Animal Models. In: Pathak, S., Banerjee, A., Bisgin, A. (eds) Handbook of Animal Models and its Uses in Cancer Research. *Springer*, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-1282-5\\_8-1](https://doi.org/10.1007/978-981-19-1282-5_8-1)
- Alekov, A. K. (2015). Mutations associated with Dent's disease affect gating and voltage dependence of the human anion/proton exchanger ClC-5. *Frontiers in Physiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00159>
- Amaral, J. D., Viana, R. J. S., Ramalho, R. M., Steer, C. J., & Rodrigues, C. M. P. (2009). Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. *Journal of Lipid Research*, 50(9), 1721-1734. <https://doi.org/10.1194/jlr.R900011-JLR200>
- Anglani, F., D'Angelo, A., Bertizzolo, L. M., Tosetto, E., Ceol, M., Cremasco, D., Bonfante, L., Addis, M. A., Del Prete, D., & Dent Disease Italian Network. (2015). Nephrolithiasis, kidney failure and bone disorders in Dent disease patients with and without *CLCN5* mutations. *SpringerPlus*, 4, 492. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1294-y>
- Anglani, F., Giancesello, L., Beara-Lasic, L., & Lieske, J. (2019). Dent disease: A window into calcium and phosphate transport. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(11), 7132-7142. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14590>
- Anna, A., & Monika, G. (2018). Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *Journal of Applied Genetics* 59 (3), 253-268. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s13353-018-0444-7>
- Antón-Gamero, M., Claverie-Martín, F., García-Nieto, V., Vela-Enríquez, F., García-Martínez, E., & Pérez-Navero, J. L. (2005). Chloride and sodium renal tubular handling in Dent's disease. *Pediatric Nephrology*, 20(8), 1198-1199. <https://doi.org/10.1007/s00467-005-1875-z>
- Arnold, S., Buchanan, D. D., Barker, M., Jaskowski, L., Walsh, M. D., Birney, G., Woods, M. O., Hopper, J. L., Jenkins, M. A., Brown, M. A., Tavtigian, S. V., Goldgar, D. E.,

- Young, J. P., & Spurdle, A. B. (2009). Classifying MLH1 and MSH2 variants using bioinformatic prediction, splicing assays, segregation, and tumor characteristics. *Human Mutation*, *30*(5), 757-770. <https://doi.org/10.1002/humu.20936>
- Arnous, M. G., Arroyo, J., Cogal, A. G., Anglani, F., Kang, H. G., Sas, D., Harris, P. C., & Lieske, J. C. (2023). The Site and Type of *CLCN5* Genetic Variation Impact the Resulting Dent Disease-1 Phenotype. *Kidney International Reports*, *8*(6), 1220-1230. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2023.03.012>
- Auclair, J., Busine, M. P., Navarro, C., Ruano, E., Montmain, G., Desseigne, F., Saurin, J. C., Lasset, C., Bonadona, V., Giraud, S., Puisieux, A., & Wang, Q. (2006). Systematic mRNA analysis for the effect of MLH1 and MSH2 missense and silent mutations on aberrant splicing. *Human Mutation*, *27*(2), 145-154. <https://doi.org/10.1002/humu.20280>
- Aymé, S., Bockenhauer, D., Day, S., Devuyt, O., Guay-Woodford, L. M., Ingelfinger, J. R., Klein, J. B., Knoers, N. V. A. M., Perrone, R. D., Roberts, J., Schaefer, F., Torres, V. E., Cheung, M., Wheeler, D. C., Winkelmayr, W. C., Angelis, A., Antignac, C., Bae, K., Bergmann, C., ... Yap, H.-K. (2017). Common Elements in Rare Kidney Diseases: Conclusions from a kidney disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney International*, *92*(4), 796-808. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.06.018>
- Baldovino, S., Moliner, A. M., Taruscio, D., Daina, E., & Roccatoello, D. (2016). Rare Diseases in Europe: from a Wide to a Local Perspective. *The Israel Medical Association journal*, *18*(6), 359-363.
- Bao, Y., Suo, L., Qian, P., Huang, H., Yang, Y., Tang, J., Zhang, M., Li, Z., Wang, Y., Liang, N., & Wang, Y. (2019). Clinical and genetic analysis of Dent disease with nephrotic range albuminuria in Shaanxi, China. *Science China. Life sciences*, *62*(12), 1590-1593. <https://doi.org/10.1007/s11427-018-9829-0>
- Baralle, D. (2005). Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *Journal of Medical Genetics*, *42*(10), 737-748. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.029538>
- Berget, S. M., Moore, C., & Sharp, P. A. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *74*(8), 3171-3175. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.8.3171>
- Bernard, A., & Lauwerys, R. (1995). Low-molecular-weight proteins as markers of organ toxicity with special reference to Clara cell protein. *Toxicology Letters*, *77*(1-3), 145-151.

[https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03284-3](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03284-3)

- Blaine, J., Chonchol, M., & Levi, M. (2015). Renal Control of Calcium, Phosphate, and Magnesium Homeostasis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(7), 1257-1272. <https://doi.org/10.2215/CJN.09750913>
- Blanchard, A., Curis, E., Guyon-Roger, T., Kahila, D., Treard, C., Baudouin, V., Bérard, E., Champion, G., Cochat, P., Dubourg, J., de la Faille, R., Devuyst, O., Deschenes, G., Fischbach, M., Harambat, J., Houillier, P., Karras, A., Knebelmann, B., Lavocat, M.-P., ... Vargas-Poussou, R. (2016). Observations of a large Dent disease cohort. *Kidney International*, 90(2), 430-439. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.04.022>
- Blanchard, A., Vargas-Poussou, R., Peyrard, S., Mogenet, A., Baudouin, V., Boudailliez, B., Charbit, M., Deschesnes, G., Ezzhair, N., Loirat, C., Macher, M.-A., Niaudet, P., & Azizi, M. (2008). Effect of Hydrochlorothiazide on Urinary Calcium Excretion in Dent Disease: An Uncontrolled Trial. *American Journal of Kidney Diseases*, 52(6), 1084-1095. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2008.08.021>
- Blázquez Gómez, C. J., Gil-Peña, H., Ordóñez Álvarez, F. A., & Santos Rodríguez, F. (2021). Evolución de tubulopatías renales primarias diagnosticadas en edad pediátrica. *Nefrología*, 41(2), 182-190. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2020.07.015>
- Böckenhauer, D., Bökenkamp, A., Nuutinen, M., Unwin, R., van't Hoff, W., Sirimanna, T., Vrljicak, K., & Ludwig, M. (2015). Novel OCRL mutations in patients with Dent-2 disease. *Journal of Pediatric Genetics*, 01(01), 015-023. <https://doi.org/10.3233/PGE-2012-005>
- Bökenkamp, A., Böckenhauer, D., Cheong, H. Il, Hoppe, B., Tasic, V., Unwin, R., & Ludwig, M. (2009). Dent-2 Disease: A Mild Variant of Lowe Syndrome. *The Journal of Pediatrics*, 155(1), 94-99. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.01.049>
- Brett, C. L., Donowitz, M., & Rao, R. (2005). Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 288(2), C223-C239. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00360.2004>
- Cáceres, J. F., & Kornblihtt, A. R. (2002). Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends in Genetics*, 18(4), 186-193. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02626-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02626-9)
- Campos, B., Díez, O., Domènech, M., Baena, M., Balmaña, J., Sanz, J., Ramírez, A., Alonso, C., & Baiget, M. (2003). RNA analysis of eight *BRCA1* and *BRCA2* unclassified vari-

- ants identified in breast/ovarian cancer families from Spain. *Human Mutation*, 22(4), 337-337. <https://doi.org/10.1002/humu.9176>
- Carballo-Trujillo, I., Garcia-Nieto, V., Moya-Angeler, F. J., Anton-Gamero, M., Loris, C., Mendez-Alvarez, S., & Claverie-Martin, F. (2003). Novel truncating mutations in the CLC-5 chloride channel gene in patients with Dent's disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 18(4), 717-723. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfg016>
- Carlisle, R. E., Brimble, E., Werner, K. E., Cruz, G. L., Ask, K., Ingram, A. J., & Dickhout, J. G. (2014). 4-Phenylbutyrate Inhibits Tunicamycin-Induced Acute Kidney Injury via CHOP/GADD153 Repression. *PLoS ONE*, 9(1), e84663. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084663>
- Cartegni, L., Chew, S. L., & Krainer, A. R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews Genetics*, 3(4), 285-298. <https://doi.org/10.1038/nrg775>
- Cebotaru, V., Kaul, S., Devuyst, O., Cai, H., Racusen, L., B Guggino, W., & E Guggino, S. (2005). High citrate diet delays progression of renal insufficiency in the CLC-5 knockout mouse model of Dent's disease. *Kidney International*, 68(2), 642-652. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00442.x>
- Ceol, M., Giancesello, L., Tosetto, E., Priante, G., Del Prete, D., & Anglani, F. (2020). *CLCN5* 5'Utr Isoforms in Human Kidneys: Differential Expression Analysis between Controls and Patients with Glomerulonephritis. *Journal of Investigative Medicine*, 68(4), 864-869. <https://doi.org/10.1136/jim-2019-001205>
- Champy, M., Selloum, M., Piard, L., Zeitler, V., Caradec, C., Chambon, P., & Auwerx, J. (2004). Mouse functional genomics requires standardization of mouse handling and housing conditions. *Mammalian Genome*, 15(10), 768-783. <https://doi.org/10.1007/s00335-004-2393-1>
- Chiang, C.-K., Hsu, S.-P., Wu, C.-T., Huang, J.-W., Cheng, H.-T., Chang, Y.-W., Hung, K.-Y., Wu, K.-D., & Liu, S.-H. (2011). Endoplasmic Reticulum Stress Implicated in the Development of Renal Fibrosis. *Molecular Medicine*, 17(11-12), 1295-1305. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00131>
- Cho, H. Y., Lee, B. H., Choi, H. J., Ha, I. S., Choi, Y., & Cheong, H. Il. (2008). Renal manifestations of Dent disease and Lowe syndrome. *Pediatric Nephrology*, 23(2), 243-249. <https://doi.org/10.1007/s00467-007-0686-9>

- Christensen, E. I., & Birn, H. (2002). Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(4), 258-267. <https://doi.org/10.1038/nrm778>
- Clague, M. J., Urbé, S., Aniento, F., & Gruenberg, J. (1994). acular ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *The Journal of biological chemistry*, 269(1), 21-24.
- Claverie-Martín, F., & García-Nieto Victor. (2006). Enfermedad de Dent. En V. Garcia-Nieto, F. Santos, & B. Rodriguez-Iturbe (Eds.), *Nefrología Pediátrica* (2nd ed., pp. 135-149). Ed. Grupo Aula Médica.
- Claverie-Martin, F., Gonzalez-Paredes, F. J., & Ramos-Trujillo, E. (2015). Splicing defects caused by exonic mutations in *PKD1* as a new mechanism of pathogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *RNA Biology*, 12(4), 369-374. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1014291>
- Claverie-Martín, F., Ramos-Trujillo, E., & García-Nieto, V. (2011). Dent's disease: Clinical features and molecular basis. *Pediatric Nephrology*, 26(5), 693-704. <https://doi.org/10.1007/s00467-010-1657-0>
- Collins, A. F., Pearson, H. A., Giardina, P., McDonagh, K. T., Brusilow, S. W., & Dover, G. J. (1995). Oral sodium phenylbutyrate therapy in homozygous beta thalassemia: a clinical trial. *Blood*, 85(1), 43-49.
- Copelovitch, L., Nash, M. A., & Kaplan, B. S. (2007). Hypothesis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2(5), 914-918. <https://doi.org/10.2215/CJN.00900207>
- Cortez, L., & Sim, V. (2014). The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases. *Prion*, 8(2), 197-202. <https://doi.org/10.4161/pri.28938>
- Cox, J. P. D., Yamamoto, K., Christie, P. T., Wooding, C., Feest, T., Flinter, F. A., Goodyer, P. R., Leumann, E., Neuhaus, T., Reid, C., Williams, P. F., Wrong, O., & Thakker, R. V. (1999). Renal Chloride Channel, *CLCN5*, Mutations in Dent's Disease. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(9), 1536-1542. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.9.1536>
- Crosignani, A., Battezzati, P. M., Setchell, K. D., Invernizzi, P., Covini, G., Zuin, M., & Podda, M. (1996). Tauroursodeoxycholic acid for treatment of primary biliary cirrhosis. A dose-response study. *Digestive diseases and sciences*, 41(4), 809-815. <https://doi.org/10.1007/BF02213140>
- D'Antonio, C., Molinski, S., Ahmadi, S., Huan, L.-J., Wellhauser, L., & Bear, C. E. (2013). Con-

- formational defects underlie proteasomal degradation of Dent's disease-causing mutants of CLC-5. *Biochemical Journal*, 452(3), 391-400. <https://doi.org/10.1042/BJ20121848>
- De Conti, L., Baralle, M., & Buratti, E. (2013). Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *WIREs RNA*, 4(1), 49-60. <https://doi.org/10.1002/wrna.1140>
- Dehainault, C., Michaux, D., Pagès-Berhouet, S., Caux-Moncoutier, V., Doz, F., Desjardins, L., Couturier, J., Parent, P., Stoppa-Lyonnet, D., Gauthier-Villars, M., & Houdayer, C. (2007). A deep intronic mutation in the RB1 gene leads to intronic sequence exonisation. *European Journal of Human Genetics*, 15(4), 473-477. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201787>
- Deng, H., Zhang, Y., Xiao, H., Yao, Y., Zhang, H., Liu, X., Su, B., Guan, N., Zhong, X., Wang, S., Ding, J., & Wang, F. (2020). Phenotypic spectrum and antialbuminuric response to angiotensin converting enzyme inhibitor and angiotensin receptor blocker therapy in pediatric Dent disease. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 8(8). <https://doi.org/10.1002/mgg3.1306>
- Dent, C. E., & Friedman, M. (1964). Hypercalcuric Rickets Associated with Renal Tubular Damage. *Archives of Disease in Childhood*, 39(205), 240-249. <https://doi.org/10.1136/adc.39.205.240>
- Desmet, F.-O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Bérout, G., Claustres, M., & Bérout, C. (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Research*, 37(9), e67-e67. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp215>
- Devuyst, O. (1999). Intra-renal and subcellular distribution of the human chloride channel, CLC-5, reveals a pathophysiological basis for Dent's disease. *Human Molecular Genetics*, 8(2), 247-257. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.2.247>
- Devuyst, O., Jouret, F., Auzanneau, C., & Courtoy, P. J. (2005). Chloride Channels and Endocytosis: New Insights from Dent's Disease and CLC-5 Knockout Mice. *Nephron Physiology*, 99(3), p69-p73. <https://doi.org/10.1159/000083210>
- Devuyst, O., & Pirson, Y. (2007). Genetics of hypercalciuric stone forming diseases. *Kidney International*, 72(9), 1065-1072. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002441>
- Devuyst, O., & Thakker, R. V. (2010). Dent's disease. En *Orphanet Journal of Rare Diseases* (Vol. 5, Número 1). <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-28>

- Doke, S. K., & Dhawale, S. C. (2015). Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3), 223-229. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.002>
- Drögemüller, C., Reichart, U., Seuberlich, T., Oevermann, A., Baumgartner, M., Kühni Boghenbor, K., Stoffel, M. H., Syring, C., Meylan, M., Müller, S., Müller, M., Gredler, B., Sölkner, J., & Leeb, T. (2011). An Unusual Splice Defect in the Mitofusin 2 Gene (MFN2) Is Associated with Degenerative Axonopathy in Tyrolean Grey Cattle. *PLoS ONE*, 6(4), e18931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018931>
- D'Souza, I., Poorkaj, P., Hong, M., Nochlin, D., Lee, V. M.-Y., Bird, T. D., & Schellenberg, G. D. (1999). Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), 5598-5603. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5598>
- Durán, M., Burballa, C., Cantero-Recasens, G., Butnaru, C. M., Malhotra, V., Ariceta, G., Sarró, E., & Meseguer, A. (2021). Novel Dent disease 1 cellular models reveal biological processes underlying CLC-5 loss-of-function. *Human Molecular Genetics*, 30(15), 1413-1428. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab131>
- Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (2002). X-ray structure of a CLC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature*, 415(6869), 287-294. <https://doi.org/10.1038/415287a>
- Edvardsson, V. O., Goldfarb, D. S., Lieske, J. C., Beara-Lasic, L., Anglani, F., Milliner, D. S., & Palsson, R. (2013). Hereditary causes of kidney stones and chronic kidney disease. *Pediatric Nephrology*, 28(10), 1923-1942. <https://doi.org/10.1007/s00467-012-2329-z>
- Elia, A. E., Lalli, S., Monsurrò, M. R., Sagnelli, A., Taiello, A. C., Reggiori, B., La Bella, V., Tedeschi, G., & Albanese, A. (2016). Tauroursodeoxycholic acid in the treatment of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neurology*, 23(1), 45-52. <https://doi.org/10.1111/ene.12664>
- Engin, F., & Hotamisligil, G. S. (2010). Restoring endoplasmic reticulum function by chemical chaperones: an emerging therapeutic approach for metabolic diseases. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 12(s2), 108-115. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01282.x>
- Enia, G., Zoccali, C., Bolino, A., & Romeo, G. (1992). New X-linked hypophosphatemic rickets with hypercalciuria leading to progressive renal failure. *Nephrol Dial Transplant*, 7, 757-758.

- Erdmann, K. S., Mao, Y., McCrea, H. J., Zoncu, R., Lee, S., Paradise, S., Modregger, J., Biemesderfer, D., Toomre, D., & De Camilli, P. (2007). A Role of the Lowe Syndrome Protein OCRL in Early Steps of the Endocytic Pathway. *Developmental Cell*, 13(3), 377-390. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.08.004>
- Fackenthal, J. D., Cartegni, L., Krainer, A. R., & Olopade, O. I. (2002). BRCA2 T2722R Is a Deleterious Allele That Causes Exon Skipping. *The American Journal of Human Genetics*, 71(3), 625-631. <https://doi.org/10.1086/342192>
- Fervenza, F. C. (2013). A Patient with Nephrotic-Range Proteinuria and Focal Global Glomerulosclerosis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 8(11), 1979-1987. <https://doi.org/10.2215/CJN.03400313>
- Fisher, S. E., Black, G. C., Lloyd, S. E., Hatchwell, E., Wrong, O., Thakker, R. V., & Craig, I. W. (1994). Isolation and partial characterization of a chloride channel gene which is expressed in kidney and is a candidate for Dent's disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis). *Human molecular genetics*, 3(11), 2053-2059.
- FISHER, S. E., VANBAKEL, I., LLOYD, S. E., PEARCE, S. H. S., THAKKER, R. V., & CRAIG, I. W. (1995). Cloning and Characterization of *CLCN5*, the Human Kidney Chloride Channel Gene Implicated in Dent Disease (an X-Linked Hereditary Nephrolithiasis). *Genomics*, 29(3), 598-606. <https://doi.org/10.1006/geno.1995.9960>
- Forino, M., Graziotto, R., Tosetto, E., Gambaro, G., D'Angelo, A., & Anglani, F. (2004). Identification of a novel splice site mutation of *CLCN5* gene and characterization of a new alternative 5' UTR end of *CLC-5* mRNA in human renal tissue and leukocytes. *Journal of Human Genetics*, 49(1), 53-60. <https://doi.org/10.1007/s10038-003-0108-1>
- Fox-Walsh, K. L., Dou, Y., Lam, B. J., Hung, S., Baldi, P. F., & Hertel, K. J. (2005). The architecture of pre-mRNAs affects mechanisms of splice-site pairing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(45), 16176-16181. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508489102>
- Frishberg, Y., Dinour, D., Belostotsky, R., Becker-Cohen, R., Rinat, C., Feinstein, S., Navon-Elkan, P., & Ben-Shalom, E. (2009). Dent's disease manifesting as focal glomerulosclerosis: Is it the tip of the iceberg? *Pediatric Nephrology*, 24(12), 2369-2373. <https://doi.org/10.1007/s00467-009-1299-2>
- Frymoyer, P. A., Scheinman, S. J., Dunham, P. B., Jones, D. B., Hueber, P., & Schroeder, E. T. (1991). X-linked recessive nephrolithiasis with renal failure. *The New England journal*

- of medicine*, 325(10), 681-686. <https://doi.org/10.1056/NEJM199109053251003>
- Fujimoto, L. M., Roth, R., Heuser, J. E., & Schmid, S. L. (2000). Actin Assembly Plays a Variable, but not Obligatory Role in Receptor-Mediated Endocytosis. *Traffic*, 1(2), 161-171. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2000.010208.x>
- Gallo, J. L. (2001). Actividad urinaria del N-acetil-beta-glucosaminidasa (NAG) durante la gestación normal. *Prog Obstet Ginecol*, 44, 69-74.
- García-Nieto, V., Muros, M., León, C., Duque, J., Oliva, C., Duque, R., & Ortigosa, L. (1990). Estudio de la eliminación urinaria de N-acetil-glucosaminidasa y B2-microglobulina en la infancia. Trastorno de su excreción en la diabetes mellitus y en patología renal. *Nefrología*, X(4), 393-399.
- Geuens, T., Bouhy, D., & Timmerman, V. (2016). The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Human Genetics*, 135(8), 851-867. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1683-5>
- Gianesello, L., Ceol, M., Bertoldi, L., Terrin, L., Priante, G., Murer, L., Peruzzi, L., Giordano, M., Paglialonga, F., Cantaluppi, V., Musetti, C., Valle, G., Del Prete, D., & Anglani, F. (2020). Genetic analyses in dent disease and characterization of *CLCN5* mutations in kidney biopsies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2). <https://doi.org/10.3390/ijms21020516>
- Gianesello, L., Del Prete, D., Anglani, F., & Calò, L. A. (2021). Genetics and phenotypic heterogeneity of Dent disease: the dark side of the moon. *Human Genetics*, 140(3), 401-421. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02219-2>
- Gianesello, L., Del Prete, D., Ceol, M., Priante, G., Calò, L. A., & Anglani, F. (2020). From protein uptake to Dent disease: An overview of the *CLCN5* gene. *Gene*, 747, 144662. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144662>
- Girgis, C. M., Clifton-Bligh, R. J., Hamrick, M. W., Holick, M. F., & Gunton, J. E. (2013). The Roles of Vitamin D in Skeletal Muscle: Form, Function, and Metabolism. *Endocrine Reviews*, 34(1), 33-83. <https://doi.org/10.1210/er.2012-1012>
- Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J., & Dreyfuss, G. (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Letters*, 582(14), 1977-1986. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.03.004>
- Gonzalez-Paredes, F. J., Ramos-Trujillo, E., & Claverie-Martin, F. (2014). Defective pre-mR-

- NA splicing in PKD1 due to presumed missense and synonymous mutations causing autosomal dominant polycystic disease. *Gene*, 546(2), 243-249. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.06.004>
- Gonzalez-Paredes, F. J., Ramos-Trujillo, E., & Claverie-Martin, F. (2016). Three exonic mutations in polycystic kidney disease-2 gene (PKD2) alter splicing of its pre-mRNA in a minigene system. *Gene*, 578(1), 117-123. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.12.019>
- Gorvin, C. M., Wilmer, M. J., Piret, S. E., Harding, B., van den Heuvel, L. P., Wrong, O., Jat, P. S., Lippiat, J. D., Levchenko, E. N., & Thakker, R. V. (2013). Receptor-mediated endocytosis and endosomal acidification is impaired in proximal tubule epithelial cells of Dent disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17), 7014-7019. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302063110>
- Grand, T., L'Hoste, S., Mordasini, D., Defontaine, N., Keck, M., Pennaforte, T., Genete, M., Laghmani, K., Teulon, J., & Lourdel, S. (2011). Heterogeneity in the processing of *CLCN5* mutants related to Dent disease. *Human Mutation*, 32(4), 476-483. <https://doi.org/10.1002/humu.21467>
- Grand, T., Mordasini, D., L'Hoste, S., Pennaforte, T., Genete, M., Biyeyeme, M.-J., Vargas-Poussou, R., Blanchard, A., Teulon, J., & Lourdel, S. (2009). Novel *CLCN5* mutations in patients with Dent's disease result in altered ion currents or impaired exchanger processing. *Kidney International*, 76(9), 999-1005. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.305>
- Grieschat, M., & Alekov, A. K. (2012). Glutamate 268 Regulates Transport Probability of the Anion/Proton Exchanger ClC-5. *Journal of Biological Chemistry*, 287(11), 8101-8109. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.298265>
- Guggino, S. E. (2007). Mechanisms of Disease: what can mouse models tell us about the molecular processes underlying Dent disease? *Nature Clinical Practice Nephrology*, 3(8), 449-455. <https://doi.org/10.1038/ncpneph0541>
- Günther, W., Lüchow, A., Cluzeaud, F., Vandewalle, A., & Jentsch, T. J. (1998). ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(14), 8075-8080. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8075>
- Günther, W., Piwon, N., & Jentsch, T. J. (2003). The ClC-5 chloride channel knock-out mouse – an animal model for Dent's disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physi-*

- ology*, 445(4), 456-462. <https://doi.org/10.1007/s00424-002-0950-6>
- Gupta, S., Li, S., Abedin, Md. J., Noppakun, K., Wang, L., Kaur, T., Najafian, B., Rodrigues, C. M. P., & Steer, C. J. (2012). Prevention of Acute Kidney Injury by Tauroursodeoxycholic Acid in Rat and Cell Culture Models. *PLoS ONE*, 7(11), e48950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048950>
- Han, S. P., Tang, Y. H., & Smith, R. (2010). Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochemical Journal*, 430(3), 379-392. <https://doi.org/10.1042/BJ20100396>
- Hara-Chikuma, M., Wang, Y., Guggino, S. E., Guggino, W. B., & Verkman, A. S. (2005). Impaired acidification in early endosomes of CLC-5 deficient proximal tubule. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329(3), 941-946. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.02.060>
- Hayama, A., Uchida, S., Sasaki, S., & Marumo, F. (2000). Isolation and characterization of the human CLC-5 chloride channel gene promoter. *Gene*, 261(2), 355-364. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00493-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00493-5)
- Hellen, B. (2009). Splice site tools: a comparative analysis report. *National Genetics Reference Laboratory, Manchester*.
- Herak-Kramberger, C. M., Brown, D., & Sabolić, I. (1998). Cadmium inhibits vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and endocytosis in rat kidney cortex. *Kidney International*, 53(6), 1713-1726. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00914.x>
- Hilpert, J., Nykjaer, A., Jacobsen, C., Wallukat, G., Nielsen, R., Moestrup, S. K., Haller, H., Luft, F. C., Christensen, E. I., & Willnow, T. E. (1999). Megalin Antagonizes Activation of the Parathyroid Hormone Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 274(9), 5620-5625. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.9.5620>
- Hodgin, J. B., Corey, H. E., Kaplan, B. S., & D'Agati, V. D. (2008). Dent disease presenting as partial Fanconi syndrome and hypercalciuria. *Kidney International*, 73(11), 1320-1323. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002785>
- Hoopes, R. R., Hueber, P. A., Reid, R. J., Braden, G. L., Goodyer, P. R., Melnyk, A. R., Midgley, J. P., Moel, D. I., Neu, A. M., VanWhy, S. K., & Scheinman, S. J. (1998). *CLCN5* chloride-channel mutations in six new North American families with X-linked nephrolithiasis. *Kidney International*, 54(3), 698-705. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00061.x>
- Hoopes, R. R., Raja, K. M., Koich, A., Hueber, P., Reid, R., Knohl, S. J., & Scheinman, S.

- J. (2004). Evidence for genetic heterogeneity in Dent's disease. *Kidney International*, 65(5), 1615-1620. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00571.x>
- Hoopes, R. R., Shrimpton, A. E., Knohl, S. J., Hueber, P., Hoppe, B., Matyus, J., Simckes, A., Tasic, V., Toenshoff, B., Suchy, S. F., Nussbaum, R. L., & Scheinman, S. J. (2005). Dent Disease with Mutations in OCRL1. *The American Journal of Human Genetics*, 76(2), 260-267. <https://doi.org/10.1086/427887>
- Hosohata, K. (2021). *Biomarkers of high salt intake* (pp. 71-106). <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2020.09.002>
- Houdayer, C., Dehainault, C., Mattler, C., Michaux, D., Caux-Moncoutier, V., Pagès-Berhouet, S., d'Enghien, C. D., Laugé, A., Castera, L., Gauthier-Villars, M., & Stoppa-Lyonnet, D. (2008). Evaluation of in silico splice tools for decision-making in molecular diagnosis. *Human Mutation*, 29(7), 975-982. <https://doi.org/10.1002/humu.20765>
- Hryciw, D. H., Ekberg, J., Ferguson, C., Lee, A., Wang, D., Parton, R. G., Pollock, C. A., Yun, C. C., & Poronnik, P. (2006). Regulation of Albumin Endocytosis by PSD95/Dlg/ZO-1 (PDZ) Scaffolds. *Journal of Biological Chemistry*, 281(23), 16068-16077. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512559200>
- Hryciw, D. H., Ekberg, J., Lee, A., Lensink, I. L., Kumar, S., Guggino, W. B., Cook, D. I., Pollock, C. A., & Poronnik, P. (2004). Nedd4-2 Functionally Interacts with ClC-5. *Journal of Biological Chemistry*, 279(53), 54996-55007. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411491200>
- Hryciw, D. H., Wang, Y., Devuyt, O., Pollock, C. A., Poronnik, P., & Guggino, W. B. (2003). Cofilin Interacts with ClC-5 and Regulates Albumin Uptake in Proximal Tubule Cell Lines. *Journal of Biological Chemistry*, 278(41), 40169-40176. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307890200>
- Huidobro E., J. P., Tagle, R., & Guzmán, A. M. (2018). Creatinina y su uso para la estimación de la velocidad de filtración glomerular. *Revista médica de Chile*, 146(3), 344-350. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872018000300344>
- Hureaux, M., Ashton, E., Dahan, K., Houillier, P., Blanchard, A., Cormier, C., Koumakis, E., Iancu, D., Belge, H., Hilbert, P., Rotthier, A., Del Favero, J., Schaefer, F., Kleta, R., Bockenhauer, D., Jeunemaitre, X., Devuyt, O., Walsh, S. B., & Vargas-Poussou, R. (2019). High-throughput sequencing contributes to the diagnosis of tubulopathies and familial hypercalcemia hypocalciuria in adults. *Kidney International*, 96(6), 1408-1416. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.08.027>

- Iancu, D., & Ashton, E. (2020). Inherited Renal Tubulopathies—Challenges and Controversies. *Genes*, *11*(3), 277. <https://doi.org/10.3390/genes11030277>
- Igarashi, T., Günther, W., Sekine, T., Inatomi, J., Shiraga, H., Takahashi, S., Suzuki, J., Tsuru, N., Yanagihara, T., Shimazu, M., Jentsch, T. J., & Thakker, R. V. (1998). Functional characterization of renal chloride channel, *CLCN5*, mutations associated with Dent's Japan disease. *Kidney International*, *54*(6), 1850-1856. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00203.x>
- Inoue, T., Nagano, C., Matsuo, M., Yamamura, T., Sakakibara, N., Horinouchi, T., Shibagaki, Y., Ichikawa, D., Aoto, Y., Ishiko, S., Ishimori, S., Rossanti, R., Iijima, K., & Nozu, K. (2020). Functional analysis of suspected splicing variants in *CLCN5* gene in Dent disease 1. *Clinical and Experimental Nephrology*, *24*(7), 606-612. <https://doi.org/10.1007/s10157-020-01876-x>
- Jabary, N. S., Martín, D., Muñoz, M. F., Santos, M., Herruzo, R., Gordillo, R., & Bustamante, J. (2006). Creatinina sérica y aclaramiento de creatinina para la valoración de la función renal en hipertensos esenciales. *NEFROLOGÍA*, *26*(1), 64-73.
- Jaganathan, K., Kyriazopoulou Panagiotopoulou, S., McRae, J. F., Darbandi, S. F., Knowles, D., Li, Y. I., Kosmicki, J. A., Arbelaez, J., Cui, W., Schwartz, G. B., Chow, E. D., Kanterakis, E., Gao, H., Kia, A., Batzoglou, S., Sanders, S. J., & Farh, K. K.-H. (2019). Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning. *Cell*, *176*(3), 535-548. e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.015>
- Jentsch, T. J., Günther, W., Pusch, M., & Schwappach, B. (1995). Properties of voltage-gated chloride channels of the *ClC* gene family. *The Journal of Physiology*, *482*(suppl), 19-25. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020560>
- Johnson, J. M., Castle, J., Garrett-Engle, P., Kan, Z., Loerch, P. M., Armour, C. D., Santos, R., Schadt, E. E., Stoughton, R., & Shoemaker, D. D. (2003). Genome-Wide Survey of Human Alternative Pre-mRNA Splicing with Exon Junction Microarrays. *Science*, *302*(5653), 2141-2144. <https://doi.org/10.1126/science.1090100>
- Jurica, M. S., & Moore, M. J. (2003). Pre-mRNA Splicing. *Molecular Cell*, *12*(1), 5-14. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00270-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00270-3)
- Kaneko, K., Hasui, M., Hata, A., Hata, D., & Nozu, K. (2010). Focal segmental glomerulosclerosis in a boy with Dent-2 disease. *Pediatric Nephrology*, *25*(4), 781-782. <https://doi.org/10.1007/s00467-009-1362-z>

- Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alföldi, J., Wang, Q., Collins, R. L., Laricchia, K. M., Ganna, A., Birnbaum, D. P., Gauthier, L. D., Brand, H., Solomonson, M., Watts, N. A., Rhodes, D., Singer-Berk, M., England, E. M., Seaby, E. G., Kosmicki, J. A., ... MacArthur, D. G. (2020). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*, *581*(7809), 434-443. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7>
- Khalaf, K., Tornese, P., Cocco, A., & Albanese, A. (2022). Tauroursodeoxycholic acid: a potential therapeutic tool in neurodegenerative diseases. *Translational Neurodegeneration*, *11*(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s40035-022-00307-z>
- Kim, S. R., Lee, Y., Lee, S.-G., Kang, E. S., Cha, B.-S., Kim, J.-H., & Lee, B.-W. (2016). Urinary N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, an early marker of diabetic kidney disease, might reflect glucose excursion in patients with type 2 diabetes. *Medicine*, *95*(27), e4114. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000004114>
- Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., & Ulrich Hartl, F. (2013). Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. *Annual Review of Biochemistry*, *82*(1), 323-355. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-092442>
- Kolb, P. S., Ayoub, E. A., Zhou, W., Yum, V., Dickhout, J. G., & Ask, K. (2015). The therapeutic effects of 4-phenylbutyric acid in maintaining proteostasis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *61*, 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.01.015>
- Kolovos, P., Knoch, T. A., Grosveld, F. G., Cook, P. R., & Papantonis, A. (2012). Enhancers and silencers: an integrated and simple model for their function. *Epigenetics & Chromatin*, *5*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-5-1>
- Kurosaki, T., Popp, M. W., & Maquat, L. E. (2019). Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(7), 406-420. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0126-2>
- Langlois, V., Bernard, C., Scheinman, S. J., Thakker, R. V., Cox, J. P. D., & Goodyer, P. R. (1998). Clinical features of X-linked nephrolithiasis in childhood. *Pediatric Nephrology*, *12*(8), 625-629. <https://doi.org/10.1007/s004670050516>
- Lazaridis, K. N., Gores, G. J., & Lindor, K. D. (2001). Ursodeoxycholic acid 'mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders'. *Journal of Hepatology*, *35*(1), 134-146. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(01\)00092-7](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(01)00092-7)

- Lee, Y., & Rio, D. C. (2015). Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1), 291-323. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034316>
- Lieske, J. C., Milliner, D. S., Beara-Lasic, L., Harris, P., Cogal, A., & Abrash, E. (1993). *Dent Disease*.
- Lieske, J., Milliner, D., Beara-Lasic, L., Harris, P., Cogal, A., & Abrash, E. (2017). *Dent Disease*. *GeneReviews*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK99494/>
- Liu, J., Sadeh, T. T., Lippiat, J. D., Thakker, R. V., Black, G. C., & Manson, F. (2021). Small molecules restore the function of mutant CLC5 associated with Dent disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(2), 1319-1322. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16091>
- Liu, S.-H., Yang, C.-C., Chan, D.-C., Wu, C.-T., Chen, L.-P., Huang, J.-W., Hung, K.-Y., & Chiang, C.-K. (2016). Chemical chaperon 4-phenylbutyrate protects against the endoplasmic reticulum stress-mediated renal fibrosis *in vivo* and *in vitro*. *Oncotarget*, 7(16), 22116-22127. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7904>
- Liu, W., Qian, C., & Francke, U. (1997). Silent mutation induces exon skipping of fibrillin-1 gene in Marfan syndrome. *Nature Genetics*, 16(4), 328-329. <https://doi.org/10.1038/ng0897-328>
- Liu, Z., Luyten, I., Bottomley, M. J., Messias, A. C., Houngninou-Molango, S., Sprangers, R., Zanier, K., Krämer, A., & Sattler, M. (2001). Structural Basis for Recognition of the Intron Branch Site RNA by Splicing Factor 1. *Science*, 294(5544), 1098-1102. <https://doi.org/10.1126/science.1064719>
- Lloyd, S. E., Pearce, S. H., Günther, W., Kawaguchi, H., Igarashi, T., Jentsch, T. J., & Thakker, R. V. (1997). Idiopathic low molecular weight proteinuria associated with hypercalciuric nephrocalcinosis in Japanese children is due to mutations of the renal chloride channel (*CLCN5*). *Journal of Clinical Investigation*, 99(5), 967-974. <https://doi.org/10.1172/JCI119262>
- Lloyd, S. E., Pearce, S. H. S., Fisher, S. E., Steinmeyer, K., Schwappach, B., Scheinman, S. J., Harding, B., Bolino, A., Devoto, M., Goodyer, P., Rigden, S. P. A., Wrong, O., Jentsch, T. J., Craig, I. W., & Thakker, R. V. (1996). A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature*, 379(6564), 445-449. <https://doi.org/10.1038/379445a0>
- Lourdels, S., Grand, T., Burgos, J., González, W., Sepúlveda, F. V., & Teulon, J. (2012). CLC-5 mutations associated with Dent's disease: a major role of the dimer interface. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 463(2), 247-256. <https://doi.org/10.1007/s00424-011-1052-0>
- Ludwig, M., Doroszewicz, J., Seyberth, H. W., Bökenkamp, A., Balluch, B., Nuutinen, M.,

- Utsch, B., & Waldegger, S. (2005). Functional evaluation of Dent's disease-causing mutations: implications for CLC-5 channel trafficking and internalization. *Human Genetics*, 117(2-3), 228-237. <https://doi.org/10.1007/s00439-005-1303-2>
- Ludwig, M., & Utsch, B. (2004). Dent disease-like phenotype and the chloride channel CLC-4 ( *CLCN4* ) gene. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 128A(4), 434-435. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30204>
- Ludwig, M., Utsch, B., & Monnens, L. A. H. (2006). Recent advances in understanding the clinical and genetic heterogeneity of Dent's disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21(10), 2708-2717. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfl346>
- Ludwig, M., Waldegger, S., Nuutinen, M., Bökenkamp, A., Reissinger, A., Steckelbroeck, S., & Utsch, B. (2003). Four additional *CLCN5* exons encode a widely expressed novel long CLC-5 isoform but fail to explain Dent's phenotype in patients without mutations in the short variant. *Kidney & blood pressure research*, 26(3), 176-184. <https://doi.org/10.1159/000071883>
- Luis-Yanes, M., García-García, P., & García Nieto, V. (2023). *Tubulopatías*. Nefrología al día. <https://www.nefrologiaaldia.org/253>
- Mansour-Hendili, L., Blanchard, A., Le Pottier, N., Roncelin, I., Lourdel, S., Treard, C., González, W., Vergara-Jaque, A., Morin, G., Colin, E., Holder-Espinasse, M., Bacchetta, J., Baudouin, V., Benoit, S., Bérard, E., Bourdat-Michel, G., Bouchireb, K., Burtey, S., Cailliez, M., ... Vargas-Poussou, R. (2015). Mutation Update of the *CLCN5* Gene Responsible for Dent Disease 1. *Human Mutation*, 36(8), 743-752. <https://doi.org/10.1002/humu.22804>
- Martín-Granado, A., Vázquez-Moncholí, C., Luis-Yanes, M. I., López-Méndez, M., & García-Nieto, V. (2009). Determination of Clara cell protein urinary elimination as a marker of tubular dysfunction. *Pediatric Nephrology*, 24(4), 747-752. <https://doi.org/10.1007/s00467-008-1078-5>
- McVety, S. (2005). Disruption of an exon splicing enhancer in exon 3 of MLH1 is the cause of HNPCC in a Quebec family. *Journal of Medical Genetics*, 43(2), 153-156. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.031997>
- Mejía, N., Santos, F., Claverie-Martín, F., García-Nieto, V., Ariceta, G., & Castaño, L. (2013). RenalTube: a network tool for clinical and genetic diagnosis of primary tubulopathies. *European Journal of Pediatrics*, 172(6), 775-780. <https://doi.org/10.1007/s00431-013-1934-6>

- Mimori, S., Kawada, K., Saito, R., Takahashi, M., Mizoi, K., Okuma, Y., Hosokawa, M., & Kanzaki, T. (2019). Indole-3-propionic acid has chemical chaperone activity and suppresses endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 517(4), 623-628. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.07.074>
- Mohammed-Ali, Z., Lu, C., Marway, M. K., Carlisle, R. E., Ask, K., Lukic, D., Krepinsky, J. C., & Dickhout, J. G. (2017). Endoplasmic reticulum stress inhibition attenuates hypertensive chronic kidney disease through reduction in proteinuria. *Scientific Reports*, 7(1), 41572. <https://doi.org/10.1038/srep41572>
- Molina, M., Martínez, J., & Burgos, E. (2022, abril 1). *Estimación del filtrado glomerular, entendiendo sus limitaciones*. Nefrología al día. <https://www.nefrologiaaldia.org/es-articulo-estimacion-del-filtrado-glomerular-entendiendo-453>
- Moor, M. B., & Bonny, O. (2016). Ways of calcium reabsorption in the kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 310(11), F1337-F1350. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00273.2015>
- Morimoto, T., Uchida, S., Sakamoto, H., Kondo, Y., Hanamizu, H., Fukui, M., Tomino, Y., Nagano, N., Sasaki, S., & Marumo, F. (1998). Mutations in *CLCN5* chloride channel in Japanese patients with low molecular weight proteinuria. *Journal of the American Society of Nephrology*, 9(5), 811-818. <https://doi.org/10.1681/ASN.V95811>
- Mort, M., Sterne-Weiler, T., Li, B., Ball, E. V, Cooper, D. N., Radivojac, P., Sanford, J. R., & Mooney, S. D. (2014). MutPred Splice: machine learning-based prediction of exonic variants that disrupt splicing. *Genome Biology*, 15(1), R19. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-1-r19>
- Moulin, P., Igarashi, T., Van Der Smissen, P., Cosyns, J.-P., Verroust, P., Thakker, R. V., Scheinman, S. J., Courtoy, P. J., & Devuyst, O. (2003). Altered polarity and expression of H<sup>+</sup>-ATPase without ultrastructural changes in kidneys of Dent's disease patients. *Kidney International*, 63(4), 1285-1295. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00851.x>
- Mura-Escorche, G., Perdomo-Ramírez, A., Ramos-Trujillo, E., Trujillo-Frías, C. J., & Claverie-Martín, F. (2023). Characterization of pre-mRNA Splicing Defects Caused by *CLCN5* and *OCRL* Mutations and Identification of Novel Variants Associated with Dent Disease. *Biomedicines*, 11(11), 3082. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11113082>
- Murakami, T., & Kawakami, H. (1990). The clinical significance of asymptomatic low mo-

- lecular weight proteinuria detected on routine screening of children in Japan: a survey of 53 patients. *Clinical nephrology*, 33(1), 12-19.
- Murayama, A., Takeyama, K., Kitanaka, S., Kodera, Y., Kawaguchi, Y., Hosoya, T., & Kato, S. (1999). Positive and Negative Regulations of the Renal 25-Hydroxyvitamin D3 1 $\alpha$ -Hydroxylase Gene by Parathyroid Hormone, Calcitonin, and 1 $\alpha$ ,25(OH)2D3 in Intact Animals\*. *Endocrinology*, 140(5), 2224-2231. <https://doi.org/10.1210/endo.140.5.6691>
- Navarro-Moreno, M. A., & Alía-Ramos, P. (2006). Metabolismo óseo. Vitamina D Y PTH. *Endocrinología y Nutrición*, 53(3), 199-208. [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(06\)71090-7](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(06)71090-7)
- Ng, P. C. (2003). SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3812-3814. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg509>
- Nguengang Wakap, S., Lambert, D. M., Olry, A., Rodwell, C., Gueydan, C., Lanneau, V., Murphy, D., Le Cam, Y., & Rath, A. (2020). Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *European Journal of Human Genetics*, 28(2), 165-173. <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0508-0>
- Nicholson, P., & Mühlemann, O. (2010). Cutting the nonsense: the degradation of PTC-containing mRNAs. *Biochemical Society Transactions*, 38(6), 1615-1620. <https://doi.org/10.1042/BST0381615>
- Nielsen, R., Christensen, E. I., & Birn, H. (2016). Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease. *Kidney International*, 89(1), 58-67. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2015.11.007>
- Nijenhuis, T., Vallon, V., van der Kemp, A. W. C. M., Loffing, J., Hoenderop, J. G. J., & Bindels, R. J. M. (2005). Enhanced passive Ca<sup>2+</sup> reabsorption and reduced Mg<sup>2+</sup> channel abundance explains thiazide-induced hypocalciuria and hypomagnesemia. *Journal of Clinical Investigation*, 115(6), 1651-1658. <https://doi.org/10.1172/JCI24134>
- Nissim-Rafinia, M., & Kerem, B. (2002). Splicing regulation as a potential genetic modifier. *Trends in Genetics*, 18(3), 123-127. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02619-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02619-1)
- Norden, A. G. W., Lapsley, M., Lee, P. J., Pusey, C. D., Scheinman, S. J., Tam, F. W. K., Thakker, R. V., Unwin, R. J., & Wrong, O. (2001). Glomerular protein sieving and implications for renal failure in Fanconi syndrome. *Kidney International*, 60(5), 1885-1892. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00016.x>

- Norden, A. G. W., Scheinman, S. J., Deschodt-Lanckman, M. M., Lapsley, M., Nortier, J. L., Thakker, R. V., Unwin, R. J., & Wrong, O. (2000). Tubular proteinuria defined by a study of Dent's (*CLCN5* mutation) and other tubular diseases. *Kidney International*, 57(1), 240-249. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00847.x>
- Novarino, G., Weinert, S., Rickheit, G., & Jentsch, T. J. (2010). Endosomal Chloride-Proton Exchange Rather Than Chloride Conductance Is Crucial for Renal Endocytosis. *Science*, 328(5984), 1398-1401. <https://doi.org/10.1126/science.1188070>
- Özcan, U., Yilmaz, E., Özcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R. O., Görgün, C. Z., & Hotamisligil, G. S. (2006). Chemical Chaperones Reduce ER Stress and Restore Glucose Homeostasis in a Mouse Model of Type 2 Diabetes. *Science*, 313(5790), 1137-1140. <https://doi.org/10.1126/science.1128294>
- Pagani, F., & Baralle, F. E. (2004). Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nature Reviews Genetics*, 5(5), 389-396. <https://doi.org/10.1038/nrg1327>
- Paganoni, S., Macklin, E. A., Hendrix, S., Berry, J. D., Elliott, M. A., Maiser, S., Karam, C., Caress, J. B., Owegi, M. A., Quick, A., Wymer, J., Goutman, S. A., Heitzman, D., Heiman-Patterson, T., Jackson, C. E., Quinn, C., Rothstein, J. D., Kasarskis, E. J., Katz, J., ... Cudkovic, M. E. (2020). Trial of Sodium Phenylbutyrate–Taurursodiol for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 383(10), 919-930. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1916945>
- Pan, Q., Shai, O., Lee, L. J., Frey, B. J., & Blencowe, B. J. (2008). Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature Genetics*, 40(12), 1413-1415. <https://doi.org/10.1038/ng.259>
- Pan, W., Borovac, J., Spicer, Z., Hoenderop, J. G., Bindels, R. J., Shull, G. E., Doschak, M. R., Cordat, E., & Alexander, R. T. (2012). The epithelial sodium/proton exchanger, NHE3, is necessary for renal and intestinal calcium (re)absorption. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 302(8), F943-F956. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00504.2010>
- Park, E., Choi, H. J., Lee, J. M., Ahn, Y. H., Kang, H. G., Choi, Y. M., Park, S. J., Cho, H. Y., Park, Y.-H., Lee, S. J., Ha, I. S., & Cheong, H. Il. (2014). Muscle involvement in Dent disease 2. *Pediatric Nephrology*, 29(11), 2127-2132. <https://doi.org/10.1007/s00467-014-2841-4>

- Paumgartner, G., & Beuers, U. (2004). Mechanisms of action and therapeutic efficacy of ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease. *Clinics in Liver Disease*, 8(1), 67-81. [https://doi.org/10.1016/S1089-3261\(03\)00135-1](https://doi.org/10.1016/S1089-3261(03)00135-1)
- Pejaver, V., Urresti, J., Lugo-Martinez, J., Pagel, K. A., Lin, G. N., Nam, H.-J., Mort, M., Cooper, D. N., Sebat, J., Iakoucheva, L. M., Mooney, S. D., & Radivojac, P. (2020). Inferring the molecular and phenotypic impact of amino acid variants with MutPred2. *Nature Communications*, 11(1), 5918. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19669-x>
- Perdomo-Ramirez, A., Aguirre, M., Davitaia, T., Ariceta, G., Ramos-Trujillo, E., & Claverie-Martin, F. (2019). Characterization of two novel mutations in the claudin-16 and claudin-19 genes that cause familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Gene*, 689, 227-234. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.12.024>
- Perdomo-Ramirez, A., De Armas-Ortiz, M., Ramos-Trujillo, E., Suarez-Artiles, L., & Claverie-Martin, F. (2019). Exonic CLDN16 mutations associated with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis can induce deleterious mRNA alterations. *BMC Medical Genetics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12881-018-0713-7>
- Piwon, N., Günther, W., Schwake, M., Bösl, M. R., & Jentsch, T. J. (2000). ClC-5 Cl-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature*, 408(6810), 369-373. <https://doi.org/10.1038/35042597>
- Posada De la Paz, M., Martín-Arribas, C., Ramírez, A., Villaverde, A., & Abitua, I. (2008). Enfermedades raras. Concepto, epidemiología y situación actual en España [Rare diseases. Concept, epidemiology and state of the question in Spain]. *Anales del sistema sanitario de Navarra*, 31(Supp 2), 9-20.
- Poupon, R. E., Bonnard, A.-M., Chrétien, Y., & Poupon, R. (1999). Ten-year survival in ursodeoxycholic acid-treated patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, 29(6), 1668-1671. <https://doi.org/10.1002/hep.510290603>
- Pozzoli, U., & Sironi, M. (2005). Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(14), 1579-1604. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5030-6>
- Priante, G., Ceol, M., Ganesello, L., Bizzotto, D., Braghetta, P., Calò, L. A., Del Prete, D., & Anglani, F. (2023). Emerging Perspectives on the Rare Tubulopathy Dent Disease: Is Glomerular Damage a Direct Consequence of ClC-5 Dysfunction? *International Jour-*

- nal of Molecular Sciences*, 24(2), 1313. <https://doi.org/10.3390/ijms24021313>
- Pusch, M., Ludewig, U., & Jentsch, T. J. (1997). Temperature Dependence of Fast and Slow Gating Relaxations of ClC-0 Chloride Channels. *The Journal of General Physiology*, 109(1), 105-116. <https://doi.org/10.1085/jgp.109.1.105>
- Pusch, M., & Zifarelli, G. (2015). ClC-5: Physiological role and biophysical mechanisms. *Cell Calcium*, 58(1), 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.09.007>
- Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P. A., Escott, K. J., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Guilliams, T., Latimer, J., McNamee, C., Norris, A., Sanseau, P., Cavalla, D., & Pirmohamed, M. (2019). Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(1), 41-58. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>
- Raja, K. A., Schurman, S., D'Mello, R. G., Blowey, D., Goodyer, P., Van Why, S., Ploutz-Snyder, R. J., Asplin, J., & Scheinman, S. J. (2002). Responsiveness of Hypercalciuria to Thiazide in Dent's Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(12), 2938-2944. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000036869.82685.F6>
- Ramalho, R. M., Viana, R. J. S., Low, W. C., Steer, C. J., & Rodrigues, C. M. P. (2008). Bile acids and apoptosis modulation: an emerging role in experimental Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine*, 14(2), 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.12.001>
- Ramos-Trujillo, E., Claverie-Martin, F., Garcia-Nieto, V., Ariceta, G., Vara, J., Gonzalez-Acosta, H., Garcia-Ramirez, M., Fons, J., Cordoba-Lanus, E., Gonzalez-Paredes, J., Valenciano, B., Ramos, L., Muley, R., Caggiani, M., Alvarez-Estrad, P., Madrid, A., Yanes-Luis, M. I., Javier Gonzalez-Paredes, F., Garcia-Nieto, V. M., ... Garcia-Castaño, A. (2013). Dent's disease: Identification of seven new pathogenic mutations in the *CLCN5* gene. *Journal of Pediatric Genetics*, 2(3), 133-140. <https://doi.org/10.3233/PGE-13061>
- Ramos-Trujillo, E., García-Nieto, V., & Claverie-Martín, F. (2022). Enfermedad de Dent. En R. Exeni, V. García-Nieto, M. Medeiros, & F. Santos (Eds.), *Nefrología Pediátrica* (pp. 177-187).
- Ramos-Trujillo, E., González-Acosta, H., Flores, C., García-Nieto, V., Guillén, E., Gracia, S., Vicente, C., Espinosa, L., Maseda, M. A. F., Santos, F., Camacho, J. A., & Claverie-Martín, F. (2007). A missense mutation in the chloride/proton ClC-5 antiporter gene results in increased expression of an alternative mRNA form that lacks exons 10 and 11. Identification of seven new *CLCN5* mutations in patients with Dent's disease. *Journal of Human Genetics*, 52(3), 255-261. <https://doi.org/10.1007/s10038-007-0112-y>

- Reed, A. A. C., Loh, N. Y., Terryn, S., Lippiat, J. D., Partridge, C., Galvanovskis, J., Williams, S. E., Jouret, F., Wu, F. T. F., Courtoy, P. J., Nesbit, M. A., Rorsman, P., Devuyt, O., Ashcroft, F. M., & Thakker, R. V. (2010). CLC-5 and KIF3B interact to facilitate CLC-5 plasma membrane expression, endocytosis, and microtubular transport: relevance to pathophysiology of Dent's disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 298(2), F365-F380. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00038.2009>
- REESE, M. G., EECKMAN, F. H., KULP, D., & HAUSSLER, D. (1997). Improved Splice Site Detection in Genie. *Journal of Computational Biology*, 4(3), 311-323. <https://doi.org/10.1089/cmb.1997.4.311>
- Reinhart, S. C., Norden, A. G., Lapsley, M., Thakker, R. V, Pang, J., Moses, A. M., Frymoyer, P. A., Favus, M. J., Hoepner, J. A., & Scheinman, S. J. (1995). Characterization of carrier females and affected males with X-linked recessive nephrolithiasis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 5(7), 1451-1461. <https://doi.org/10.1681/ASN.V571451>
- Ren, H. Y., Grove, D. E., De La Rosa, O., Houck, S. A., Sopha, P., Van Goor, F., Hoffman, B. J., & Cyr, D. M. (2013). VX-809 corrects folding defects in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein through action on membrane-spanning domain 1. *Molecular Biology of the Cell*, 24(19), 3016-3024. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-05-0240>
- Rentzsch, P., Schubach, M., Shendure, J., & Kircher, M. (2021). CADD-Splice—improving genome-wide variant effect prediction using deep learning-derived splice scores. *Genome Medicine*, 13(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00835-9>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405-424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Rodríguez-Soriano, J. (2003). Tubulopatías renales hereditarias: de la clínica a la biología molecular [Renal hereditary tubulopathies: from the clinic to the molecular biology]. *Nefrología*, 23(Suppl 1), 71-83.
- Russ, W. P., & Engelman, D. M. (2000). The GxxxG motif: A framework for transmembrane helix-helix association. *Journal of Molecular Biology*, 296(3), 911-919. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3489>

- Sakamoto, H., Sado, Y., Naito, I., Kwon, T.-H., Inoue, S., Endo, K., Kawasaki, M., Uchida, S., Nielsen, S., Sasaki, S., & Marumo, F. (1999). Cellular and subcellular immunolocalization of CLC-5 channel in mouse kidney: colocalization with H<sup>+</sup>-ATPase. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 277(6), F957-F965. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1999.277.6.F957>
- Sardana, D., Zhu, C., Zhang, M., Gudivada, R. C., Yang, L., & Jegga, A. G. (2011). Drug repositioning for orphan diseases. *Briefings in bioinformatics*, 12(4), 346–356. <https://doi.org/10.1093/bib/bbr021>
- Satoh, N., Yamada, H., Yamazaki, O., Suzuki, M., Nakamura, M., Suzuki, A., Ashida, A., Yamamoto, D., Kaku, Y., Sekine, T., Seki, G., & Horita, S. (2016). A pure chloride channel mutant of CLC-5 causes Dent's disease via insufficient V-ATPase activation. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 468(7), 1183-1196. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1808-7>
- Sayer, J. A., Carr, G., & Simmons, N. L. (2004a). Calcium phosphate and calcium oxalate crystal handling is dependent upon CLC-5 expression in mouse collecting duct cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1689(1), 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.02.007>
- Sayer, J. A., Carr, G., & Simmons, N. L. (2004b). Nephrocalcinosis: molecular insights into calcium precipitation within the kidney. *Clinical science (London, England : 1979)*, 106(6), 549-561. <https://doi.org/10.1042/CS20040048>
- Scheel, O., Zdebik, A. A., Lourdel, S., & Jentsch, T. J. (2005). Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins. *Nature*, 436(7049), 424-427. <https://doi.org/10.1038/nature03860>
- Scheinman, S. J. (1998). X-linked hypercalciuric nephrolithiasis: Clinical syndromes and chloride channel mutations. *Kidney International*, 53(1), 3-17. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00718.x>
- Scheinman, S. J. (2009). Dent's Disease. En *Genetic Diseases of the Kidney* (pp. 213-226). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-449851-8.00012-7>
- Scheinman, S. J., Cox, J. P. D., Lloyd, S. E., Pearce, S. H. S., Salenger, P. V., Hoopes, R. R., Bushinsky, D. A., Wrong, O., Asplin, J. R., Langman, C. B., Norden, A. G. W., & Thakker, R. V. (2000). Isolated hypercalciuria with mutation in *CLCN5*: Relevance to idiopathic hypercalciuria. *Kidney International*, 57(1), 232-239. <https://doi.org/10.1054/kid.2000.3583>

org/10.1046/j.1523-1755.2000.00774.x

- Scheinman, S. J., Pook, M. A., Wooding, C., Pang, J. T., Frymoyer, P. A., & Thakker, R. V. (1993). Mapping the gene causing X-linked recessive nephrolithiasis to Xp11.22 by linkage studies. *Journal of Clinical Investigation*, *91*(6), 2351-2357. <https://doi.org/10.1172/JCI116467>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmieder, S., Bogliolo, S., & Ehrenfeld, J. (2007). N-glycosylation of the *Xenopus laevis* CIC-5 protein plays a role in cell surface expression, affecting transport activity at the plasma membrane. *Journal of Cellular Physiology*, *210*(2), 479-488. <https://doi.org/10.1002/jcp.20882>
- Scott, J. W., Hawley, S. A., Green, K. A., Anis, M., Stewart, G., Scullion, G. A., Norman, D. G., & Hardie, D. G. (2004). CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *Journal of Clinical Investigation*, *113*(2), 274-284. <https://doi.org/10.1172/JCI19874>
- Scotti, M. M., & Swanson, M. S. (2016). RNA mis-splicing in disease. *Nature Reviews Genetics*, *17*(1), 19-32. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.3>
- Sekine, T., Komoda, F., Miura, K., Takita, J., Shimadzu, M., Matsuyama, T., Ashida, A., & Igarashi, T. (2014). Japanese Dent disease has a wider clinical spectrum than Dent disease in Europe/USA: genetic and clinical studies of 86 unrelated patients with low-molecular-weight proteinuria. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *29*(2), 376-384. <https://doi.org/10.1093/ndt/gft394>
- Sharma, N., Sosnay, P. R., Ramalho, A. S., Douville, C., Franca, A., Gottschalk, L. B., Park, J., Lee, M., Vecchio-Pagan, B., Raraigh, K. S., Amaral, M. D., Karchin, R., & Cutting, G. R. (2014). Experimental Assessment of Splicing Variants Using Expression Minigenes and Comparison with In Silico Predictions. *Human Mutation*, *35*(10), 1249-1259. <https://doi.org/10.1002/humu.22624>
- Silva, I. V, Cebotaru, V., Wang, H., Wang, X., Wang, S. S., Guo, G., Devuyt, O., Thakker, R. V, Guggino, W. B., & Guggino, S. E. (2003). The CIC-5 Knockout Mouse Model of

- Dent's Disease Has Renal Hypercalciuria and Increased Bone Turnover. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(4), 615-623. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.4.615>
- Singh, G., & Cooper, T. A. (2006). Minigene reporter for identification and analysis of *cis* elements and *trans* factors affecting pre-mRNA splicing. *BioTechniques*, 41(2), 177-181. <https://doi.org/10.2144/000112208>
- Singh, O. V., Vij, N., Mogayzel, Peter J., Jozwik, C., Pollard, H. B., & Zeitlin, P. L. (2006). Pharmacoproteomics of 4-Phenylbutyrate-Treated IB3-1 Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells. *Journal of Proteome Research*, 5(3), 562-571. <https://doi.org/10.1021/pr050319o>
- Smith, A. J., & Lippiat, J. D. (2010). Direct endosomal acidification by the outwardly rectifying CLC-5 Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *The Journal of Physiology*, 588(12), 2033-2045. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.188540>
- Smith, A. J., Reed, A. A. C., Loh, N. Y., Thakker, R. V., & Lippiat, J. D. (2009). Characterization of Dent's disease mutations of CLC-5 reveals a correlation between functional and cell biological consequences and protein structure. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 296(2), F390-F397. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90526.2008>
- Solanki, A. K., Arif, E., Morinelli, T., Wilson, R. C., Hardiman, G., Deng, P., Arthur, J. M., Velez, J. C., Nihalani, D., Janech, M. G., & Budisavljevic, M. N. (2018). A Novel *CLCN5* Mutation Associated With Focal Segmental Glomerulosclerosis and Podocyte Injury. *Kidney International Reports*, 3(6), 1443-1453. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2018.06.003>
- Soukarieh, O., Gaildrat, P., Hamieh, M., Drouet, A., Baert-Desurmont, S., Frébourg, T., Tosi, M., & Martins, A. (2016). Exonic Splicing Mutations Are More Prevalent than Currently Estimated and Can Be Predicted by Using In Silico Tools. *PLOS Genetics*, 12(1), e1005756. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005756>
- Steffensen, A. Y., Dandanell, M., Jønson, L., Ejlersen, B., Gerdes, A.-M., Nielsen, F. C., & Hansen, T. vO. (2014). Functional characterization of BRCA1 gene variants by minigene splicing assay. *European Journal of Human Genetics*, 22(12), 1362-1368. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.40>
- Steinmeyer, K., Schwappach, B., Bens, M., Vandewalle, A., & Jentsch, T. J. (1995). Cloning and Functional Expression of Rat CLC-5, a Chloride Channel Related to Kidney Disease. *Journal of Biological Chemistry*, 270(52), 31172-31177. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.52.31172>

- Suarez-Artiles, L., Perdomo-Ramirez, A., Ramos-Trujillo, E., & Claverie-Martin, F. (2018). Splicing Analysis of Exonic OCRL Mutations Causing Lowe Syndrome or Dent-2 Disease. *Genes*, 9(1), 15. <https://doi.org/10.3390/genes9010015>
- Suzuki, Y., Okada, T., Higuchi, A., Mase, D., & Kobayashi, O. (1985). Asymptomatic low molecular weight proteinuria: a report on 5 cases. *Clinical nephrology*, 23(5), 249-254.
- Tanaka, N., Tani, Y., Hattori, H., Tada, T., & Kunugi, S. (2004). Interaction of the N-terminal domain of *Escherichia coli* heat-shock protein ClpB and protein aggregates during chaperone activity. *Protein Science*, 13(12), 3214-3221. <https://doi.org/10.1110/ps.04780704>
- Tanuma, A., Sato, H., Takeda, T., Hosojima, M., Obayashi, H., Hama, H., Iino, N., Hosaka, K., Kaseda, R., Imai, N., Ueno, M., Yamazaki, M., Sakimura, K., Gejyo, F., & Saito, A. (2007). Functional Characterization of a Novel Missense *CLCN5* Mutation Causing Alterations in Proximal Tubular Endocytic Machinery in Dent's Disease. *Nephron Physiology*, 107(4), p87-p97. <https://doi.org/10.1159/000111253>
- Thakker, R. V. (1997). Chloride channels cough up. *Nature Genetics*, 17(2), 125-127. <https://doi.org/10.1038/ng1097-125>
- Tosetto, E., Addis, M., Caridi, G., Meloni, C., Emma, F., Vergine, G., Stringini, G., Papalia, T., Barbano, G., Ghiggeri, G. M., Ruggeri, L., Miglietti, N., D'Angelo, A., Melis, M. A., & Anglani, F. (2009). Locus heterogeneity of Dent's disease: OCRL1 and TMEM27 genes in patients with no *CLCN5* mutations. *Pediatric Nephrology*, 24(10), 1967-1973. <https://doi.org/10.1007/s00467-009-1228-4>
- Tosetto, E., Casarin, A., Salviati, L., Familiari, A., Lieske, J. C., & Anglani, F. (2014). Complexity of the 5'UTR region of the *CLCN5* gene: eleven 5'UTR ends are differentially expressed in the human kidney. *BMC Medical Genomics*, 7(1), 41. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-7-41>
- Tosetto, E., Ghiggeri, G. M., Emma, F., Barbano, G., Carrea, A., Vezzoli, G., Torregrossa, R., Cara, M., Ripanti, G., Ammenti, A., Peruzzi, L., Murer, L., Ratsch, I. M., Citron, L., Gambaro, G., D'angelo, A., & Anglani, F. (2006). Phenotypic and genetic heterogeneity in Dent's disease—the results of an Italian collaborative study. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21(9), 2452-2463. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfl274>
- Tournier, I., Vezain, M., Martins, A., Charbonnier, F., Baert-Desurmont, S., Olschwang, S., Wang, Q., Buisine, M. P., Soret, J., Tazi, J., Frébourg, T., & Tosi, M. (2008). A large fraction of un-

- classified variants of the mismatch repair genes *MLH1* and *MSH2* is associated with splicing defects. *Human Mutation*, 29(12), 1412-1424. <https://doi.org/10.1002/humu.20796>
- Trautmann, A., Lipska-Ziętkiewicz, B. S., & Schaefer, F. (2018). Exploring the Clinical and Genetic Spectrum of Steroid Resistant Nephrotic Syndrome: The PodoNet Registry. *Frontiers in Pediatrics*, 6. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00200>
- Upagupta, C., Carlisle, R. E., & Dickhout, J. G. (2017). Analysis of the potency of various low molecular weight chemical chaperones to prevent protein aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486(1), 163-170. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.019>
- van der Klift, H. M., Jansen, A. M. L., van der Steenstraten, N., Bik, E. C., Tops, C. M. J., Devilee, P., & Wijnen, J. T. (2015). Splicing analysis for exonic and intronic mismatch repair gene variants associated with Lynch syndrome confirms high concordance between minigene assays and patient <scp>RNA</scp> analyses. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 3(4), 327-345. <https://doi.org/10.1002/mgg3.145>
- Van Loo, P. L. P., Van de Weerd, H. A., Van Zutphen, L. F. M., & Baumans, V. (2004). Preference for social contact versus environmental enrichment in male laboratory mice. *Laboratory Animals*, 38(2), 178-188. <https://doi.org/10.1258/002367704322968867>
- Van Loo, P. L. P., Van der Meer, E., Kruitwagen, C. L. J. J., Koolhaas, J. M., Van Zutphen, L. F. M., & Baumans, V. (2004). Long-term effects of husbandry procedures on stress-related parameters in male mice of two strains. *Laboratory Animals*, 38(2), 169-177. <https://doi.org/10.1258/002367704322968858>
- Vandewalle, A., Cluzeaud, F., Peng, K.-C., Bens, M., Lüchow, A., Günther, W., & Jentsch, T. J. (2001). Tissue distribution and subcellular localization of the ClC-5 chloride channel in rat intestinal cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 280(2), C373-C381. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.2.C373>
- Vang, S., Longley, K., Steer, C. J., & Low, W. C. (2014). The Unexpected Uses of Urso- and Tauroursodeoxycholic Acid in the Treatment of Non-liver Diseases. *Global Advances in Health and Medicine*, 3(3), 58-69. <https://doi.org/10.7453/gahmj.2014.017>
- Vezzoli, G., Corghi, E., Edefonti, A., Palazzi, P., Dell'Antonio, G., Elli, A., Azzani, T., Vallino, F., & Bianchi, G. (1995). Nonacidotic kidney proximal tubulopathy with absorptive hypercalciuria. *American Journal of Kidney Diseases*, 25(2), 222-227. [https://doi.org/10.1016/0272-6386\(95\)90002-0](https://doi.org/10.1016/0272-6386(95)90002-0)

- Vilatoba, M., Eckstein, C., Bilbao, G., Smyth, C. A., Jenkins, S., Thompson, J. A., Eckhoff, D. E., & Contreras, J. L. (2005). Sodium 4-phenylbutyrate protects against liver ischemia reperfusion injury by inhibition of endoplasmic reticulum-stress mediated apoptosis. *Surgery*, *138*(2), 342-351. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2005.04.019>
- Villani, S., Dematteis, G., Tapella, L., Gagliardi, M., Lim, D., Corazzari, M., Aprile, S., & Del Grosso, E. (2023). Quantification of the Chemical Chaperone 4-Phenylbutyric Acid (4-PBA) in Cell Culture Media via LC-HRMS: Applications in Fields of Neurodegeneration and Cancer. *Pharmaceuticals*, *16*(2), 298. <https://doi.org/10.3390/ph16020298>
- Wagner, C. A., Rubio-Aliaga, I., Biber, J., & Hernando, N. (2014). Genetic diseases of renal phosphate handling. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *29*(suppl 4), iv45-iv54. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfu217>
- Wai, H., Douglas, A. G. L., & Baralle, D. (2019). RNA splicing analysis in genomic medicine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *108*, 61-71. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.12.009>
- WALDEGGER, S., & JENTSCH, T. J. (2000). From Tonus to Tonicity. *Journal of the American Society of Nephrology*, *11*(7), 1331-1339. <https://doi.org/10.1681/ASN.V1171331>
- Wallace, M. A. (1998). Anatomy and Physiology of the Kidney. *AORN Journal*, *68*(5), 799-820. [https://doi.org/10.1016/S0001-2092\(06\)62377-6](https://doi.org/10.1016/S0001-2092(06)62377-6)
- Wang, E. T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S. F., Schroth, G. P., & Burge, C. B. (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, *456*(7221), 470-476. <https://doi.org/10.1038/nature07509>
- Wang, G.-S., & Cooper, T. A. (2007). Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nature Reviews Genetics*, *8*(10), 749-761. <https://doi.org/10.1038/nrg2164>
- Wang, S. S. (2000). Mice lacking renal chloride channel, CLC-5, are a model for Dent's disease, a nephrolithiasis disorder associated with defective receptor-mediated endocytosis. *Human Molecular Genetics*, *9*(20), 2937-2945. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.20.2937>
- Wang, X., Anglani, F., Beara-Lasic, L., Mehta, A. J., Vaughan, L. E., Herrera Hernandez, L., Cogal, A., Scheinman, S. J., Ariceta, G., Isom, R., Copelovitch, L., Enders, F. T., Del Prete, D., Vezzoli, G., Paglialonga, F., Harris, P. C., & Lieske, J. C. (2016). Glomerular Pathology in Dent Disease and Its Association with Kidney Function. *Clinical Journal of the Amer-*

- ican Society of Nephrology*, 11(12), 2168-2176. <https://doi.org/10.2215/CJN.03710416>
- Wang, Y.-J., Di, X.-J., & Mu, T.-W. (2014). Using pharmacological chaperones to restore proteostasis. *Pharmacological Research*, 83, 3-9. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.04.002>
- Wang, Z., Rolish, M. E., Yeo, G., Tung, V., Mawson, M., & Burge, C. B. (2004). Systematic Identification and Analysis of Exonic Splicing Silencers. *Cell*, 119(6), 831-845. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.010>
- Ward, A. J., & Cooper, T. A. (2010). The pathobiology of splicing. *The Journal of Pathology*, 220(2), 152-163. <https://doi.org/10.1002/path.2649>
- Warrell, R. P., He, L.-Z., Richon, V., Calleja, E., & Pandolfi, P. P. (1998). Therapeutic Targeting of Transcription in Acute Promyelocytic Leukemia by Use of an Inhibitor of Histone Deacetylase. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 90(21), 1621-1625. <https://doi.org/10.1093/jnci/90.21.1621>
- Wimmer, K., Roca, X., Beiglböck, H., Callens, T., Etzler, J., Rao, A. R., Krainer, A. R., Fonatsch, C., & Messiaen, L. (2007). Extensive in silico analysis of NF1 splicing defects uncovers determinants for splicing outcome upon 5' splice-site disruption. *Human Mutation*, 28(6), 599-612. <https://doi.org/10.1002/humu.20493>
- Wrong, O. M., Norden, A. G., & Feest, T. G. (1994). Dent's disease; a familial proximal renal tubular syndrome with low-molecular-weight proteinuria, hypercalciuria, nephrocalcinosis, metabolic bone disease, progressive renal failure and a marked male predominance. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*, 87(8), 473-493.
- Wrong, O., Norden, A., & Feest, T. (1990). Dent's disease: a familial renal tubular syndrome with hypercalciuria, tubular proteinuria, rickets, nephrocalcinosis and eventual renal failure. *QJ Med*, 77, 1086-1087.
- Wrong, O., Norden, A. G., & Fees, T. G. (1992). X-Linked Recessive Nephrolithiasis with Renal Failure. *New England Journal of Medicine*, 326(15), 1029-1030. <https://doi.org/10.1056/NEJM199204093261516>
- Wu, F., Reed, A. A. C., Williams, S. E., Loh, N. Y., Lippiat, J. D., Christie, P. T., Large, O., Bettinelli, A., Dillon, M. J., Goldraich, N. P., Hoppe, B., Lhotta, K., Loirat, C., Malik, R., Morel, D., Kotanko, P., Roussel, B., Rubinger, D., Schrandt-Stumpel, C., ... Thakker, R. V. (2009). Mutational Analysis of CLC-5, Cofilin and CLC-4 in Patients with Dent's Disease. *Nephron Physiology*, 112(4), p53-p62. <https://doi.org/10.1159/000225944>

- Wu, F., Roche, P., Christie, P. T., Loh, N. Y., Reed, A. A. C., Esnouf, R. M., & Thakker, R. V. (2003). Modeling study of human renal chloride channel (hCLC-5) mutations suggests a structural-functional relationship. *Kidney International*, *63*(4), 1426-1432. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00859.x>
- Xing, D., Zhou, Q., Wang, Y., & Xu, J. (2023). Effects of Tauroursodeoxycholic Acid and 4-Phenylbutyric Acid on Selenium Distribution in Mice Model with Type 1 Diabetes. *Biological Trace Element Research*, *201*(3), 1205-1213. <https://doi.org/10.1007/s12011-022-03193-8>
- Xiong, H. Y., Alipanahi, B., Lee, L. J., Bretschneider, H., Merico, D., Yuen, R. K. C., Hua, Y., Gueroussov, S., Najafabadi, H. S., Hughes, T. R., Morris, Q., Barash, Y., Krainer, A. R., Jojic, N., Scherer, S. W., Blencowe, B. J., & Frey, B. J. (2015). The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science*, *347*(6218). <https://doi.org/10.1126/science.1254806>
- Yamamura, T., Nozu, K., Minamikawa, S., Horinouchi, T., Sakakibara, N., Nagano, C., Aoto, Y., Ishiko, S., Nakanishi, K., Shima, Y., Nagase, H., Rossanti, R., Ye, M. J., Nozu, Y., Ishimori, S., Morisada, N., Kaito, H., & Iijima, K. (2019). Comparison between conventional and comprehensive sequencing approaches for genetic diagnosis of Alport syndrome. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, *7*(9). <https://doi.org/10.1002/mgg3.883>
- Ye, W., & Chen, Q. (2022). Potential Applications and Perspectives of Humanized Mouse Models. *Annual Review of Animal Biosciences*, *10*(1), 395-417. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020420-033029>
- Yin, J., Kuang, Z., Mahankali, U., & Beck, T. L. (2004). Ion transit pathways and gating in CLC chloride channels. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *57*(2), 414-421. <https://doi.org/10.1002/prot.20208>
- Zamora, E., Lupón, J., Urrutia, A., González, B., Mas, D., Díez, C., Altimir, S., & Valle, V. (2007). Significado pronóstico del aclaramiento de creatinina en pacientes con insuficiencia cardiaca y creatinina sérica normal. *Revista Española de Cardiología*, *60*(12), 1315-1318. <https://doi.org/10.1157/13113938>
- Zaniew, M., Mizerska-Wasiak, M., Załuska-Leśniewska, I., Adamczyk, P., Kiliś-Pstrusińska, K., Haliński, A., Zawadzki, J., Lipska-Ziętkiewicz, B. S., Pawlaczyk, K., Sikora, P., Ludwig, M., & Szczepańska, M. (2017). Dent disease in Poland: what we have learned so far? *International Urology and Nephrology*, *49*(11), 2005-2017. <https://doi.org/10.1007/s11255-017-1676-x>

- Zatkova, A., Messiaen, L., Vandenbroucke, I., Wieser, R., Fonatsch, C., Krainer, A. R., & Wimmer, K. (2004). Disruption of exonic splicing enhancer elements is the principal cause of exon skipping associated with seven nonsense or missense alleles of NF1. *Human Mutation*, 24(6), 491-501. <https://doi.org/10.1002/humu.20103>
- Zdebik, A. A., Zifarelli, G., Bergsdorf, E.-Y., Soliani, P., Scheel, O., Jentsch, T. J., & Pusch, M. (2008). Determinants of Anion-Proton Coupling in Mammalian Endosomal CLC Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 283(7), 4219-4227. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708368200>
- Zeitlin, P. L., Diener-West, M., Rubenstein, R. C., Boyle, M. P., Lee, C. K. K., & Brass-Ernst, L. (2002). Evidence of CFTR Function in Cystic Fibrosis after Systemic Administration of 4-Phenylbutyrate. *Molecular Therapy*, 6(1), 119-126. <https://doi.org/10.1006/mthe.2002.0639>
- Zhang, C., Li, W.-H., Krainer, A. R., & Zhang, M. Q. (2008). RNA landscape of evolution for optimal exon and intron discrimination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(15), 5797-5802. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801692105>
- Zhang, Z., Lotti, F., Dittmar, K., Younis, I., Wan, L., Kasim, M., & Dreyfuss, G. (2008). SMN Deficiency Causes Tissue-Specific Perturbations in the Repertoire of snRNAs and Widespread Defects in Splicing. *Cell*, 133(4), 585-600. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.031>





# Anexo I

## Tablas y figuras

---



## 1. BLOQUE 1. EFECTO DE LAS MUTACIONES DE CAMBIOS DE SENTIDO EN EL GEN *CLCN5* SOBRE EL PRE-ARN<sup>m</sup> MEDIANTE EN-SAYOS CON MINIGENES

**Tabla A1.** Análisis bioinformático de las mutaciones del gen *CLCN5* para el análisis de su potencial efecto sobre el *splicing* del ARNm.

Exón	Cambio en aa	Cambio en nucleótido	Cambio en cDNA	Codón	Distancia del ss <sup>a</sup>	Coordenadas	Herramientas bioinformáticas		
							MutPredSplice <sup>b</sup> (puntuación)	SPANR	Human splicing finder
3	p.G57V	c.170G>T	GGC-GTC	57	-36	chr23:49837208G>T	VN (0.42)	No efecto	Nuevo sitio donador Nuevo sitio ESS Sitio ESE inactivado
3	p.W58L	c.173G>C	TGG-TGC	58	-33	chr23:49837211G>C	VN (0.3)	No efecto	Sitio ESE inactivado
3	p.W58C	c.174G>C	TGG-TTG	58	-32	chr23:49837212G>C	VN (0.23)	No efecto	No efecto
3	p.G65R	c.193G>A	GGG-AGG	65	-13	chr23:49837231G>A	VAS (0.76)	Efecto	Nuevo sitio aceptor
4	p.G88D	c.263G>A	GGT-GAT	88	+58	chr23:49840507G>A	VN (0.26)	No efecto	No efecto
4	p.G88V	c.263G>T	GGT-GTT	88	+58	chr23:49840507G>T	VN (0.36)	No efecto	Nuevo sitio donador Nuevo sitio ESS
4	p.C90W	c.270C>G	TGC-TGG	90	+65	chr23:49840514C>G	VN (0.13)	No efecto	No efecto
6	p.I176N	c.527T>A	ATC-AAC	176	+11	chr23:49846308T>A	VN (0.32)	No efecto	No efecto
6	p.G179D	c.536G>A	GGT-GAT	179	+20	chr23:49846317G>A	VN (0.44)	No efecto	Nuevo sitio donador
6	p.C219R	c.655T>C	TGC-CGC	219	-69	chr23:49846436T>C	VN (0.18)	No efecto	Sitio ESE inactivado

## Herramientas bioinformáticas

Exón	Cambio en aa	Cambio en nucleótido	Cambio en cDNA	Codón	Distancia del ss <sup>a</sup>	Coordenadas	Herramientas bioinformáticas		
							MutPredSplice <sup>b</sup> (puntuación)	SPANR	Human splicing finder
6	p.C221R	c.661T>C	TGT-CGT	221	-63	chr23:49846442T>C	VN (0.21)	No efecto	Sitio ESE inactivado
6	p.L225P	c.674T>C	CTG-CCG	225	-50	chr23:49846455T>C	VN (0.21)	No efecto	Sitio ESE inactivado
6	p.K231I	c.692A>T	AAA-ATA	231	-32	chr23:49846473A>T	VN (0.47)	No efecto	Sitio ESE inactivado
6	p.R239P	c.716G>C	CGC-CCC	239	-8	chr23:49846497G>C	VN (0.47)	No efecto	Sitio ESE inactivado
7	p.S244L	c.731C>T	TCG-TTG	244	+8	chr23:49850644C>T	VN (0.34)	Efecto	Nuevo sitio ESS
7	p.G250R	c.748G>C	GGT-CGT	250	+25	chr23:49850661G>C	VN (0.33)	No efecto	Sitio ESE inactivado Nuevo sitio ESS
7	p.G260V	c.779G>T	GGT-GTT	260	+26	chr23:49850692G>T	VN (0.34)	No efecto	Nuevo sitio donador
7	p.G261R	c.781G>A	GGA-AGA	261	-24	chr23:49850694G>A	VAS (0.93)	Efecto	Nuevo sitio ESS
7	p.L263F	c.789A>T	TTA-TTT	263	-16	chr23:49850702A>T	VN (0.37)	Efecto	No efecto
7	p.S265R	c.793A>C	AGC-CGC	265	-12	chr23:49850706A>C	VN (0.47)	No efecto	Sitio ESE inactivado
7	p.L266V	c.796C>G	CTT-GTT	266	-9	chr23:49850709C>G	VN (0.36)	No efecto	Sitio ESE inactivado
7	p.Q267A	c.800A>C	GAA-GCA	267	-5	chr23:49850713A>C	VN (0.44)	Efecto	Nuevo sitio ESS Sitio ESE inactivado
7	p.Q267D	c.801A>C	GAA-GAC	267	-4	chr23:49850714A>C	VN (0.49)	No efecto	Sitio ESE inactivado
7	p.Q267D	c.801A>C	GAA-GAC	267	-4	chr23:49850714A>C	VN (0.49)	No efecto	Sitio ESE inactivado

Exón	Cambio en aa	Cambio en nucleótido	Cambio en cDNA	Codón	Distancia del ss <sup>a</sup>	Coordenadas	Herramientas bioinformáticas		
							MutPredSplice <sup>b</sup> (puntuación)	SPANR	Human splicing finder
8	p.S270R	c.808A>C	AGC-CGC	270	+4	chr23:49850988A>C	VAS (0.63)	No efecto	No efecto
8	p.S270G	c.808A>G	AGC-GGC	270	+4	chr23:49850988A>G	VAS (0.66)	No efecto	No efecto
8	p.S270R	c.810C>G	AGC-AGG	270	+6	chr23:49850990C>G	VN (0.49)	No efecto	Sitio ESE inactivado
8	p.Y272N	c.814T>A	TAT-AAT	272	+10	chr23:49850994T>A	VN (0.29)	No efecto	No efecto
8	p.Y272C	c.815A>G	TAT-TGT	272	+11	chr23:49850995A>G	VN (0.35)	No efecto	No efecto.
8	p.F273L	c.817T>C	TTT-CTT	273	+13	chr23:49850997T>C	VN (0.27)	No efecto	No efecto
8	p.L278W	c.833T>G	TTG-TGG	278	+29	chr23:49851013T>G	VN (0.30)	No efecto	Nuevo sitio donador Nuevo sitio ESS Sitio ESE inactivado
8	p.L278S	c.833T>C	TTG-TCG	278	+29	chr23:49851013T>C	VN (0.14)	No efecto	Sitio ESE inactivado
8	p.L278F	c.834G>C	TTG-TTC	278	+30	chr23:49851014G>C	VN (0.13)	No efecto	Sitio ESE inactivado
8	p.R280P	c.839G>C	CGT-CCT	280	+35	chr23:49851019G>C	VN (0.14)	No efecto	Nuevo sitio ESS
9	p.G462S	c.1384G>A	GGT-AGT	462	+37	chr23:49853391G>A	VAS (0.62)	No efecto	Nuevo sitio aceptor / donador
9	p.G462D	c.1385G>A	GGT-GAT	462	+38	chr23:49853392G>A	VN (0.39)	No efecto	No efecto
9	p.G462V	c.1385G>T	GGT-GTT	462	+38	chr23:49853392G>T	VN (0.25)	No efecto	Nuevo sitio ESS

Exón	Cambio en aa	Cambio en nucleótido	Cambio en cDNA	Codón	Distancia del ss <sup>a</sup>	Coordenadas	Herramientas bioinformáticas		
							MutPredSplice <sup>b</sup> (puntuación)	SPANR	Human splicing finder
9	p.G466R	c.1396G>C	GGT-CGT	466	+49	chr23:49853403G>C	VN (0.24)	No efecto	No efecto
9	p.G466D	c.1397G>A	GGT-GAT	466	+50	chr23:49853404G>A	VN (0.20)	No efecto	No efecto
9	p.L468P	c.1403T>C	CTT-CCT	468	+56	chr23:49853410T>C	VN (0.12)	No efecto	No efecto
9	p.L469P	c.1406T>C	CTA-CCA	469	+59	chr23:49853413T>C	VN (0.12)	No efecto	Nuevo sitio ESS
9	p.G470R	c.1408G>A	GGA-AGA	470	+61	chr23:49853415G>A	VN (0.43)	No efecto	No efecto
9	p.Y502C	c.1505A>G	TAT-TGT	502	-30	chr23:49853512A>G	VN (0.18)	No efecto	Sitio ESE inactivado
9	p.M504K	c.1511T>A	ATG-AAG	504	-24	chr23:49853518T>A	VAS (0.70)	No efecto	Nuevo sitio aceptor / donador
9	p.V505G	c.1514T>G	GTT-GGT	505	-21	chr23:49853521T>G	VN (0.38)	No efecto	Nuevo sitio donador
9	p.G506R	c.1516G>A	GGG-AGG	506	-19	chr23:49853523G>A	VAS (0.67)	No efecto	Nuevo sitio aceptor / donador
9	p.G506Q	c.1517G>A	GGG-GAG	506	-18	chr23:49853524G>A	VN (0.24)	No efecto	Nuevo sitio aceptor
9	p.G512R	c.1534G>C	GGT-CGT	512	-1	chr23:49853541G>C	VAS (0.80)	No efecto	Sitio donador inactivado
10	p.G512D	c.1535G>A	GGT-GAT	512	+1	chr23:49854773G>A	VAS (0.81)	No efecto	No efecto
10	p.G513R	c.1537G>A	GGG-AGG	513	+3	chr23:49854775G>A	VAS (0.80)	No efecto	Nuevo sitio aceptor
10	p.G513Q	c.1538G>A	GGG-GAG	513	+4	chr23:49854776G>A	VAS (0.84)	No efecto	Nuevo sitio aceptor / donador

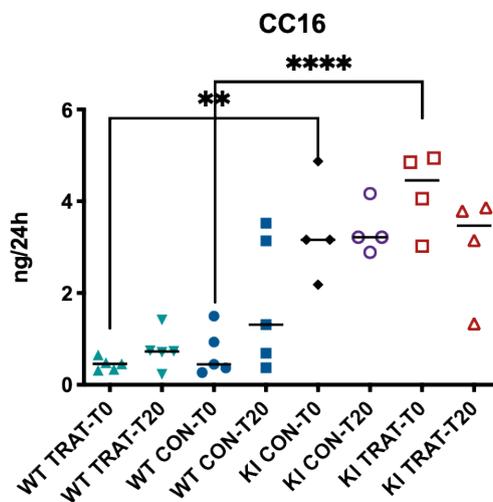
Exón	Cambio en aa	Cambio en nucleótido	Cambio en cDNA	Codón	Distancia del ss <sup>a</sup>	Coordenadas	Herramientas bioinformáticas		
							MutPredSplice <sup>b</sup> (puntuación)	SPANR	Human splicing finder
10	p.R516W	c.1546C>T	CGG-TGG	516	12	chr23:49854784C>T	VN (0.26)	No efecto	Nuevo sitio ESS
10	p.R516Q	c.1547G>A	CGG-CAG	516	13	chr23:49854785G>A	VN (0.32)	No efecto	Nuevo sitio ESS
10	p.T518A	c.1552A>G	ACT-GCT	518	18	chr23:49854790A>G	VN (0.34)	No efecto	Nuevo sitio ESS
10	p.V519D	c.1556T>A	GTT-GAT	519	22	chr23:49854794T>A	VN (0.26)	No efecto	No efecto
10	p.S520P	c.1558T>C	TCT-CCT	520	24	chr23:49854796T>C	VN (0.21)	No efecto	No efecto
10	p.L521F	c.1561C>T	CTT-TTT	521	27	chr23:49854799C>T	VN (0.37)	No efecto	No efecto
10	p.I524K	c.1571T>A	ATA-AAA	524	37	chr23:49854809T>A	VN (0.17)	No efecto	No efecto
10	p.Q527D	c.1581A>T	GAA-GAT	527	47	chr23:49854819A>T	VN (0.20)	No efecto	Sitio ESE inactivado
10	p.W547R	c.1639T>C	TGG-CCG	547	105	chr23:49854877T>C	VAS (0.81)	No efecto	No efecto
11	p.T657S	c.1970C>G	ACT-AGT	657	37	chr23:49855363C>G	VN (0.19)	No efecto	No efecto
11	p.F703S	c.2108T>C	TCC-CCC	703	-43	chr23:49855501T>C	VN (0.11)	No efecto	No efecto
11	p.L706P	c.2117T>C	CTG-CCG	706	-34	chr23:49855510T>C	VN (0.33)	No efecto	Sitio ESE inactivado
11	p.C711W	c.2133C>G	TGC-TGG	711	-18	chr23:49855526C>G	VN (0.17)	No efecto	Nuevo sitio ESS

**ESS:** sitio silenciador del *splicing* exónico; **ESE:** sitio potenciador del *splicing* exónico; **VAS:** variante que afecta a sitios de *splicing*; **VN:** variante neutral.

<sup>a</sup> Posición en relación con los sitios de *splicing* aceptores (+) o donadores (-).

<sup>b</sup> La puntuación general de MutPredSplice oscila entre 0,0 y 1,0, y una puntuación más alta indica una mayor probabilidad a ser patógeno.

## 2. BLOQUE 3. TRATAMIENTO DEL RATÓN KI *Clcn5*<sup>V523</sup> DEL CON ÁCIDO TAURORSODEOXICÓLICO (TUDCA)



**Figura A1.** Niveles de CC16 expresados en la orina de los ratones. Ratones WT y KI controles (CON) y tratados (TUDCA). T0: inicio del experimento; T20: final del experimento. \* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,001$ .

	KI+CON+T0	KI+CON+T20	KI+TUDCA+T0	KI+TUDCA+T20
CC16 (mg/24h)	3,34 ± 1,18 (n=4)	3,37 ± 0,55 (n=4)	4,22 ± 1,11 (n=4)	3,03 ± 1,17 (n=4)

KI no tratados (CON) y tratados (TUDCA); T0: inicio del experimento; T20: final del experimento. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Las diferencias fueron estimadas mediante un T-test de muestras no pareadas. Datos mostrados en forma de media ± desviación estándar.







# Anexo II Medios



## MEDIOS

### 1. Composición de medio SOB (Sambrook *et al.*, 2001)

- 0,5% de extracto de levadura
- 2% de triptona
- 10 mM de NaCl
- 2,5 mM de KCl
- Ajustar a pH 7
- Autoclavar
- Añadir stock de  $Mg^{2+}$  2M preparado previamente y esterilizado mediante filtración.

### 2. Composición del stock de $Mg^{2+}$ 2M

- 1M de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
- 1M de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

### 3. Composición de medio SOC (Sambrook *et al.*, 2001)

- Se añade al medio SOB, glucosa estéril a una concentración final de 20 mM.

### 4. Composición del medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 2001)

- 10 g de Triptona
- 5 g de Levadura
- 10 g de NaCl
- Añadir agua hasta 1 L
- Ajustar pH7

### 5. Composición de medio LB-agar

- Se añadió 15 g de agua al LB preparado, antes de ser esterilizado mediante autoclave.

### 6. Composición del ITB (Ice-cold TB) (Ionue *et al.*, 1990)

- 10 mM PIPES
- 15 mM  $CaCl_2$
- 250 mM de KCl
- Ajustar el pH a 6,7
- Esterilizar por filtración





# Anexo III Publicaciones

---





Article

# Characterization of pre-mRNA Splicing Defects Caused by *CLCN5* and *OCRL* Mutations and Identification of Novel Variants Associated with Dent Disease

Glorián Mura-Escorche <sup>1,2</sup>, Ana Perdomo-Ramírez <sup>1</sup> , Elena Ramos-Trujillo <sup>1,3,\*</sup>, Carmen Jane Trujillo-Frías <sup>1</sup> and Félix Claverie-Martín <sup>1,\*</sup> on behalf of the RenalTube Group

<sup>1</sup> Unidad de Investigación, Grupo RenalTube, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, 38010 Santa Cruz de Tenerife, Spain; glorianmuraescorche@gmail.com (G.M.-E.); atter\_rad@hotmail.com (A.P.-R.); ctrufrix@gobiernodecanarias.org (C.J.T.-F.)

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Interna, Dermatología y Psiquiatría, Facultad de Medicina, Universidad de la Laguna, 38071 Santa Cruz de Tenerife, Spain

<sup>3</sup> Departamento de Medicina Física y Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de la Laguna, 38071 Santa Cruz de Tenerife, Spain

\* Correspondence: eramostr@ull.edu.es or eramostrujillo@gmail.com (E.R.-T.);

fclamar@gobiernodecanarias.org or fclamar@gmail.com (F.C.-M.);

Tel.: +34-922600080 (E.R.-T.); +34-922600546 (F.C.-M.)

† Membership of the RenalTube Group is provided in the Acknowledgments.

**Abstract:** Dent disease (DD) is an X-linked renal tubulopathy characterized by low-molecular-weight proteinuria, hypercalciuria, nephrocalcinosis, nephrolithiasis and progressive renal failure. Two-thirds of cases are associated with inactivating variants in the *CLCN5* gene (Dent disease 1, DD1) and a few present variants in the *OCRL* gene (Dent disease 2, DD2). The aim of the present study was to test the effect on the pre-mRNA splicing process of DD variants, described here or in the literature, and describe the clinical and genotypic features of thirteen unrelated patients with suspected DD. All patients presented tubular proteinuria, ten presented hypercalciuria and five had nephrolithiasis or nephrocalcinosis. *CLCN5* and *OCRL* genes were analyzed by Sanger sequencing. Nine patients showed variants in *CLCN5* and four in *OCRL*; eight of these were new. Bioinformatics tools were used to select fifteen variants with a potential effect on pre-mRNA splicing from our patients' group and from the literature, and were experimentally tested using minigene assays. Results showed that three exonic missense mutations and two intronic variants affect the mRNA splicing process. Our findings widen the genotypic spectrum of DD and provide insight into the impact of variants causing DD.

**Keywords:** Dent disease; *CLCN5*; *OCRL*; minigene system; bioinformatics analysis; Pre-mRNA splicing



**Citation:** Mura-Escorche, G.;

Perdomo-Ramírez, A.; Ramos-Trujillo,

E.; Trujillo-Frías, C.J.; Claverie-Martín,

F., on behalf of the RenalTube Group.

Characterization of pre-mRNA

Splicing Defects Caused by *CLCN5*

and *OCRL* Mutations and

Identification of Novel Variants

Associated with Dent Disease.

*Biomedicines* **2023**, *11*, 3082. [https://](https://doi.org/10.3390/biomedicines11113082)

[doi.org/10.3390/biomedicines11113082](https://doi.org/10.3390/biomedicines11113082)

Academic Editor: Paola Pontrelli

Received: 29 September 2023

Revised: 8 November 2023

Accepted: 13 November 2023

Published: 17 November 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article

distributed under the terms and

conditions of the Creative Commons

Attribution (CC BY) license ([https://](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

[creativecommons.org/licenses/by/](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

[4.0/](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)).

## 1. Introduction

Dent disease (DD) is a rare X-linked tubulopathy that affects the function of the proximal tubule [1–3]. Histological studies of DD kidney biopsies have shown glomerular damage, and recent findings indicate that DD should also be considered as a podocytopathy [4]. The main characteristics of DD include low-molecular-weight proteinuria (LMWP), hypercalciuria, nephrocalcinosis, nephrolithiasis and progressive renal failure [1–3]. DD usually presents in children or young adults, and 30 to 80% of males affected will develop chronic kidney disease (CKD) between 30 and 50 years of age [1,2]. In addition, other manifestations indicative of dysfunction of the proximal tubule may occur, such as aminoaciduria, glucosuria, hyperphosphaturia, caliuresis and uricosuria, giving rise to a partial Fanconi syndrome [5]. A minority of patients develop rickets or osteomalacia [6,7]. In the case of female carriers, the phenotype is usually mild, rarely presenting nephrocalcinosis or chronic renal failure, probably due to the random inactivation of one of the two X chromosomes [5,8,9].

DD has been associated with alterations in two genes, both located on the X chromosome: *CLCN5* and *OCRL* [10,11]. *CLCN5* encodes the electrogenic chloride/proton exchanger CIC-5, which is mainly expressed in the kidney and participates in the endocytic reabsorption of low-molecular-weight proteins in the proximal tubular cells [12–14]. CIC-5 is a 746-amino-acid protein that expresses mainly in the epithelial cells of the kidney [15]. Its complex three-dimensional structure was deduced from high-resolution crystal structures of two homologous bacterial CIC exchangers (EcCIC, from *E. coli*, and StCIC from *S. typhimurium*). It has been suggested that CIC-5 functions as a homodimer, where each subunit serves as a pore and contains 18  $\alpha$ -helices (named A to R), arranged in such way that different residues come near each other to configure the Cl<sup>-</sup> selectivity filter, which is formed mainly by helices D, F, N and R.  $\alpha$ -helices B, G, H, I, P and Q form the interface between the two monomers [12,16]. Each CIC-5 monomer has a long cytoplasmic region including two cystathionine beta-synthase (CBS) domains [17,18] which are known to bind nucleotides and regulate the activity of other proteins [19,20]. It has been shown that variants located in these domains in CIC-5 are pathogenic, most of them affecting its electrical activity [16,21]. Between both CBS domains, CIC-5 also carries a PY-motif that binds WW domains of ubiquitin-ligases and modulates its retention in the plasma membrane [22]. DD caused by genetic changes in the *CLCN5* gene is known as Dent disease-1 (DD1) (OMIM #300009).

The *OCRL* gene, previously associated with Lowe's oculocerebrorenal syndrome, encodes an inositol polyphosphate-5-phosphatase (OCRL1), located in the Golgi apparatus and in early endosomes, that may play a role in trafficking and cellular endocytosis [23–25]. *OCRL* is expressed in practically all tissues, except in hematopoietic cells, [26] and through all segments of the nephron [27]. The OCRL1 protein has three conserved domains: a central inositol-5-phosphatase domain, an ASH motif binding to various Rab-GTPases and necessary for the correct targeting of OCRL1 towards the Golgi apparatus and endosomes, and a catalytically inactive Rho GAP-like domain at the C-terminus [28]. Connected through a short linker to the 5-phosphatase is a PH (pleckstrin homology) domain at the N-terminus of OCRL1 that cannot directly bind to phosphoinositide-containing liposomes [29]. DD caused by genetic changes in *OCRL* is known as Dent disease-2 (DD2) (OMIM #300555). In a retrospective analysis of phenotypes and genotypes of DD2 patients, Gianessello et al. found that truncating variants map in the PH and linker domain, while missense variants map in the inositol-5-phosphatase domain, and only occasionally in the ASH-RhoGAP module. They also observed that truncating variants located at the 5' end of the *OCRL* gene appeared to cause the least severe phenotypes [30]. *CLCN5* variants are present in approximately 60% of patients, whereas *OCRL* variants are found in only 15% of patients. About 25% of DD patients do not harbor changes in either of these genes, and the genetic cause of these cases remains unidentified [1].

Understanding the effect of mutations on molecular processes is essential in order to establish genotype–phenotype correlations, which are lacking in DD. However, results of a recent study suggest that DD1 characteristics such as the risk of nephrolithiasis and progression to kidney failure are associated with the degree of remaining CIC-5 function [31].

It was long assumed that missense variants only changed one amino acid for another, and that synonymous variants had no effect on the protein at all. However, in the last two decades, it has become evident that presumed missense and synonymous variants can also affect the splicing of messenger RNA precursors (pre-mRNA), thus potentially having a much more severe effect on the function and expression of a protein [32–34]. Pre-mRNA splicing is the process by which introns are removed and exons are accurately joined together to generate mature mRNAs for the synthesis of proteins [35]. This process is regulated by splicing factors that bind sequences in the pre-mRNA, including the donor and acceptor splice sites, the branch point, the polypyrimidine track, exonic splicing enhancers (ESEs) and silencers (ESSs) and intronic splicing enhancers (ISEs) and silencers (ISSs) [36–39]. Disruption of these sequences can lead to defects in the mRNA molecules

such as whole exon skipping, loss of an exon fragment or inclusion of an intron sequence, causing disease [39–44]. In fact, between 15 and 50% of all pathogenic variants have been shown to alter splice sites and splicing regulatory elements [45]. In the present study, we analyzed 13 new cases with a clinical diagnosis of DD and investigated the effect of selected variants on the splicing of the pre-mRNA.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Patients

Thirteen unrelated male patients diagnosed with DD and 27 of their relatives were investigated. Ten of these patients were from Spain, two were from Cuba and one was from Uruguay. Criteria for DD diagnosis were LMWP, defined by excessive urinary loss of  $\beta$ 2-microglobulin, or total proteinuria, and at least one of the other features of DD, like hypercalciuria, defined by  $>4$  mg/kg/d, and nephrocalcinosis/nephrolithiasis. The age for clinical diagnosis ranged from 0.8 to 19 years.

This study was approved by the Ethics Committee of Nuestra Señora de Candelaria University Hospital (Santa Cruz de Tenerife, Spain), and written informed consent for the genetic analysis was obtained from all patients and/or their parents.

### 2.2. DNA Extraction, Amplification and Sequencing Analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples using the GenElute Blood Genomic DNA kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) according to the manufacturer's instructions. Coding exons and flanking intronic sequences of *CLCN5* and *OCRL* were amplified by polymerase chain reaction (PCR) as described previously [7,11]. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis, and the fragments were purified with the NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). DNA sequencing was performed by MacroGen Spain (Madrid, Spain). Variants were identified by comparison to the respective reference sequences (GenBank accession numbers NG\_007159.3 (Transcript: ENST00000307367.2) and NG\_008638.1 (Transcript: ENST00000371113.9) for *CLCN5* and *OCRL*, respectively) using the bioinformatics program Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (available online: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, accessed on 20 September 2019) and confirmed by sequencing additional independent amplification products. Several databases of genetic variants, including the Genome Aggregation Database v2.1.1 (gnomAD) (available online: <https://gnomad.broadinstitute.org/>, accessed on 5 June 2023) [45], 1000 Genomes Project (available online: <http://www.1000genomes.org/>, accessed on 5 June 2023) [46], dbSNP (available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>, accessed on 5 June 2023) [47] and Human Gene Mutation Database (HGMD), (Available on: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>, accessed on 5 June 2023) [48], were queried for the presence of the new variants identified.

### 2.3. In Silico Prediction Analysis and Criteria for Variant Selection

Missense *CLCN5* variants were selected (see selection criteria below) from the literature and from the HGMD database [48,49]. We also included *CLCN5* and *OCRL* variants identified in our new patients. These variants were analyzed using bioinformatics tools to predict their pathogenicity and their potential effects on splicing (Tables S2 and S3). Nucleotide numbering was based on the *CLCN5* and *OCRL* cDNA sequences (GeneBank accession number NM\_000084.5 and NM\_000276.3, respectively), with c.1 denoting the first position of the translation start codon. The criteria for selection of variants with potential effect in pre-mRNA processing were (a) proximity to splice sites (less than 70 nucleotides from the donor or acceptor splice sites) and (b) potential effect on pre-mRNA splicing predicted by at least two out of three bioinformatics tools. The following bioinformatics tools were used: MutPredSplice v1.3.2 (available online: <http://www.mutpredsplice.org/>, accessed on 20 October 2019) [50], splicing-based analysis of variants (SPANR) (available online: <http://tools.genes.toronto.edu/>, accessed on 15 November 2019) [51] and Human Splicing Finder (HSF) v3.1 [52] (available on-

line: <https://hsf.genomnis.com/>, accessed on 10 August 2023). In addition, we used other bioinformatics tools like Splice Site Prediction by Neural Network v0.9 (NNSplice) (available online: [https://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html), accessed on 20 July 2020) [53], CADD-splice v.1.6 (Combined Annotation Dependent Depletion) (available online: <https://cadd.gs.washington.edu/>, accessed on 20 February 2022) [54] and SpliceAI v1.3.1 (available online: <https://spliceailookup.broadinstitute.org/>, accessed on 2 November 2023) [55].

The effect of amino acid substitutions on the CIC-5 and OCRL1 proteins was predicted using the following bioinformatics tools: PolyPhen-2 (Available online: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>, accessed on 22 June 2022) [56], SIFT v6.2.1 (available online: <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>, accessed on 22 June 2022) [57] and MutPred2 (available online: <http://mutpred.mutdb.org/>, accessed on 30 November 2022) [58] to predict whether an amino acid substitution in a protein would have a phenotypic effect. Multiple sequence alignment of proteins was performed using Clustal Omega v1.2.4 (available online: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>, accessed on 30 January 2023) [59]. The pathogenicity of variants was also determined using the VarSome suite v11.5 (available online: <https://varsome.com/>, accessed on 15 December 2022) [60]. According to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) recommendations, variants were classified into five categories, such as pathogenic, likely pathogenic, uncertain significance, likely benign and benign [61].

#### 2.4. Amplification of *CLCN5* and *OCRL* Genomic Fragments and Construction of Minigenes

The effect of *CLCN5* and *OCRL* variants on pre-mRNA splicing was evaluated using a minigene system and reverse transcription-PCR (RT-PCR) analysis. For the construction of *CLCN5* minigenes, four fragments containing exons 3, 7, 9 and 10–11 and their flanking intronic sequences were cloned separately in the pET01 expression vector (MoBiTec, Göttingen, Germany) (intron 2 (172 bp)-exon 3 (100 bp)-intron 3 (85 bp) (pET01ex3-WT); intron 6 (196 bp)-exon 7 (81 bp)-intron 7 (140 bp) (pET01ex7-WT); intron 8 (104 bp)-exon 9 (187 bp)-intron 9- (133 bp) (pET01ex9-WT); and intron 9 (162 bp)-exon 10 (399 bp)-intron 10 (155 bp)-exon 11 (217 bp)-intron 11-(149) (pET01ex10-11). These fragments were amplified by PCR from genomic DNA extracted from patients and/or controls (Table S1). For *OCRL* minigenes, two fragments containing exons 11–12 and 15 and flanking intronic sequences (intron 10 (84 bp)-exon 11 (117 bp)-intron 11 (98 bp)-exon 12 (188 bp)-intron 12 (84 bp) (pET01ex11-12WT) and intron 14 (24 bp)-exon 15 (336 bp)-intron 15 (40 bp) (pET01ex15WT)) were amplified from the genomic DNA of the patients and a healthy control.

Primers were designed using Primer3 v0.4.0 (Available online: <https://primer3.ut.ee/>, accessed on 20 October 2019) and SnapGene software v5.0.4 (Available online: [www.snapgene.com](http://www.snapgene.com), accessed on 25 October 2019). Primers contained sequences encoding restriction sites for *XhoI*, *XbaI* and *BamHI* at their 5' ends. PCR reactions were carried out using a Kapa Taq PCR kit (Kapa Biosystems—Hoffman-La Roche, Wilmington, MA, USA). After digestion with restriction enzymes *XhoI*, *XbaI* or *BamHI* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), PCR products were cloned using T4 DNA ligase (Kapa Biosystems), according to the manufacturer's instructions, into the pET01 previously digested with the respective restriction enzymes. Ligation products were transformed into XL1 Blue competent cells by heat-shock and grown in Luria-Bertani Broth (LB) agar plates supplemented with ampicillin. Colonies carrying recombinant plasmids were grown overnight in LB medium with ampicillin at 37 °C. Plasmid DNA extraction was carried out with a NucleoSpin Plasmid EasyPure kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), and recombinant plasmids were analyzed by sequencing (Macrogen Spain, Madrid, Spain).

#### 2.5. Site-Direct Mutagenesis

*CLCN5* mutations were introduced in the respective minigenes using the QuickChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) following the manufacturer's recommendations. Reaction products were transformed

into XL10-Gold ultracompetent cells. Primers for mutagenesis were designed using the bioinformatics tool QuickChange<sup>®</sup> Primer Design Program (available online: <https://www.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp>, accessed on 20 October 2019) according to the guidelines described in the QuickChange<sup>®</sup> commercial kit (Table S1). To confirm the presence of the desired mutation, all constructs were analyzed by directed sequencing using the same primers used for the amplification of each fragment.

### 2.6. Cell Culture, Transient Transfection and RT-PCR Assay

COS7 and HEK293T cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) with high glucose (4.5 g/L), supplemented with 10% foetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin and incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator. Minigenes were transfected using JetPRIME (Polyplus Transfection, Illkirch, France), according to the manufacturer's instructions. After 24h, RNA was extracted and purified using the NucleoSpin RNA mini kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and quantified with Nanodrop Lite (Thermo Fisher Scientific). cDNA synthesis was performed with an iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and second strands were amplified by PCR with a Kapa Taq PCR kit (Kapa Biosystems-Hoffman-La Roche) and DreamTaq polymerase (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc.) using primers ETprim02 and ETprim03 (MoBiTech, Göttingen, Germany). Products were analyzed by agarose gel electrophoresis with the molecular weight marker SiZer-100bp DNA Marker (IntRon Biotechnology DR, Gyeonggi, Republic of Korea) and sequenced as mentioned before. The exact size of each product was determined from the DNA sequences, which were compared to the reference *CLCN5* or *OCRL* sequences (GenBank accession number NC\_000023.10 and NM\_000084.5 or NC\_000023.11 and NM\_000276.3, respectively).

## 3. Results

### 3.1. Identification of Novel *CLCN5* and *OCRL* Variants in Patients Diagnosed with Dent Disease

Clinical data of patients included in this study and the variants identified are summarized in Table 1. All patients had LMWP, ten had hypercalciuria, and five presented nephrolithiasis or nephrocalcinosis. Patient P422 also showed other symptoms as hypotonia, attention-deficit disorder and growth hormone deficit. P854 manifested hyperaminoaciduria. Patient P508 showed developmental delay and congenital cataracts.

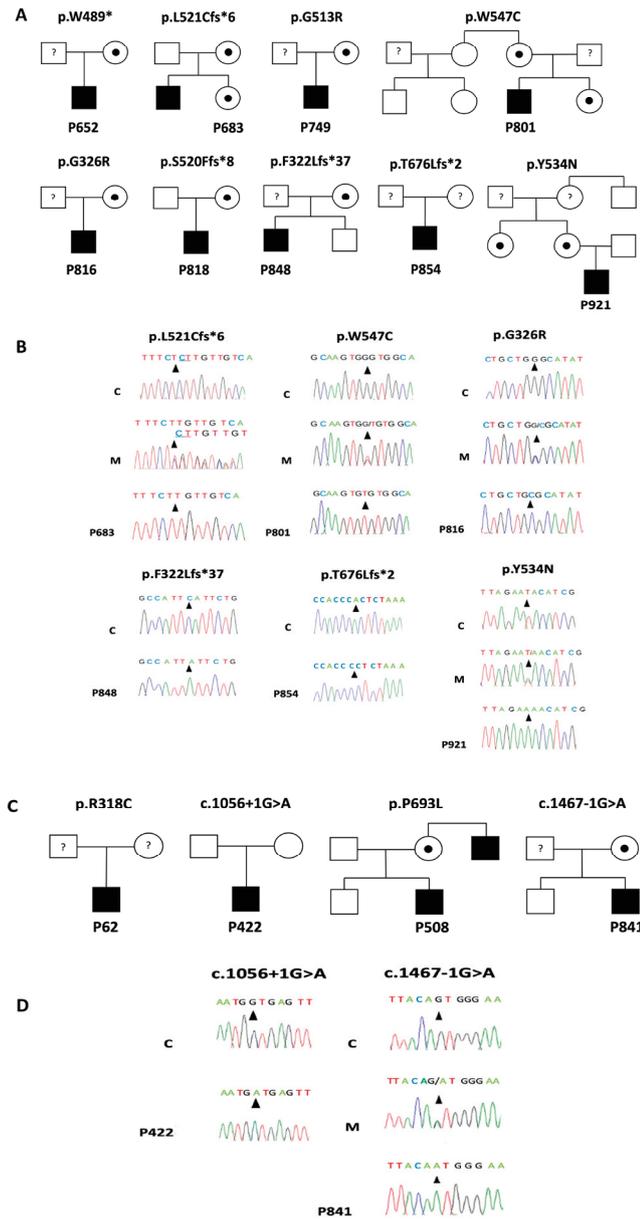
Sequence analysis revealed nine *CLCN5* variants (four missense, four frameshift and one nonsense variant) (Table 1) (Figure 1), six of which were not present in genomic variant databases (HGMD, dbSNP, gnomAD and 1000 Genomes Project) (c.1641G>T; p.(W547C), c.976G>C; p.(G326R), c.1600T>A; p.(Y534N), c.2026delA; p.(T676Lfs\*2), c.1560\_1561delTC; p.(L521Cfs\*6) and c.966delC; p.(F322Lfs\*37)). Four variants were found in the *OCRL* gene (two missense and two intronic variants), two of which were not found in the genomic variant databases mentioned above (c.1056+1G>A and c.1467-1G>A). Novel variants were submitted to the ClinVar database and were included with the following accession numbers: VCV000930215.1 (c.1641G>T); VCV001210259.1 (c.976G>C), VCV000973833.1 (c.1600T>A), VCV000932946.1 (c.2026delA), VCV000932943.1 (c.1560\_1561delTC), VCV000932948.1 (c.966delC), VCV000932947.1 (c.2078C>T), VCV002506950.1 (c.1056+1G>A) and VCV002504612.1 (c.1467-1G>A). In ten families, we showed that the patients' mothers were carriers of the respective *CLCN5* and *OCRL* variant (Figure 1). In the other families, blood samples of the parents were not available for genetic analysis.

**Table 1.** Clinical and genetic data of patients diagnosed with Dent disease.

Patient	Age <sup>1</sup> (Years)	LMWP	HC	NL/NC	Other Symptoms	Variant	Gene	Reference
P62	15	+	+	+	–	c.952C>T; p.(R318C)	OCRL	[11]
P422	3	+	+	+	Hypotonia, ADD, GH deficit	c.1056+1G>A	OCRL	This study
P508	3.5	+	+	–	Developmental delay, congenital cataracts	c.2078C>T; p.(P693L)	OCRL	[62]
P652	12	+	+	–	–	c.1466G>A; p.(W489*)	CLCN5	[63]
P683	7	+	+	+	–	c.1560_1561delTC; p.(L521Cfs*6)	CLCN5	This study
P749	0.8	+	–	–	–	c.1537G>A; p.(G513R)	CLCN5	[64]
P801	6.5	+	+	+	–	c.1641G>T; p.(W547C)	CLCN5	This study
P816	19	+	+	–	–	c.976G>C; p.(G326R)	CLCN5	This study
P818	15	+	+	–	–	c.1558_1559insT; p.(S520Ffs*8)	CLCN5	[65]
P841	2.7	+	+	+	–	c.1467 – 1G>A	OCRL	This study
P848	10.5	+	+	–	–	c.966delC; p.(F322Lfs*37)	CLCN5	This study
P854	1.2	+	–	–	Hyperaminoaciduria	c.2026delA; p.(T676Lfs*2)	CLCN5	This study
P921	0.8	+	–	–	–	c.1600T>A; p.(Y534N)	CLCN5	This study

<sup>1</sup> Age at diagnosis. LMWP, low-molecular-weight proteinuria; HC, hypercalciuria; NL, nephrolithiasis; NC, nephrocalcinosis; +, present; –, absent; ADD, attention-deficit disorder; GH, growth hormone.

The three novel *CLCN5* missense variants, c.1641G>T; p.(W547C), c.976G>C; p.(G326R), and c.1600T>A; p.(Y534N), affect residues conserved through evolution and are predicted to affect protein function (Figure 2). VarSome analysis classified variant p.(G326R) as of uncertain significance according to the pathogenicity criteria established by the ACMG (Table S2), while variants p.(Y534N) and p.(W547C) were classified as likely pathogenic (Table S2). Variant p.(G326R) affects an amino acid residue located in  $\alpha$ -helix J of the CIC-5 protein, whereas p.(Y534N) and p.(W547C) disturb residues located in  $\alpha$ -helix Q (Figure 2). Analysis of c.976G>C; p.(G326R) and c.1600T>A; p.(Y534N) with HSF, SPARN and SpliceAI indicated that these changes have no impact on the pre-mRNA splicing process (Table S2). According to CADD, splice variant p.(W547C) seems to affect pre-mRNA splicing, and HSF predicts that this variant generates a cryptic donor site (Table S2). The other three novel *CLCN5* variants, p.(L521Cfs\*6), p.(F322Lfs\*37) and p.(T676Lfs\*2), are single nucleotide deletions that change the open reading frame and result in the generation of premature stop codons after 5, 36 and 1 amino acids, respectively (Figure 1B). VarSome classified these frameshift variants as pathogenic (Table S2). These variants are located in  $\alpha$ -helix K,  $\alpha$ -helix J and residues located between the CBS-1 and CBS-2 domains, respectively.



**Figure 1.** Segregation and electropherograms of the detected *CLCN5* and *OCRL* variants. (A) Pedigrees of families with *CLCN5* variants; (B) Electropherograms showing the new *CLCN5* variants; (C) Pedigrees of families with *OCRL* variants; (D) Electropherograms showing the new *OCRL* variants. Circles with a dot in the center indicate female carriers; open circles are unaffected females; filled squares are affected males; open squares are unaffected males; question marks inside circles and squares indicate unanalyzed individuals. The arrowheads indicate the nucleotide position affected; M = Heterozygous mother; C = Normal controls.

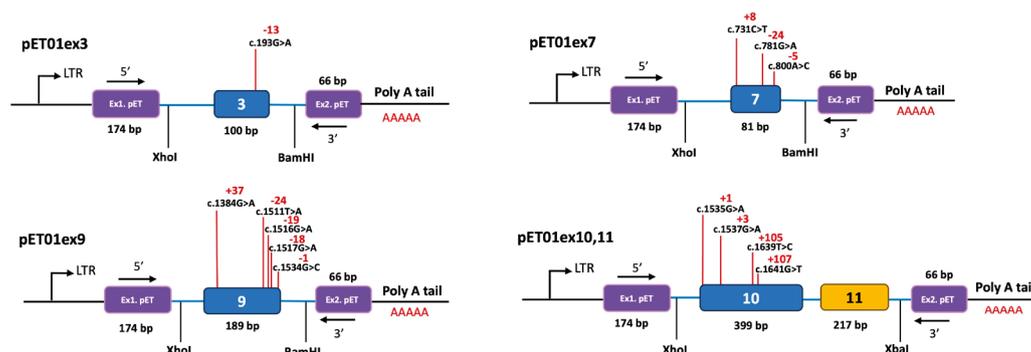


with bioinformatics tools SIFT, PolyPhen2 and MutPred2 predict amino acid substitutions that affect the function of the CLC-5 protein (Table S4). According to VarSome, these changes are likely pathogenic, except p.(G65R), which was classified as of uncertain significance. Predictions at the mRNA level for these variants included the generation of new donor or acceptor splice sites, the inactivation of a donor splice site and the generation or inactivation of ESS or ESE sites (Table S4).

### 3.3. Functional Analysis of Variants

#### 3.3.1. Minigene Analysis of *CLCN5* Variants

We tested the effect on pre-mRNA splicing of the twelve variants selected using a minigene system. In this analysis, we also included presumed missense variant c.1641G>T; p(W547C), identified in exon 10 of one of our patients, which was predicted to affect protein function and pre-mRNA splicing (Table S2). Figure 3 shows the organization of each construction. We observed RT-PCR products with the expected size in each control construction carrying the WT sequences (Figure 4). Only three of the twelve variants analyzed (c.1535G>A, c.1537G>A and c.1641G>T) showed RT-PCR products different from the WT (Figure 4).

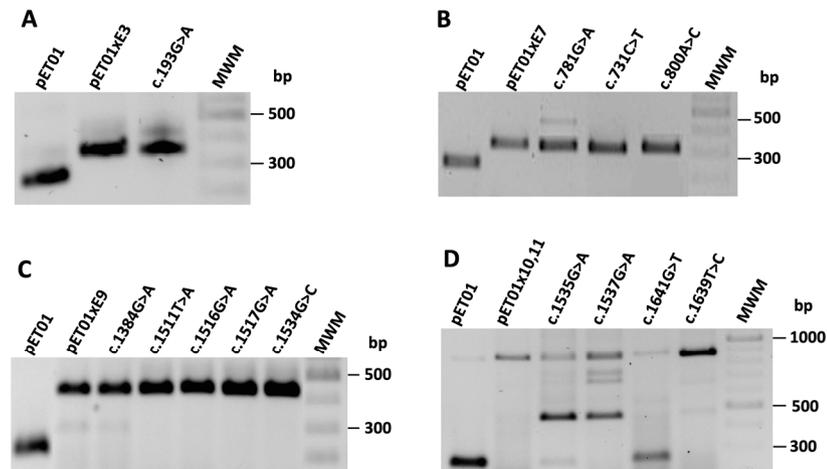


**Figure 3.** Schematic representation of minigene constructions. *CLCN5* exons are flanked by pET01 exons 1 (5' end) and 2 (3' end) followed by a polyadenylation site (poly A tail). Red lines indicate the locations of mutations introduced by site-direct mutagenesis. The sizes of *CLCN5* and pET01 exons are indicated. Numbers in red indicate the positions of mutations with respect to acceptor (+) or donor (-) sites. Restriction sites for *XhoI*, *BamHI* and *XbaI* are also shown. LTR, long terminal repeat promoter of the Rous Sarcoma Virus.

#### Variants c.1535G>A, c.1537G>A and c.1641G>T Alter pre-mRNA Splicing of *CLCN5*

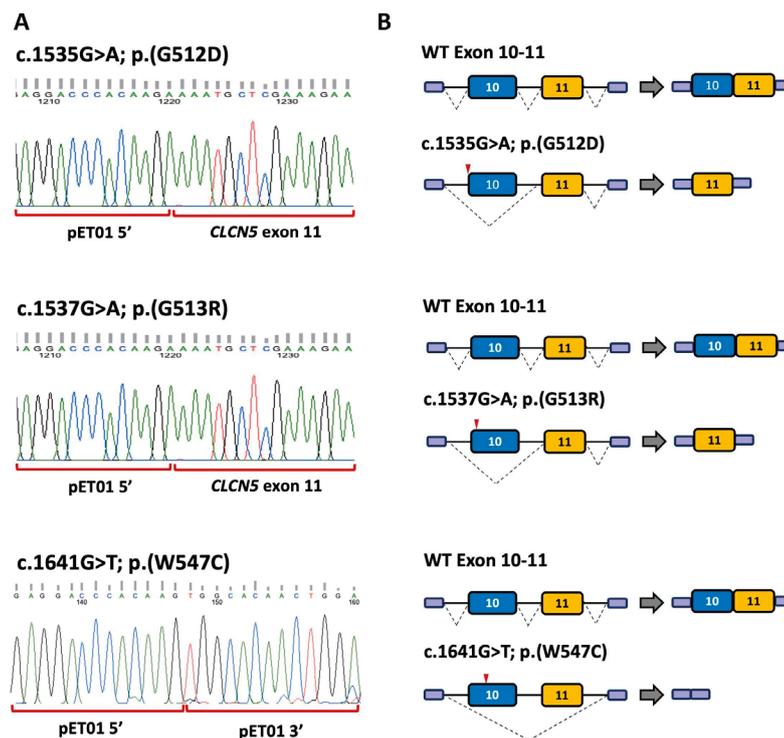
*CLCN5* variant c.1535G>A; p.(G512D) (Table S3 and Figure 3) changes the first nucleotide of exon 10 (tgcag**GT**GGGG; the nucleotide affected by the variants appears in bold letter, and the AG motif of the acceptor splice site in intron 9 is underlined. Intronic and exonic sequences are in small and capital letters, respectively, throughout the text). MutPredSplice and CADD-splice predictions indicated that c.1535G>A alters the acceptor splice site (Table S4). However, analysis with NNsplice showed that the acceptor splice site score changes very slightly (0.99 to 0.98), and SpliceAI does not predict any changes (Table S4). To investigate the effect of this variant, we created a minigene containing exons 10 and 11 and their flanking intronic sequences (pET01ex10-11) (Figure 3). The WT and mutant minigenes were transfected separately into HEK293T and COS7 cells, and RT-PCR analysis was performed. The results revealed a different band pattern in the electrophoresis in the WT and mutant minigene. The WT construction generated the expected splicing product with a size of 850 bp, whereas the mutant minigene generated two splicing products: a faint band of 850 bp, consistent with the WT transcript; and a band of approximately 450 bp (Figure 4D). Direct sequencing showed that the smaller product lacked exon 10 and

corresponded to the pET01 exons 5' and 3' (Figure 5). Analysis with the HSF tool showed that c.1535G>A creates several overlapping splicing silencer motifs, including one Sironi motif 1 (gcagATGG), two Sironi motif 2 (agATGGG and gATGGGG) and one hnRNP1 binding site (gATGGG) (Figure S1, Table S5). c.1535G>A also generates two FAS-hex3 hexamers gATGGG and ATGGGG [65]. The binding of splicing repressors to these sites could inhibit the recognition of the acceptor splice site by the splicing machinery, causing exon 10 skipping.



**Figure 4.** Representative agarose gels showing the results of the RT-PCR analysis of spliced transcripts expressed from *CLCN5* minigenes containing WT and mutant exons. None of the mutations located in exons 3, 7 and 9 showed altered mRNA products (A–C). (D) Mutations in exons 10 (c.1535G>A, c.1537G>A and c.1641G>T) generated mRNA products of the same size as the WT together with altered products.

Variant c.1537G>A; p.(G513R), identified in one of our patients (Tables 1 and S2), is located at position +3 of exon 10 (tgcagGTAGGG). Analysis with MutPredSplice, CADD-splice and SpliceAI suggested that it could alter *CLCN5* pre-mRNA splicing (Tables S3 and S4). NNSplice analysis showed the same score for the acceptor splice site with and without the mutation (0.99). To investigate the consequences of c.1537G>A in pre-mRNA splicing, we used the minigene containing exons 10 and 11 (Figure 3). The WT and mutant minigenes were transfected separately into HEK293T and COS7 cells, and the mRNA products were examined by RT-PCR. Direct sequencing showed that the mutant minigene generated a 450 bp product corresponding to the skipping of exon 10 and a band of approximately 850 bp corresponding to the WT product (Figures 4D and 5). Two additional bands of approximately 700 bp and 750 bp were observed (Figure 4D), but we were unable to separate them for sequence analysis. HSF showed the presence in the mutant sequence of overlapping ESS motifs, including a Sironi motif 2 (GTAGGGT) and an hnRNP1 binding site (TAGGGTG) (Figure S1 and Table S5). Additionally, this region contains three overlapping FAS-hex3 hexamers (GGTAGG, TAGGGT and AGGGTG) not present in the WT sequence [65]. Binding of splicing repressors to these sites could explain exon 10 skipping in our minigene system.



**Figure 5.** (A) DNA sequencing of the altered RT-PCR products from exon 10–11 constructions with mutations c.1535G>A; p.(G512D), c.1537G>A; p.(G513R) and c.1541G>T; p.(W547C) (B) Schematic representation of pre-mRNA splicing in WT and mutant minigenes of exon 10–11 construction. Red arrowheads indicate the location of the variant.

Variant c.1641G>T; p.(W547C), also found in one of our patients, is located in position +107 from the 5' end of exon 10 (Table S2). Analysis of the mutant sequence with CADD-splice suggested an effect on pre-mRNA splicing, but SpliceAI predicted no changes in the splice sites (Table S2). As expected, this variant did not change the NNSplice score of the WT acceptor splice site (0.99). Analysis with the HSF tool identified the presence of three Sironi motifs 2 (AGTGTGT, TGTGTGG and TGTGGCA) (Figure S1 and Table S5). Overlapping these motifs is a FAS-hex3 ESS hexamer (GTGTGG) [66]. RT-PCR analysis of the mutant minigene and direct sequencing revealed one band corresponding to the WT transcript and a smaller band of 240 bp in size, corresponding to the junction of the two pET01 exons (Figure 4D). Therefore, variant c.1641G>T causes the skipping of exons 10 and 11 in our minigene system (Figure 5), probably by the binding of a splicing repressor to the ESS motifs. Interestingly, HSF analysis of variant c.1639T>C; p.(W547R), located in position +105 from the acceptor site and only two nucleotides apart from c.1641G>T; p.(W547C), did not predict the generation of any ESS and did not show an aberrant pre-mRNA splicing in our minigene system (Table S4, Figure 4D).

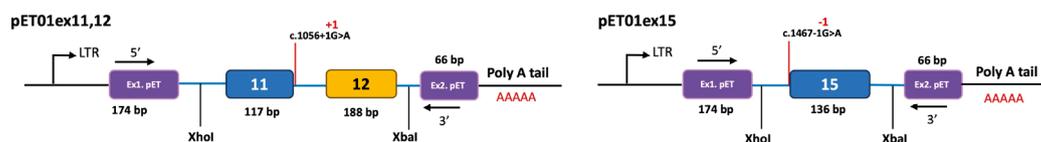
#### Variants in Exons 3, 7 and 9 of *CLCN5* Did Not Alter pre-mRNA Splicing

Using the minigene assay, we also studied one variant in exon 3, c.193G>A; p.(G65R), located at position –13 with respect to the donor site of intron 3; three variants in exon 7, c.731C>T; p.(S244L), located at position +8 with respect to the acceptor site of intron 6, c.781G>A; p.(G261R), located at position –24 with respect to the donor splice site of intron 7

and c.800A>C; p.(E267A), located at position  $-5$  with respect to the donor site of intron 7; and five variants in exon 9, c.1384G>A; p.(G462S), located at position  $+37$  with respect to the acceptor splice site of intron 8, c.1511T>A; p.(M504K), located at position  $-24$  with respect to the donor splice site of intron 9, c.1516G>A; p.(G506R), located at position  $-19$  with respect to the donor splice site of intron 9, c.1517G>A; p.(G506E), located at position  $-18$  with respect to the donor splice site of intron 9, and c.1534G>C; p.(G512R), located at position  $-1$  with respect to the donor splice site of intron 9 (Figure 3). Bioinformatics analysis of these variants suggested potential alterations in pre-mRNA splicing (Table S3). Variant c.193G>A; p.(G65R) generated a new acceptor site in exon 3 according to HSF (Table S3), but SpliceAI predicted no changes in the splice sites (Table S4). The three variants located in exon 7 predicted the generation of ESSs and the abolition of ESEs according to HSF, a reduction in the number of transcripts according to SPANR, and a donor site gain in variant c.781G>A; p.(G261R) according to SpliceAI (Table S3 and S4). According to MutPredSplice and CADD-Splice, exon 9 variants c.1384G>A; p.(G462S), c.1511T>A; p.(M504K), c.1516G>A; p.(G506R) and c.1534G>C; p.(G512R) disrupted pre-mRNA splicing (Tables S2 and S4). Variants c.1517G>A; p.(G506E), c.1384G>A; p.(G462S) and c.1511T>A; p.(M504K) were predicted by HSF to generate ESSs (Table S3 and S4). According to SpliceAI, none of them alter the splice sites (Table S4). However, the results of the minigene analysis and sequencing showed that none of these variants affected pre-mRNA splicing (Figure 4).

### 3.3.2. Minigene Analysis of OCRL Variants

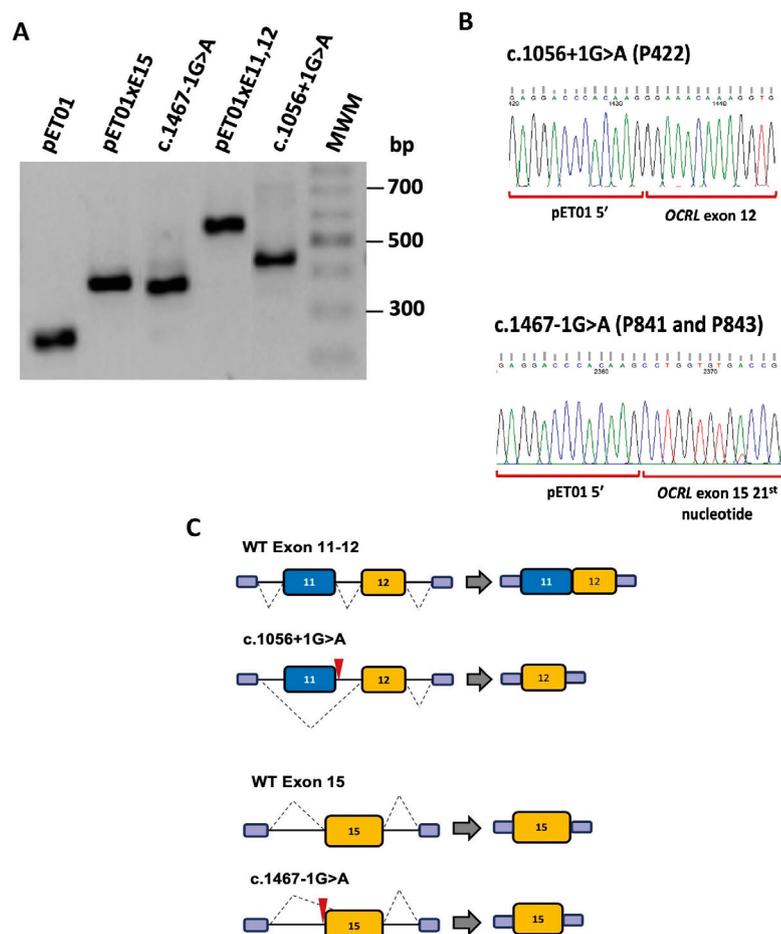
Two OCRL intronic variants, c.1056+1G>A and c.1467-1G>A, were identified in patients from our DD cohort. Both variants affect one nucleotide at the canonical splice site of the respective donor or acceptor sites (Figure 6). Bioinformatics analyses predicted pre-mRNA alterations for both variants (Table S2).



**Figure 6.** Schematic representation of minigenes constructed with expression vector pET01 and OCRL WT sequences. The constructions are flanked by exon 1 of pET01 in the 5' end and by exon 2 of pET01 in the 3' end, followed by a polyadenylation site (poly A tail). The location of mutations introduced by side-direct mutagenesis is indicated. The size of OCRL and pET01 5' and 3' exons are indicated. Numbers in red indicate the localization of mutations respect to donor (+) or acceptor (-) intronic sites. Restriction sites for *XhoI* and *XbaI* are also shown. LTR, long terminal repeat promoter of the Rous Sarcoma Virus.

#### OCRL Variant c.1056+1G>A Results in the Skipping of Exon 11

Bioinformatics analysis with NNSplice and HSF predicted that variant c.1056+1G>A inactivates the canonical donor splice site dinucleotide (GU) of intron 11 (Figure 6, Table S2). According to NNSplice, the score of the WT donor splice site of intron 11 is 0.99, while the mutant score goes down 0.00. To determine the effect of this variant, we created minigenes containing WT and mutant sequences of exons 11 and 12. The WT and mutant minigenes were transfected separately into COS7 and HEK293T cells. RT-PCR results showed that the WT minigene produced a band of 545 bp corresponding to exons 11 and 12, and the mutant construction produced a unique smaller band of 420 bp consistent with skipping of exon 11 (Figure 7A,C). Direct sequencing analysis of the RT-PCR products confirmed these results (Figure 7B).



**Figure 7.** (A) Representative agarose gel showing the results of the RT-PCR analysis of spliced transcripts expressed from *OCRL* minigenes containing WT and mutant exons. (B) DNA sequencing of the altered RT-PCR products from exon 11–12 and exon 15 constructions with mutations c.1056+1G>A and c.1467-1G>A. (C) Schematic representation of pre-mRNA splicing in WT and mutant constructions. Exon 11 and the first 20 nucleotides of exon 15 are missing due to mutations c.1056+1G>A and c.1467-1G>A, respectively. Red arrowheads indicate the location of the variant.

#### *OCRL* Variant c.1467-1G>A Results in Incorporation of a Truncated Exon 15 in the mRNA

Variant c.1467-1G>A was predicted by the HSF tool to inactivate the conserved dinucleotide (AG) at the canonical acceptor splice site of intron 14 (Figure 6, Table S2). Accordingly, the NNSplice scores for the WT and mutant sites were 0.92 and 0.00, respectively. To investigate the effect of this variant, we created a minigene harbouring exon 15 and its flanking intronic sequences. The results of the RT-PCR analysis showed a unique product of 350 bp in the mutant minigene and a larger band of 370 bp in the WT minigene (Figure 7A). Sequencing analysis of these products confirmed that the smaller fragment matches the incorporation of a truncated exon 15 missing 20 nucleotides from the 5' end, and that the product from the WT minigene corresponds to the correctly spliced exons (Figure 7B,C). HSF analysis predicted the presence of a cryptic acceptor splice site located 18 nucleotides

downstream from the beginning of exon 15 (GTTCCAGCCTGG). The use of this site by the splicing machinery would explain the incorporation of the truncated exon 15 in the mRNA.

#### 4. Discussion

We report the identification of six new exonic variants in *CLCN5* associated with DD1 (three presumed missense variants and three small deletions) and two novel canonical splice site variants in *OCRL* associated with DD2 and the functional effects on pre-mRNA splicing of three of these variants and 12 variants previously identified in DD patients. Bioinformatics predictions of the novel variants identified in our study indicate that they are all pathogenic (Table S2). *CLCN5* missense variants p.(W547C), p.(Y534N) and p.(G326R) and *OCRL* missense variant p.(P693L) affect conserved amino acid residues of the corresponding proteins. Two other variants in codon 547, p.(W547R) and p.(W547G) have been previously identified in patients with DD1 [67,68], indicating that this tryptophan residue is important for the proper functioning of the CIC-5 protein. On the other hand, we have previously shown that variant p.(W547G) increases the expression of *CLCN5* mRNA isoform lacking exons 10 and 11 in the patient's lymphocytes [68]. In the present study, we showed that variant p.(W547C) also has a similar effect (discussed below). Furthermore, expression studies in oocytes have shown that p.(W547G) reduces significantly CIC-5 currents [69]. These data suggest that variant p.(W547C) is pathogenic. Nevertheless, further studies are needed to assess the effect of the new missense variants identified in our study on the activity of the CIC-5 protein. The three small *CLCN5* deletions identified result in frameshifts and generation of premature stop codons, which could lead to complete loss of protein expression due to nonsense-mediated mRNA decay (NMD) [70].

*OCRL* missense variant p.(R318C), identified in one of our patients, affects the 5-phosphatase domain of OCRL1. This variant is a recurrent variant that has been described in at least 13 unrelated families with DD2 from different countries. Another variant affecting the same codon, p.(R318H), has been described in six unrelated DD2 families. Codon 318 is considered as a mutational hot spot in the *OCRL* gene [30]. The majority of reported DD2 and Lowe syndrome missense variants map in the 5-phosphatase domain of the OCRL1 protein [30,71]. Ganesello and col. studied the distribution of DD2 causing variants in relation to extra-renal symptoms and found that patients with variants in the 5-phosphatase domain presented mainly with muscular involvement, central nervous system (CNS) symptoms and rarely with ocular defects [30]. The majority of patients carrying variant p.(R318C) did not present any extra-renal symptoms; only seven presented mild CNS and/or muscular alterations, and only two presented ocular defects [30]. Accordingly, our patient carrying p.(R318C) presented renal symptoms such as LMWP, hypercalciuria and nephrocalcinosis, and did not show any extra-renal alteration. On the other hand, missense variant p.(P693L) is one of the few DD2 causing variants that is located in the ASH-RhoGap module [30,62]. Ocular symptoms are very rare in DD2 cases, and, when present, they are more frequently related to variants in the ASH and Rho-GAP domains. In addition, one third of variants located in this region cause CNS alterations [30]. In accordance with these observations, our patient carrying variant p.(P693L) showed congenital cataracts and developmental delay, together with renal symptoms like LMWP and hypercalciuria.

Alteration of the pre-mRNA splicing process by intronic or exonic variants is a well-established cause of disease [32–34]. More recently, it has become evident that exonic variants that affect this process are more prevalent than previously predicted [72]. In order to improve the genetic diagnosis and the design of new therapeutic strategies for hereditary diseases, it is necessary to evaluate the biological and clinical consequences of presumed splicing variants [73]. Bioinformatics tools that predict splicing defects can be used initially as supplementary evidence for genetic diagnosis. Nevertheless, functional assays using RNA from patients or minigenes are required to evaluate the pathogenicity of a gene variant [61]. A recent functional study of intronic *CLCN5* variants, located near the exons' ends (3 to 17 nucleotides), using a minigene assay, has shown that five of these variants

produce altered mRNAs and concluded that they are pathogenic [74]. For instance, variant c.393+4A>G, close to the donor splice site of intron 4, results in exon 4 skipping, and variant c.517-3C>A, close to the acceptor splice site of intron 5, induces both exon 6 skipping and partial deletions of exon 6. These studies are also necessary for variants that affect canonical dinucleotide of the splice sites, which are usually considered pathogenic since they result in complete absence of the protein due to NMD of the altered transcript [70]. RNA samples from patients' tissues are generally problematic to obtain, and minigene assays are a practical alternative [75]. Therefore, we used here the minigene system we have successfully employed in previous studies [76–80].

*CLCN5* exonic variants c.1535G>A [67] and c.1537G>A [68], located close to the 5' end of exon 10 (positions +1 and +3, respectively), do not change the NNSplice score of the acceptor splice site, however, we found that both variants generate different overlapping ESS motifs. ESSs seem to function by interacting with splicing repressors, which are RNA-binding proteins of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family (such as hnRNP A1) [36,81]. These ribonucleoproteins contain RNA-binding domains for binding to the nascent pre-mRNA and an inhibitory domain involved in protein–protein interactions. It has been proposed that hnRNPs cover a region in the exon and compete with splicing enhancers, blocking their binding [81,82]. We suggest that binding of repressors to the ESSs generated by variants c.1535G>A and c.1537G>A could prevent the recognition by the splicing machinery of the canonical acceptor site, inducing the skipping of exon 10. Interestingly, variant c.1641G>T, located 107 nucleotides from the 5' end of exon 10, also generates several overlapping ESS motifs, but it results in skipping of not only exon 10 but also exon 11. We have shown before, using RNA from a patient's lymphocytes, that variant c.1639T>G, which is located in the same codon as c.1641G>T, increases the expression of the mRNA isoform lacking exons 10 and 11 [68]. This variant c.1639T>G also generates several overlapping ESSs in the same region (Figure S1). Tosetto and col. have previously identified a different variant but in the same nucleotide, c.1639T>C, in another DD1 patient [67]. Remarkably, this variant does not generate ESSs and does not alter pre-mRNA splicing (Figure 4D). From these results, we conclude that binding of repressor(s) to ESSs in this region could displace positive regulatory proteins or other splicing factors, resulting in the skipping of exons 10 and 11. Further studies will be needed to understand the mechanism that leads to the simultaneous skipping of both exons induced by variants c.1639T>G and c.1641G>T.

The results of our studies showed that minigenes containing variants c.1535G>A; p.(G512D), c.1537G>A; p.(G513R) and c.1641G>T; p.(W547C) produce a residual amount of transcripts containing exons 10 and 11. Therefore, we suggest that these exonic variants act at the protein and RNA levels, causing both altered pre-mRNA splicing and the corresponding amino acid change. The same assumption would apply to the previously studied variant c.1639T>G; p.(W547G) [68]. Protein expression and electrophysiological studies have shown that this variant yields reduced surface expression of the CIC-5 mutant protein and drastically reduced currents at the plasma membrane [69]. All these results exemplify how different molecular mechanisms concur to establish the pathogenicity of a variant.

The absence of exon 10 in the spliced mRNA of variants c.1535G>A and c.1537G>A would lead to an aberrant joining of exons 9 and 11 without changes in the ORF. If the mutant CIC-5 protein were expressed, it would lack 133 amino acids (amino acid residues 512 to 645), including part of  $\alpha$ -helix O,  $\alpha$ -helices P, Q and R, and the CBS1 domain [12]. On the other hand, skipping of exons 10 and 11 induced by variant c.1641G>T would result in the joining of exons 9 and 12 with a change in the ORF and the generation of a stop codon 13 amino acids downstream (the new sequence would be: Gly-Asp-Cys-Leu-Glu-Ser-Leu-Pro-Lys-Arg-Met-Cys-STOP). The mutant CIC-5 protein, if expressed, would lack the last 230 amino acids including part of helix O, helices P, Q, and R, and both CBS1 and CBS2 domains located at the cytoplasmic carboxy terminus of the CIC-5 protein. However, this altered mRNA would probably be degraded by NMD.

OCRL variants c.1056+1G>A and c.1467-1G>A are canonical splice site variants that inactivate a donor splice site and an acceptor splice site, respectively. The consensus donor and acceptor splice sites of the pre-mRNAs contain highly conserved dinucleotides (GU, GT in the DNA, and AG) located at the beginning and the end of each intron, respectively, and that are critical for splicing [35]. The results of our functional studies with minigenes indicated that both OCRL variants lead to drastic changes in the respective transcripts. Variant c.1056+1G>A results in exon 11 skipping, and the joining of exons 10 and 12 does not change in the open reading frame. Therefore, the altered transcript would probably encode a non-functional OCRL1 protein lacking 39 amino acids (residues 315 to 352) in the middle of the phosphatase domain. On the other hand, variant c.1467-1G>A results in the incorporation of an exon 15 missing 20 nucleotides of the 5' end, which involves a change in the open reading frame. The altered transcript would encode a non-functional OCRL1 protein lacking part of the phosphatase domain and the ASH and RhoGAP-like domains. In both cases, there is complete absence of the wild-type mRNA. Conversely, presumed missense variant c.2078C>T; p.(P693L) was considered as a variant with no effect on pre-mRNA splicing and, therefore, was not included in the minigene analysis. This very rare variant affects a proline residue conserved during evolution, which is located between the ASH and RhoGAP-like domains, and was predicted to affect the function of the OCRL1 protein. These two domains form a single folding module that regulates the majority of the protein–protein interactions currently described [28]. However, functional studies will be required to determine the consequences of this variant on OCRL1 activity. We have previously shown that three presumed missense variants of OCRL cause changes in pre-mRNA splicing. One of these variants, c.741G>T; p.(W247C), creates splicing silencer sequences (ESS) and disturbs splicing enhancer sequences (ESEs), resulting in skipping of exon 9, whereas the other two variants c.2581G>A; p.(A861T) and c.2581G>C; p.(A861P), which affect the last nucleotide of exon 23, inactivate the donor splice site, resulting in exon skipping [78]. Similarly, transcript analysis by quantitative PCR of another three OCRL variants, involving the last nucleotide of exons 9, 14 and 23, has shown that they affect pre-mRNA splicing [83].

## 5. Conclusions

We characterized the clinical and genetic characteristics of a cohort of DD patients and expanded the genetic spectrum of the disease. Using bioinformatics tools and functional analysis with a minigene system, we described the alterations of three presumed *CLCN5* missense variants and two splice-site OCRL variants on the splicing of pre-mRNA. Two of the *CLCN5* variants, which are close to the 5' end of exon 10, generate overlapping ESS sites that could prevent recognition of the acceptor splice site, causing exon 10 skipping. The results of our study also showed that a presumed *CLCN5* missense variant located in exon 10 more than one hundred nucleotides away from a splice site results in skipping of both exons 10 and 11, probably through generation of ESS motifs. Furthermore, our results highlight the importance of performing functional studies to characterize the effect of canonical splice site variants on pre-mRNA splicing. Our study indicates that splicing disruption contributes to the pathogenicity of a variant in DD. The characterization of the effects of variants on pre-mRNA splicing will be very useful for the diagnosis of the disease and for the design of new therapeutic strategies.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines11113082/s1>, Table S1: Primers used in construction of minigenes and site-directed mutagenesis; Table S2: Bioinformatics analysis of novel *CLCN5* and OCRL mutations identified in our study; Table S3: Bioinformatics analysis of *CLCN5* missense mutations for their potential effect on pre-mRNA splicing; Table S4: Bioinformatics predictions for *CLCN5* missense mutations selected from Table S3; Table S5: Generation of ESSs in *CLCN5* exon 10 by mutations c.1535G>A, c.1537G>A, c.1639T>G, c.1639T>C and c.1641G>T, according to the bioinformatics tool HSF; Figure S1: Schematic representation of ESSs generation by exon 10

*CLCN5* mutations c.1535G>A, c.1537G>A, c.1639T>G, c.1639T>C and c.1641G>T, according to the bioinformatics tool HSF.

**Author Contributions:** Conceptualization, F.C.-M. and E.R.-T.; Acquisition of the data, G.M.-E., A.P.-R., C.J.T.-F. and F.C.-M.; Analysis and interpretation of the data, G.M.-E., E.R.-T., A.P.-R. and F.C.-M.; Drafting and critical revision of the manuscript, G.M.-E., A.P.-R., F.C.-M. and E.R.-T.; Funding acquisition, F.C.-M. and E.R.-T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was supported by Asociación de la Enfermedad de Dent (ASDENT) and by grants PI17/00153 and PI20/00652 co-financed by the Instituto de Salud Carlos III-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación and the European Regional Development Fund “Another way to build Europe”. G.M.-E. participation was supported by the pre-doctoral training program M-ULL 2019 from Universidad de La Laguna. Part of this work was presented at the 56th Conference of the European Society of Human Genetics, Glasgow, Scotland, UK, 10–13 June 2023, and in the 5th International Caparica Conference in SPLICING 2023, Caparica, Portugal, 17–20 July 2023.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitario Nuestra Señora Candelaria (Santa Cruz de Tenerife, Spain) (protocol code MO PI17/00153).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** We thank other members of the RenalTube Group: Helena Gil-Peña (Department of Pediatrics, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain); Fernando Santos-Rodríguez (Department of Pediatrics, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain); Flor Angel Ordoñez-Álvarez (Department of Pediatrics, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain); Julián Rodríguez Suárez (Department of Pediatrics, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain); Leire Madariaga (Sección de Nefrología Pediátrica, Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, Bizkaia, Spain); Luis Castaño (Sección de Endocrinología Pediátrica, Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, Bizkaia, Spain); Alejandro García-Castaño (Instituto de Investigación Sanitaria Biocruces Bizkaia, Barakaldo, Bizkaia, Spain); Leire Gondra Sangroniz (Instituto de Investigación Sanitaria Biocruces Bizkaia, Barakaldo, Bizkaia, Spain); Gema Ariceta (Hospital Universitario Materno-Infantil Vall d’Hebron, Barcelona, Spain); Anna Meseguer Navarro, (Unitat de Bioquímica de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain); Gerard Cantero-Recasens (Renal Physiopathology Group, Vall d’Hebron Research Institute, Barcelona, Spain).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Claverie-Martín, F.; Ramos-Trujillo, E.; García-Nieto, V. Dent’s disease: Clinical features and molecular basis. *Pediatr. Nephrol.* **2011**, *26*, 693–704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Devuyt, O.; Thakker, R.V. Dent’s disease. *Orphanet J. Rare Dis.* **2010**, *5*, 28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ganesello, L.; Del Prete, D.; Anglani, F.; Calò, L.A. Genetics and phenotypic heterogeneity of Dent disease: The dark side of the moon. *Hum. Genet.* **2021**, *140*, 401–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Priante, G.; Ceol, M.; Ganesello, L.; Bizzotto, D.; Braghetta, P.; Calò, L.A.; Del Prete, D.; Anglani, F. Emerging Perspectives on the Rare Tubulopathy Dent Disease: Is Glomerular Damage a Direct Consequence of CIC-5 Dysfunction? *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1313. [[CrossRef](#)]
5. Wrong, O.M.; Norden, A.G.; Feest, T.G. Dent’s Disease; a Familial Proximal Renal Tubular Syndrome with Low-Molecular-Weight Proteinuria, Hypercalciuria, Nephrocalcinosis, Metabolic Bone Disease, Progressive Renal Failure and a Marked Male Predominance. *QJM* **1994**, *87*, 473–493.
6. Frymoyer, P.A.; Scheinman, S.J.; Dunham, P.B.; Jones, D.B.; Hueber, P.; Schroeder, E.T. X-Linked Recessive Nephrolithiasis with Renal Failure. *N. Engl. J. Med.* **1991**, *325*, 681–686. [[CrossRef](#)]
7. Carballo-Trujillo, I.; Garcia-Nieto, V.; Moya-Angeler, F.J.; Antón-Gamero, M.; Loris, C.; Méndez-Alvarez, S.; Claverie-Martín, F. Novel truncating mutations in the CIC-5 chloride channel gene in patients with Dent’s disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2003**, *18*, 717–723. [[CrossRef](#)]

8. Reinhart, S.C.; Norden, A.G.; Lapsley, M.; Thakker, R.V.; Pang, J.; Moses, A.M.; Frymoyer, P.A.; Favus, M.J.; Hoepner, J.A.; Scheinman, S.J. Characterization of carrier females and affected males with X-linked recessive nephrolithiasis. *JASN* **1995**, *5*, 1451–1461. [[CrossRef](#)]
9. Hoopes, R.R.; Hueber, P.A.; Reid, R.J.; Braden, G.L.; Goodyer, P.R.; Melnyk, A.R.; Midgley, J.P.; Moel, D.I.; Neu, A.M.; VanWhy, S.K.; et al. *CLCN5* chloride-channel mutations in six new North American families with X-linked nephrolithiasis. *Kidney Int.* **1998**, *54*, 698–705. [[CrossRef](#)]
10. Lloyd, S.E.; Pearce, S.H.; Fisher, S.E.; Steinmeyer, K.; Schwappach, B.; Scheinman, S.J.; Harding, B.; Bolino, A.; Devoto, M.; Goodyer, P.; et al. A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* **1996**, *379*, 445–449. [[CrossRef](#)]
11. Hoopes, R.R.; Shrimpton, A.E.; Knohl, S.J.; Hueber, P.; Hoppe, B.; Matyus, J.; Simckes, A.; Tasic, V.; Toenshoff, B.; Suchy, S.F.; et al. Dent Disease with Mutations in *OCRL1*. *AJHG* **2005**, *76*, 260–267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Dutzler, R.; Campbell, E.B.; Cadene, M.; Chait, B.T.; MacKinnon, R. X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* **2002**, *415*, 287–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Picollo, A.; Pusch, M. Chloride/proton antiporter activity of mammalian ClC proteins ClC-4 and ClC-5. *Nature* **2005**, *436*, 420–423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Piwon, N.; Günther, W.; Schwake, M.; Bösl, M.R.; Jentsch, T.J. ClC-5 Cl<sup>-</sup>-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature* **2000**, *408*, 369–373. [[CrossRef](#)]
15. Steinmeyer, K.; Schwappach, B.; Bens, M.; Vandewalle, A.; Jentsch, T.J. Cloning and Functional Expression of Rat ClC-5, a Chloride Channel Related to Kidney Disease. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 31172–31177. [[CrossRef](#)]
16. Grand, T.; Mordasini, D.; L'Hoste, S.; Pennaforte, T.; Genete, M.; Biyeyeme, M.-J.; Vargas-Poussou, R.; Blanchard, A.; Teulon, J.; Lourdel, S. Novel *CLCN5* mutations in patients with Dent's disease result in altered ion currents or impaired exchanger processing. *Kidney Int.* **2009**, *76*, 999–1005. [[CrossRef](#)]
17. Estévez, R.; Pusch, M.; Ferrer-Costa, C.; Orozco, M.; Jentsch, T.J. Functional and structural conservation of CBS domains from ClC channels. *J. Physiol.* **2004**, *557*, 363–378. [[CrossRef](#)]
18. Zifarelli, G.; Pusch, M. Intracellular regulation of human ClC-5 by adenine nucleotides. *EMBO Rep.* **2009**, *10*, 1111–1116. [[CrossRef](#)]
19. Wellhauser, L.; Kuo, H.-H.; Stratford, F.L.L.; Ramjeesingh, M.; Huan, L.-J.; Luong, W.; Li, C.; Deber, C.M.; Bear, C.E. Nucleotides bind to the C-terminus of ClC-5. *Biochem. J.* **2006**, *398*, 289–294. [[CrossRef](#)]
20. Meyer, S.; Savaresi, S.; Forster, I.C.; Dutzler, R. Nucleotide recognition by the cytoplasmic domain of the human chloride transporter ClC-5. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 60–67. [[CrossRef](#)]
21. Lourdel, S.; Grand, T.; Burgos, J.; González, W.; Sepúlveda, F.V.; Teulon, J. ClC-5 mutations associated with Dent's disease: A major role of the dimer interface. *Pflugers Arch.* **2012**, *463*, 247–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Schwake, M.; Friedrich, T.; Jentsch, T.J. An Internalization Signal in ClC-5, an Endosomal Cl<sup>-</sup>-Channel Mutated in Dent's Disease. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 12049–12054. [[CrossRef](#)]
23. Attree, O.; Olivos, I.M.; Okabe, I.; Bailey, L.C.; Nelson, D.L.; Lewis, R.A.; McInnes, R.R.; Nussbaum, R.L. The Lowe's oculocerebrorenal syndrome gene encodes a protein highly homologous to inositol polyphosphate-5-phosphatase. *Nature* **1992**, *358*, 239–242. [[CrossRef](#)]
24. Choudhury, R.; Noakes, C.J.; McKenzie, E.; Kox, C.; Lowe, M. Differential Clathrin Binding and Subcellular Localization of *OCRL1* Splice Isoforms. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 9965–9973. [[CrossRef](#)]
25. Ooms, L.M.; Horan, K.A.; Rahman, P.; Seaton, G.; Gurung, R.; Kethesparan, D.S.; Mitchell, C.A. The role of the inositol polyphosphate 5-phosphatases in cellular function and human disease. *Biochem. J.* **2009**, *419*, 29–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Olivos-Glander, I.M.; Jänne, P.A.; Nussbaum, R.L. The oculocerebrorenal syndrome gene product is a 105-kD protein localized to the Golgi complex. *AJHG* **1995**, *57*, 817–823. [[PubMed](#)]
27. Erb, B.C.; Velázquez, H.; Gisser, M.; Shugrue, C.A.; Reilly, R.F. cDNA cloning and localization of *OCRL-1* in rabbit kidney. *Am. J. Physiol.* **1997**, *273*, F790–F795. [[CrossRef](#)]
28. Erdmann, K.S.; Mao, Y.; McCrea, H.J.; Zoncu, R.; Lee, S.; Paradise, S.; Modregger, J.; Biemesderfer, D.; Toomre, D.; De Camilli, P. A Role of the Lowe Syndrome Protein *OCRL* in Early Steps of the Endocytic Pathway. *Dev. Cell* **2007**, *13*, 377–390. [[CrossRef](#)]
29. Mao, Y.; Balkin, D.M.; Zoncu, R.; Erdmann, K.S.; Tomasini, L.; Hu, F.; Jin, M.M.; Hodsdon, M.E.; De Camilli, P. A PH domain within *OCRL* bridges clathrin-mediated membrane trafficking to phosphoinositide metabolism. *EMBO J.* **2009**, *28*, 1831–1842. [[CrossRef](#)]
30. Ganesello, L.; Arroyo, J.; Del Prete, D.; Priante, G.; Ceol, M.; Harris, P.C.; Lieske, J.C.; Anglani, F. Genotype Phenotype Correlation in Dent Disease 2 and Review of the Literature: *OCRL* Gene Pleiotropism or Extreme Phenotypic Variability of Lowe Syndrome? *Genes* **2021**, *12*, 1597. [[CrossRef](#)]
31. Arnous, M.G.; Arroyo, J.; Cogal, A.G.; Anglani, F.; Kang, H.G.; Sas, D.; Harris, P.C.; Lieske, J.C. The Site and Type of *CLCN5* Genetic Variation Impact the Resulting Dent Disease-1 Phenotype. *Kidney Int. Rep.* **2023**, *8*, 1220–1230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Wang, G.-S.; Cooper, T.A. Splicing in disease: Disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 749–761. [[CrossRef](#)]
33. Scotti, M.M.; Swanson, M.S. RNA mis-splicing in disease. *Nat. Rev. Genet.* **2016**, *17*, 19–32. [[CrossRef](#)]
34. Cartegni, L.; Chew, S.L.; Krainer, A.R. Listening to silence and understanding nonsense: Exonic mutations that affect splicing. *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 285–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

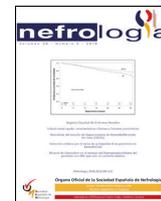
35. Manning, K.S.; Cooper, T.A. The roles of RNA processing in translating genotype to phenotype. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 102–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Martínez-Contreras, R.; Cloutier, P.; Shkreta, L.; Fisette, J.-F.; Revil, T.; Chabot, B. HnRNP Proteins and Splicing Control. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2007**, *623*, 123–147. [[CrossRef](#)]
37. Cáceres, E.; Hurst, L.D. The evolution, impact and properties of exonic splice enhancers. *Genome Biol.* **2013**, *14*, R143. [[CrossRef](#)]
38. Graveley, B.R. Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* **2000**, *6*, 1197–1211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Cartegni, L.; Krainer, A.R. Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat. Genet.* **2002**, *30*, 377–384. [[CrossRef](#)]
40. Kashima, T.; Manley, J.L. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* **2003**, *34*, 460–463. [[CrossRef](#)]
41. Baralle, M. Identification of a mutation that perturbs NF1 agene splicing using genomic DNA samples and a minigene assay. *J. Med. Genet.* **2003**, *40*, 220–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Tournier, L.; Vezain, M.; Martins, A.; Charbonnier, F.; Baert-Desurmont, S.; Olschwang, S.; Wang, Q.; Buisine, M.P.; Soret, J.; Tazi, J.; et al. A large fraction of unclassified variants of the mismatch repair genes *MLH1* and *MSH2* is associated with splicing defects. *Hum. Mutat.* **2008**, *29*, 1412–1424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Roos, D.; de Boer, M. Mutations in cis that affect mRNA synthesis, processing and translation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2021**, *1867*, 166166. [[CrossRef](#)]
44. Baralle, D.; Buratti, E. RNA splicing in human disease and in the clinic. *Clin. Sci.* **2017**, *131*, 355–368. [[CrossRef](#)]
45. Karczewski, K.J.; Francioli, L.C.; Tiao, G.; Cummings, B.B.; Alfoldi, J.; Wang, Q.; Collins, R.L.; Laricchia, K.M.; Ganna, A.; Birnbaum, D.P.; et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* **2020**, *581*, 434–443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Genomes Project Consortium; Auton, A.; Brooks, L.D.; Durbin, R.M.; Garrison, E.P.; Kang, H.M.; Korbel, J.O.; Marchini, J.L.; McCarthy, S.; McVean, G.A.; et al. A global reference for human genetic variation. *Nature* **2015**, *526*, 68–74. [[CrossRef](#)]
47. Sherry, S.T.; Ward, M.; Sirotkin, K. dbSNP-database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation. *Genome Res.* **1999**, *9*, 677–679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Stenson, P.D.; Ball, E.V.; Mort, M.; Phillips, A.D.; Shiel, J.A.; Thomas, N.S.; Abeyasinghe, S.; Krawczak, M.; Cooper, D.N. Human Gene Mutation Database (HGMD®): 2003 update. *Hum. Mutat.* **2003**, *21*, 577–581. [[CrossRef](#)]
49. Mansour-Hendili, L.; Blanchard, A.; Le Pottier, N.; Roncelin, I.; Lourdel, S.; Treard, C.; González, W.; Vergara-Jaque, A.; Morin, G.; Colin, E.; et al. Mutation Update of the *CLCN5* Gene Responsible for Dent Disease 1. *Hum. Mutat.* **2015**, *36*, 743–752. [[CrossRef](#)]
50. Mort, M.; Sterne-Weiler, T.; Li, B.; Ball, E.V.; Cooper, D.N.; Radivojac, P.; Sanford, J.R.; Mooney, S.D. MutPred Splice: Machine learning-based prediction of exonic variants that disrupt splicing. *Genome Biol.* **2014**, *15*, R19. [[CrossRef](#)]
51. Xiong, H.Y.; Alipanahi, B.; Lee, L.J.; Bretschneider, H.; Merico, D.; Yuen, R.K.C.; Hua, Y.; Gueroussov, S.; Najafabadi, H.S.; Hughes, T.R.; et al. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science* **2015**, *347*, 1254806. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Desmet, F.-O.; Hamroun, D.; Lalande, M.; Collod-Beroud, G.; Claustres, M.; Bérout, C. Human Splicing Finder: An online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, e67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Reese, M.G.; Eeckman, F.H.; Kulp, D.; Haussler, D. Improved Splice Site Detection in Genie. *J. Comput. Biol.* **1997**, *4*, 311–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Rentsch, P.; Schubach, M.; Shendure, J.; Kircher, M. CADD-Splice—Improving genome-wide variant effect prediction using deep learning-derived splice scores. *Genome Med.* **2021**, *13*, 31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Jaganathan, K.; Panagiotopoulou, S.K.; McRae, J.F.; Darbandi, S.F.; Knowles, D.; Li, Y.I.; Kosmicki, J.A.; Arbelaez, J.; Cui, W.; Schwartz, G.B.; et al. Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning. *Cell* **2019**, *3*, 535–548. [[CrossRef](#)]
56. Adzhubei, I.A.; Schmidt, S.; Peshkin, L.; Ramensky, V.E.; Gerasimova, A.; Bork, P.; Kondrashov, A.S.; Sunyaev, S.R. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* **2010**, *7*, 248–249. [[CrossRef](#)]
57. Ng, P.C.; Henikoff, S. Predicting Deleterious Amino Acid Substitutions. *Genome Res.* **2001**, *11*, 863–874. [[CrossRef](#)]
58. Pejaver, V.; Urresti, J.; Lugo-Martinez, J.; Pagel, K.A.; Lin, G.N.; Nam, H.-J.; Mort, M.; Cooper, D.N.; Sebat, J.; Iakoucheva, L.M.; et al. Inferring the molecular and phenotypic impact of amino acid variants with MutPred2. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 5918. [[CrossRef](#)]
59. Madeira, F.; Pearce, M.; Tivey, A.R.N.; Basutkar, P.; Lee, J.; Edbali, O.; Madhusoodanan, N.; Kolesnikov, A.; Lopez, R. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, W276–W279. [[CrossRef](#)]
60. Kopanos, C.; Tsiolkas, V.; Kouris, A.; Chapple, C.E.; Aguilera, M.A.; Meyer, R.; Massouras, A. VarSome: The human genomic variant search engine. *Bioinformatics* **2019**, *35*, 1978–1980. [[CrossRef](#)]
61. Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; Spector, E.; et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **2015**, *17*, 405–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Cogal, A.G.; Arroyo, J.; Shah, R.J.; Reese, K.J.; Walton, B.N.; Reynolds, L.M.; Kennedy, G.N.; Seide, B.M.; Senum, S.R.; Baum, M.; et al. Comprehensive Genetic Analysis Reveals Complexity of Monogenic Urinary Stone Disease. *Kidney Int. Rep.* **2021**, *6*, 2862–2884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

63. Sekine, T.; Komoda, F.; Miura, K.; Takita, J.; Shimadzu, M.; Matsuyama, T.; Ashida, A.; Igarashi, T. Japanese Dent disease has a wider clinical spectrum than Dent disease in Europe/USA: Genetic and clinical studies of 86 unrelated patients with low-molecular-weight proteinuria. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2014**, *29*, 376–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Hoopes, R.R.; Raja, K.M.; Koich, A.; Hueber, P.; Reid, R.; Knohl, S.J.; Scheinman, S.J. Evidence for genetic heterogeneity in Dent's disease. *Kidney Int.* **2004**, *65*, 1615–1620. [[CrossRef](#)]
65. Nakazato, H.; Hattori, S.; Furuse, A.; Kawano, T.; Karashima, S.; Tsuruta, M.; Yoshimuta, J.; Endo, F.; Matsuda, I. Mutations in the *CLCN5* gene in Japanese patients with familial idiopathic low-molecular-weight proteinuria. *Kidney Int.* **1997**, *52*, 895–900. [[CrossRef](#)]
66. Wang, Z.; Rolish, M.E.; Yeo, G.; Tung, V.; Mawson, M.; Burge, C.B. Systematic Identification and Analysis of Exonic Splicing Silencers. *Cell* **2004**, *119*, 831–845. [[CrossRef](#)]
67. Tosetto, E.; Ceol, M.; Mezzabotta, F.; Ammenti, A.; Peruzzi, L.; Caruso, M.R.; Barbano, G.; Vezzoli, G.; Colussi, G.; Vergine, G.; et al. Novel mutations of the *CLCN5* gene including a complex allele and A 5' UTR mutation in Dent disease 1. *Clin. Genet.* **2009**, *76*, 413–416. [[CrossRef](#)]
68. Ramos-Trujillo, E.; González-Acosta, H.; Flores, C.; García-Nieto, V.; Guillén, E.; Gracia, S.; Vicente, C.; Espinosa, L.; Maseda, M.A.F.; Santos, F.; et al. A missense mutation in the chloride/proton ClC-5 antiporter gene results in increased expression of an alternative mRNA form that lacks exons 10 and 11. Identification of seven new *CLCN5* mutations in patients with Dent's disease. *J. Hum. Genet.* **2007**, *52*, 255–261. [[CrossRef](#)]
69. Grand, T.; L'Hoste, S.; Mordasini, D.; Defontaine, N.; Keck, M.; Pennaforte, T.; Genete, M.; Laghmani, K.; Teulon, J.; Lourdel, S. Heterogeneity in the processing of *CLCN5* mutants related to Dent disease. *Hum. Mutat.* **2011**, *32*, 476–483. [[CrossRef](#)]
70. Kurosaki, T.; Popp, M.W.; Maquat, L.E. Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 406–420. [[CrossRef](#)]
71. Zaniew, M.; Bökenkamp, A.; Kolbuc, M.; La Scola, C.; Baronio, F.; Niemirska, A.; Szczepańska, M.; Bürger, J.; La Manna, A.; Miklaszewska, M.; et al. Long-term renal outcome in children with *OCRL* mutations: Retrospective analysis of a large international cohort. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2018**, *33*, 85–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Soukariéh, O.; Gaildrat, P.; Hamieh, M.; Drouet, A.; Baert-Desurmont, S.; Frébourg, T.; Tosi, M.; Martins, A. Exonic Splicing Mutations Are More Prevalent than Currently Estimated and Can Be Predicted by Using In Silico Tools. *PLOS Genet.* **2016**, *12*, e1005756. [[CrossRef](#)]
73. Wai, H.; Douglas, A.G.L.; Baralle, D. RNA splicing analysis in genomic medicine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2019**, *108*, 61–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Inoue, T.; Nagano, C.; Matsuo, M.; Yamamura, T.; Sakakibara, N.; Horinouchi, T.; Shibagaki, Y.; Ichikawa, D.; Aoto, Y.; Ishiko, S.; et al. Functional analysis of suspected splicing variants in *CLCN5* gene in Dent disease 1. *Clin. Exp. Nephrol.* **2020**, *24*, 606–612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Singh, G.; Cooper, T.A. Minigene reporter for identification and analysis of *cis* elements and *trans* factors affecting pre-mRNA splicing. *BioTechniques* **2006**, *41*, 177–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Gonzalez-Paredes, F.J.; Ramos-Trujillo, E.; Claverie-Martin, F. Defective pre-mRNA splicing in PKD1 due to presumed missense and synonymous mutations causing autosomal dominant polycystic disease. *Gene* **2014**, *546*, 243–249. [[CrossRef](#)]
77. Gonzalez-Paredes, F.J.; Ramos-Trujillo, E.; Claverie-Martin, F. Three exonic mutations in polycystic kidney disease-2 gene (*PKD2*) alter splicing of its pre-mRNA in a minigene system. *Gene* **2016**, *578*, 117–123. [[CrossRef](#)]
78. Suarez-Artiles, L.; Perdomo-Ramirez, A.; Ramos-Trujillo, E.; Claverie-Martin, F. Splicing Analysis of Exonic *OCRL* Mutations Causing Lowe Syndrome or Dent-2 Disease. *Genes* **2018**, *9*, 15. [[CrossRef](#)]
79. Perdomo-Ramirez, A.; de Armas-Ortiz, M.; Ramos-Trujillo, E.; Suarez-Artiles, L.; Claverie-Martin, F. Exonic *CLDN16* mutations associated with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis can induce deleterious mRNA alterations. *BMC Med. Genet.* **2019**, *20*, 6. [[CrossRef](#)]
80. Perdomo-Ramirez, A.; Aguirre, M.; Davitaia, T.; Ariceta, G.; Ramos-Trujillo, E.; RenalTube Group; Claverie-Martin, F. Characterization of two novel mutations in the claudin-16 and claudin-19 genes that cause familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Gene* **2019**, *689*, 227–234. [[CrossRef](#)]
81. Pozzoli, U.; Sironi, M. Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. *Cell Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 1579–1604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Cáceres, J.F.; Kornbliht, A.R. Alternative splicing: Multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet.* **2002**, *18*, 186–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Hichri, H.; Rendu, J.; Monnier, N.; Coutton, C.; Dorseuil, O.; Poussou, R.V.; Baujat, G.; Blanchard, A.; Nobili, F.; Ranchin, B.; et al. From lowe syndrome to Dent disease: Correlations between mutations of the *OCRL1* gene and clinical and biochemical phenotypes. *Hum. Mutat.* **2011**, *32*, 379–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.







## Revisión

# Consideraciones acerca de las bases moleculares de algunas tubulopatías en relación con la endogamia y los desplazamientos poblacionales

## Considerations about the molecular basis of some kidney tubule disorders in relation to inbreeding and population displacement

Víctor M. García-Nieto<sup>a,\*</sup>, Félix Claverie-Martín<sup>b</sup>, Ana Perdomo-Ramírez<sup>b</sup>, Elizabeth Cárdoza-Lanus<sup>b</sup>, Elena Ramos-Trujillo<sup>b</sup>, Glorián Mura-Escorche<sup>b</sup>, Patricia Tejera-Carreño<sup>a</sup>, María I. Luis-Yanes<sup>a</sup> y el Grupo RenalTube

<sup>a</sup> Sección de Nefrología Pediátrica, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, España

<sup>b</sup> Unidad de Investigación, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, España

Las tubulopatías primarias son enfermedades raras. La mayoría de ellas tienen una herencia autosómica recesiva. La posibilidad de disponer, en la actualidad, de las técnicas de biología molecular ha permitido conocer la causa íntima genética de estas enfermedades y descubrir que esos trastornos son más frecuentes en los territorios en los que en el pasado existió un mayor o menor grado de consanguinidad. Por otra parte, los desplazamientos poblacionales que son tan antiguos como la humanidad, son la causa de la difusión de algunas enfermedades de origen genético. Su conocimiento, permite a los investigadores perseguir los pasos que han seguido determinadas mutaciones cromosómicas desde el lugar de origen del "ancestro fundador" hasta otros lugares radicados, muchas veces, en lugares del planeta muy distantes.

En el presente artículo, revisamos a partir de resultados propios y ajenos, algunos hallazgos disponibles sobre las bases moleculares de ciertas tubulopatías y de dos trastornos renales causantes de cálculos renales, en relación con la endogamia y los desplazamientos poblacionales.

### La consanguinidad

Las consecuencias de la endogamia son un componente esencial para la ciencia. Desde los guisantes de Mendel, numerosos hallazgos genéticos se han visto favorecidos por esta circunstancia. En el ámbito renal, los nefrólogos estamos familiarizados con el síndrome nefrótico congénito tipo finlandés causado por mutaciones en el gen que codifica la nefrina<sup>1</sup>. Fue descrito en los años 70 por nefrólogos de Finlandia<sup>2</sup>, país que cuenta con una de las mayores tasas de consanguinidad en el mundo<sup>3</sup>. Es importante conocer si se ha exagerado acerca del impacto de la endogamia en la salud humana. Es cierto que en un matrimonio entre primos hermanos se duplica el riesgo de una enfermedad recesiva (en torno al 5%) en comparación con padres no consanguíneos (2-3%)<sup>3</sup>. En la década de 1960, unos estudios realizados en poblaciones insulares de Japón no mostraron ninguna relación clara entre la endogamia y la salud en general<sup>3</sup>. Años después, se demostró que el retraso mental y puntuaciones más bajas en pruebas que miden el cociente intelectual<sup>4</sup>, eran más probables en matrimonios consanguíneos. Como describiremos a continuación, en la isla canaria de la Gomera se ha descrito una mayor frecuencia de dos causas de cálculos que debe estar en relación con la alta tasa de endo-

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [vgarcianieto@gmail.com](mailto:vgarcianieto@gmail.com) (V.M. García-Nieto).

<https://doi.org/10.1016/j.nefro.2019.08.004>

0211-6995/© 2019 Sociedad Española de Nefrología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

gamia que existió en la isla, al menos, hasta el siglo XX. Así, la frecuencia de matrimonios entre primos hermanos pudo alcanzar hasta el 25,8%<sup>5</sup>.

#### La Gomera, la «isla de las piedras»

Los hallazgos realizados en los últimos años en los habitantes actuales de la isla de La Gomera se han convertido en un paradigma de las vicisitudes médicas que pueden estar relacionadas con la consanguinidad aunque no todas ellas sean, probablemente, negativas. Se ha descrito, por un lado, una mayor frecuencia de una causa grave de litiasis y enfermedad renal crónica, la hiperoxaluria tipo 1 y, por otro, de una anomalía metabólica, la hipercalciuria idiopática que puede originar cálculos renales y pérdida de masa ósea en algunos casos.

La Gomera es una de las islas occidentales canarias y una de las más pequeñas. Su población actual supera levemente los 20.000 habitantes. La morfología insular es abrupta, con escarpadas montañas volcánicas, surcada radialmente por barrancos que surgen desde el centro de la isla, con lo que es difícil la comunicación entre las distintas zonas. Esa geografía especial motivó el desarrollo de una forma especial de lenguaje sonoro denominado «silbo gomero», de tal trascendencia que fue designado *Patrimonio de la Humanidad* en 2009.

Desde la última década del siglo pasado se había observado una mayor frecuencia de hiperoxaluria primaria tipo 1 en la población adulta de la isla de Tenerife<sup>6</sup>. Lo mismo se describió más tarde en la población pediátrica de la isla<sup>7</sup>. En 2003, miembros del Servicio de Nefrología del Hospital Universitario de Canarias identificaron la mutación c.853T>C (p.I244T) en la mayoría de los alelos del gen AGXT de pacientes con hiperoxaluria primaria tipo 1, muchos de los cuales tenían ancestros en la isla de La Gomera. Aunque la mutación p.I244T no afectaba la actividad de AGXT o su localización subcelular, cuando estaba presente el polimorfismo c.32C>T (p.P11L) en la misma molécula de la proteína, daba lugar a la pérdida de su actividad enzimática en extractos de células solubles<sup>8</sup>. Los resultados eran compatibles con un efecto fundador, es decir, originado en un antepasado común. La herencia de esta enfermedad es autosómica recesiva.

El caso de la hipercalciuria idiopática (HI) es diferente. No se considera una enfermedad sino una «anomalía metabólica» o, mejor, una característica constitutiva con la que los pacientes heredarían la disponibilidad de tener en sus células un mayor número de receptores de la vitamina D (VDR) que aquellas personas con calciurias normales. La fisiopatología de la HI ha sido resumida en un artículo reciente<sup>9</sup>.

En la década de los 90 del pasado siglo comprobamos que en la población pediátrica de la isla de La Gomera existía una frecuencia muy elevada de HI, una de las más altas del mundo (16% frente a 3,8% en el grupo control). La prevalencia en distintas poblaciones de la isla era distinta, pero más elevada en las más aisladas y peor comunicadas, lo que podría tener relación con una mayor frecuencia de endogamia que en las poblaciones mejor comunicadas<sup>10</sup>. La hipótesis que hemos formulado es que los niños de La Gomera con HI serían descendientes de los sujetos más capaces desde el punto de vista inmunológico<sup>11</sup>, es decir aquellos con más densidad de VDR, es decir, una forma de «selección natural». Por

consiguiente, la insularidad y la alta tasa de consanguinidad asociada, no serían la causa sino la forma de perpetuar esas condiciones inmunológicas favorecedoras de los sujetos que sobrevivían. Más detalles al respecto se citan en artículo antes mencionado<sup>9</sup>.

#### Características de los pacientes afectados de algunas tubulopatías diagnosticadas en la isla de Tenerife (cistinosis, síndrome de Bartter tipo IV, hipomagnesemia familiar con hipercalciuria y nefrocalcinosis)

La mayoría de los niños con tubulopatías diagnosticadas en los hospitales de Tenerife proceden de la isla de La Palma y de un área concreta del noroeste (NO) de la isla, lo que sugiere una elevada consanguinidad en esas zonas.

Hasta 2009 no se había diagnosticado ningún caso de cistinosis en Tenerife. La única paciente estudiada procede de la población de Icod de los Vinos radicada en la zona geográfica antes mencionada<sup>12</sup>.

En 1995, Landau et al. describieron cinco niños pertenecientes a una extensa familia beduina consanguínea que estaban afectados de síndrome de Bartter y sordera neurosensorial. Esta asociación se denominó síndrome de Bartter tipo IV<sup>13</sup>. El gen BSND codifica una proteína denominada «barttina» que se localiza con los canales de cloro-Ka (ClC-Ka) y canales de cloro-Kb (ClC-Kb) de las membranas basolaterales de la rama ascendente gruesa del asa de Henle y en las células de la *stria vascularis* del oído interno<sup>14</sup>.

En 2006, estudiamos en nuestro hospital dos familias de las que tres y dos miembros, respectivamente, fueron diagnosticados de síndrome de Bartter tipo IV. Ambas familias procedían de la misma zona geográfica del NO de la isla (Icod de los Vinos). En una de las dos familias, la abuela paterna de la madre de dos pacientes y la abuela paterna de la madre de un tercer paciente eran hermanas. Los miembros de ambas familias negaban que estuvieran relacionadas entre sí. El análisis de la secuencia del gen BSND mostró que todos los miembros afectados eran homocigotos para una transición C a T en el exón 1, mientras que sus padres eran heterocigotos. Esta alteración da como resultado una mutación de cambio de sentido, c.139G>A (p.G47R), de la que previamente se había demostrado que elimina su efecto favorecedor sobre la subunidad barttina del canal ClC-Kb<sup>15</sup>.

La hipomagnesemia familiar con hipercalciuria y nefrocalcinosis (HFHN) es la única tubulopatía conocida en la que las proteínas anómalas funcionan en el espacio paracelular. En 1999, Simon et al. describieron la existencia de una proteína, la paracelina-1, que es necesaria para la reabsorción tubular paracelular de magnesio. Esta proteína está localizada en las zonas de unión estrechas (*tight junction*), es decir, las estructuras intercelulares que permiten un contacto íntimo entre las células epiteliales adyacentes. Esos autores establecieron que mutaciones en el gen PCLN-1 que codifica la paracelina-1, eran las causantes de la HFHN<sup>16</sup>. La nueva proteína pasó a denominarse, más tarde, claudina-16 (gen CLDN16). Más tarde, se observó que existían pacientes con HFHN que no tenían mutaciones en el gen CLDN16. Por otro lado, se había constatado que esta tubulopatía era muy frecuente en España. De hecho su nombre definitivo procede de una publicación realizada por Manuel Praga et al. en 1995<sup>17</sup>. Cesar Loris, nefrólogo pediátrico

del Hospital Infantil Universitario Miguel Servet de Zaragoza comprobó, junto con sus colaboradores, que en los pacientes españoles, la frecuencia de alteraciones oculares era inusualmente elevada (81% frente a 24% en pacientes procedentes de otros países)<sup>18</sup>. En este sentido, fue llamativo el hecho de que los pacientes españoles con HFHN, excepto muy pocos, no tuvieran mutaciones en dicho gen<sup>19</sup>. En 2006, se resolvió la cuestión puesto que se identificaron otros pacientes con HFHN que eran portadores de mutaciones en el gen *CLDN19*, otro miembro de la familia multigénica de las claudinas. Esos niños padecían hipomagnesemia, enfermedad renal crónica (en muchos casos, precoz) y anomalías oculares graves<sup>20</sup>. Dos años después, Hou et al. demostraron que ambas claudinas actúan de forma sinérgica a través de una interacción heteromérica que establece el medio ambiente electrofisiológico necesario en las zonas de unión estrechas para obtener un mecanismo selectivo de la reabsorción de cationes en la rama gruesa ascendente del asa de Henle<sup>21</sup>. Como se verá más adelante, la mayoría de los pacientes españoles con HFHN son portadores de la misma mutación en el gen *CLDN19*. En cambio, solo conocemos la existencia de tres pacientes españoles con una mutación en el gen *CLDN16*. Uno de ellos, procede de otra población del NO de Tenerife (San José de los Llanos)<sup>22</sup>.

#### La acidosis tubular renal distal, el rey Carlos II y la ATRd tropical

De Carlos II, último rey español de la dinastía española de los Habsburgo (1516-1700), se ha publicado que podría padecer enfermedades tan dispares como panhipopituitarismo y progeria, síndrome de Klinefelter, acromegalia o síndrome X frágil. Más seguro es que tuviera convulsiones y que contrajera paludismo. Contaba con una escasa musculatura y, hasta los seis años, no pudo andar ni tenerse prácticamente en pie. Tenía una gran cabeza, que se ha achacado a que padecía hidrocefalia. Sufrió crisis epilépticas que se exacerbaban hacia el final de su vida. Sobre su actividad en sus últimos años se escribió que «es tan grande su debilidad que no puede permanecer más de una o dos horas fuera de la cama. Cuando sube o baja de la carroza siempre hay que ayudarlo»<sup>23</sup>. En 2009, Gonzalo Álvarez et al., de la Universidad de Santiago de Compostela, interesaron a la comunidad científica con sus conclusiones sobre las enfermedades que podría haber padecido el desdichado monarca. Esos autores calcularon que el coeficiente de endogamia (F) del rey era 0,254, es decir un nivel de endogamia mayor que lo que ocurriría al hijo de dos hermanos (F=0,25), lo que implica que más de la cuarta parte del ADN era idéntico en ambos alelos<sup>24</sup>. Por supuesto, ello era debido a la nefasta política de matrimonios consanguíneos propia de la dinastía reinante en España durante los siglos XVI y XVII. Álvarez y sus colaboradores comunicaron que Carlos II podría ser portador simultáneamente de dos trastornos genéticos determinados por alelos recesivos, a saber, una deficiencia combinada de hormona hipofisaria y una acidosis tubular renal distal (ATRd). Según esos autores, en Carlos II «su debilidad muscular a una edad temprana, el raquitismo, la hematuria y su cabeza grande en relación con el tamaño de su cuerpo» podrían atribuirse a este trastorno genético, la ATRd<sup>24</sup>. En la necropsia real se observó que «no

tenía el cadáver ni una gota de sangre, el corazón aparece del tamaño de un grano de pimienta; los pulmones corroidos; los intestinos putrefactos y gangrenados; en el riñón tres grandes cálculos, un solo testículo, negro como el carbón, y la cabeza llena de agua». Por supuesto, que es muy difícil saber con certeza las dolencias reales, pero no parece probable que padeciera una ATRd. Es conocido que la hipopotasemia propia de esta enfermedad puede causar una tetraparesia, pero una hipotonía muscular crónica puede tener otras muchas causas como la distrofia muscular tipo Becker, por ejemplo. Es verdad que el rey era de talla baja<sup>23</sup> pero en su historia clínica de la que se conserva muchos datos, no consta que tuviera una sintomatología característica de la ATRd que no habría pasado desapercibida a sus coetáneos, especialmente, los embajadores europeos que informaban cumplidamente de las dolencias reales a sus respectivos países. Nos referimos a la poliuria y polidipsia. Es verdad que tenía tres cálculos en la vejiga al fallecer (uno, en otra versión) pero, también, reveló lo mismo la necropsia realizada a su padre Felipe IV<sup>23</sup>. Por ello, es más probable que ambos tuvieran una hipercalciuria idiopática asociada o no a hipocitaturia que, como hemos recordado antes, está también relacionada con la consanguinidad. Se podría argüir que ambos, padre e hijo, podrían haber padecido la forma autosómica dominante de ATRd pero es muy improbable porque Felipe IV tenía una talla normal<sup>23</sup>, algo que es incompatible con una situación de acidosis metabólica crónica.

Pasando a otra cuestión, la ATRd causada por mutaciones en el gen *SLC4A1* que codifica las isoformas propias de eritrocitos y riñón del intercambiador de aniones 1 (*anion exchanger 1*, AE1 o banda 3) tiene una alta prevalencia en algunos países tropicales, en particular Tailandia, Malasia, Filipinas y Papua Nueva Guinea. En este caso, la enfermedad es casi siempre recesiva y puede ser el resultado de mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas en el gen *SLC4A1*. Estas mutaciones pueden causar cambios morfológicos en los glóbulos rojos, a menudo con un exceso de hemólisis. En cambio, la ATRd «clásica» causada por mutaciones en el gen *SLC4A1* es mucho más rara, casi siempre de herencia autosómica dominante<sup>25</sup> y producida por mutaciones que son bastante diferentes de las encontradas en los trópicos.

Oliver M. Wrong (1925-2012) fue un gran nefrólogo inglés que dedicó gran parte de su vida al estudio del equilibrio ácido-base y sus trastornos<sup>26-28</sup>. En los últimos años de su vida se dedicó a intentar dilucidar la razón de la alta frecuencia de ATRd en el Sudeste asiático. Fruto de ello fue una publicación en la que se sugería la hipótesis de que los cambios en los hematíes causados por estas mutaciones podían proteger contra la malaria<sup>29</sup>. En efecto, desde mediados los años 70 del pasado siglo, la relación entre las variantes de eritrocitos humanos y la susceptibilidad a la infección por malaria ha sido objeto de un estudio clínico y epidemiológico intensivo que se ha prolongado durante varias décadas<sup>30</sup>. En 1981, se demostró que los hematíes ovalocitos de los melanesios que habitan en Papua Nueva Guinea son resistentes a la infección por parásitos de la malaria (*Plasmodium falciparum*). El análisis del comportamiento ante la deformación térmica demostró que los ovalocitos son más termoestables que los normocitos, lo que sugería que existe una diferencia importante en la estructura del citoesqueleto<sup>31</sup>.

### El pueblo romaní y la enfermedad de Gitelman

Los estudios de genética molecular han permitido distinguir claramente el síndrome de Bartter de una enfermedad con características similares, descrita en 1966 por Gitelman, Graham y Welt<sup>32</sup>. Estos autores publicaron los datos clínicos de tres pacientes adultos, dos de ellos hermanos, afectados de hipopotasemia, hipomagnesemia y alcalosis metabólica. Durante muchos años, los pacientes con estas características fueron diagnosticados erróneamente de síndrome de Bartter del adulto. La presencia de hiperreninemia e hiperaldosteronismo, contribuyó a la confusión con el síndrome de Bartter clásico. En 1996, se estableció que la enfermedad de Gitelman es producida por una alteración en el transporte de NaCl en el túbulo contorneado distal debido a la existencia de mutaciones en el gen *SLC12A3* que codifica el cotransportador de NaCl sensible a tiazidas (thiazide-sensitive Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter, NCC), que se localiza en el lado luminal de las células del túbulo contorneado distal inicial<sup>33</sup>.

El pueblo romaní es una comunidad itinerante con una genética particular. Se cree que procede de la India y que alrededor del año 500 EC se establecieron en los Balcanes y se dispersaron por Bulgaria y otros países europeos. Aunque es difícil estimar el grado de endogamia de las comunidades romaníes se han descubierto más de nueve mutaciones que parecen ser específicas de sus miembros<sup>3</sup>. Es lo que ocurre con la enfermedad de Gitelman. La mutación c.1180+1G>T que consiste en la sustitución de guanina por timina en la posición 1 del intrón 9 del gen *SLC12A3*, es una mutación única y exclusiva de la etnia romaní. Ha sido estudiada por el Grupo de Nefrología Pediátrica y el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Universitario Central de Asturias (Dres. Coto y Santos). Se ha sugerido que constituiría una mutación de origen antiguo extendida por toda Europa en este grupo étnico<sup>34</sup>. Recientemente, este mismo grupo ha identificado una segunda mutación fundadora del gen *SLC12A3*, c.1939G>A, en pacientes gitanos que no presentan la variante c.1180+1G>T<sup>35</sup>. Esta nueva mutación supone el cambio de valina por metionina en el residuo 647 de la proteína NCC.

### Los movimientos poblacionales y algunos de los hallazgos observados en pacientes con varias tubulopatías (fig. 1)

#### Síndrome de Bartter con sordera

La creación del Grupo RenalTube, con el objetivo de mejorar el conocimiento de las tubulopatías primarias, ha permitido estudiar el ADN de pacientes con tubulopatías que proceden de fuera de España<sup>36</sup> (ver portal <http://www.renaltube.com/es/>). Ello ha permitido demostrar, por ejemplo, que la mutación G47R observada en los pacientes de Tenerife con síndrome de Bartter con sordera<sup>15</sup> es la misma que estaba presente en dos pacientes de Venezuela<sup>37</sup> y en uno de Brasil. Es conocida la alta tasa de emigración de jóvenes canarios a Venezuela («la octava isla») durante la primera mitad del siglo XX, especialmente, en los años difíciles que sucedieron a la Guerra Civil española.

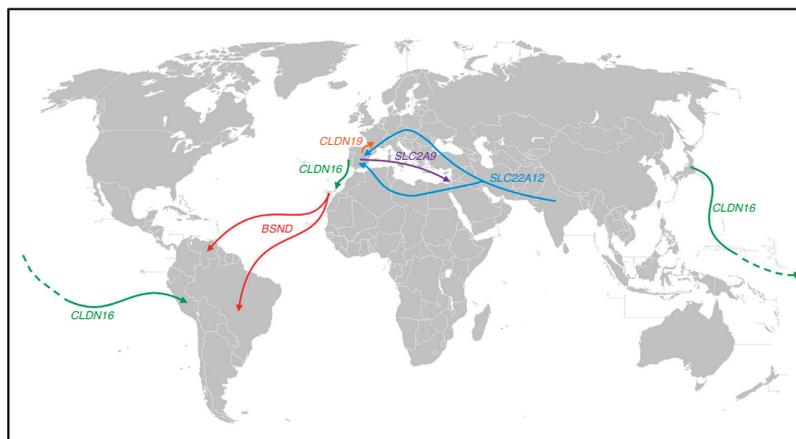
### Hipomagnesemia familiar con hipercalcemia y nefrocalcinosis. Claudina 16

Otro caso es el de un paciente procedente de la selva de Perú que había sido diagnosticado de HFHN. El análisis del gen *CLDN16* que, como se ha indicado codifica la claudina 16, detectó la mutación p.R149Q en homocigosis. Esta mutación solo se había detectado en heterocigosis en un paciente de Japón<sup>38</sup>. Es preciso recordar que a finales del siglo XIX tuvo lugar una emigración de ciudadanos japoneses al Perú para trabajar en el área agrícola.

Desde el siglo XV existió mucha presencia portuguesa en Canarias. Lanzarote no podía ser la excepción. Durante la primera mitad del siglo XV, Portugal pugnó con Castilla por la posesión de esa isla. De hecho, el portugués Antão Gonçalves fue Gobernador y Capitán General de Lanzarote los años 1448 y 1449<sup>39</sup>. Más adelante, los portugueses, excluidos de las Indias como extranjeros y admitidos sin trabas en Canarias, suplieron en esas islas la falta de brazos castellanos<sup>40</sup> aunque, a veces, la causa de su llegada era más concreta, a saber, huían de la Inquisición<sup>41</sup>. En los siglos siguientes y en las escasas circunstancias en las que la capacidad agrícola de la isla era buena gracias a las lluvias, a los lanzaroteños que regresaban de «practicar el nomadismo» por otras islas canarias, se unían personas procedentes de otras latitudes. Así, se sabe que en 1640 llegaron unos 200 lusos a Lanzarote merced, sobre todo, al intercambio comercial que existía entre Lanzarote y Madeira. Por todo lo expresado, no es de extrañar que nuestro Grupo haya detectado la mutación p.(G162V) en el gen *CLDN16* de dos pacientes hermanos de Lanzarote con HFHN que ya han sido trasplantados y que esta mutación fuera identificada en primer lugar en un paciente portugués<sup>42</sup>.

### Hipomagnesemia familiar con hipercalcemia y nefrocalcinosis. Claudina 19

Con respecto al otro gen implicado en la HFHN, el *CLDN19*, en el estudio original de Konrad et al. ya mencionado, se incluían siete pacientes españoles pertenecientes a distintas familias a los que se les detectó una misma mutación en homocigosis, p.G20D (c.59G>A) a la que denominaron mutación española/hispánica<sup>20</sup>. Esos autores sugirieron que p.G20D es una mutación fundadora. Vargas-Poussou et al. publicaron un estudio en el que describieron otros dos pacientes españoles no relacionados y 13 franceses, pertenecientes a 12 familias, con la mutación p.G20D, la mayoría en homocigosis. Las familias que provenían del suroeste de Francia eran de origen español. Los datos obtenidos mediante un análisis de microsatélites en estas familias fueron consistentes con un efecto fundador<sup>43</sup>. Posteriormente, nuestro grupo ha publicado los resultados del estudio de una cohorte española compuesta por 34 pacientes con HFHN, 20 niñas y 14 niños, miembros de 30 familias aparentemente no relacionadas<sup>44</sup>. Los datos clínicos de estos pacientes mostraron un alto riesgo de progresión hacia la enfermedad renal crónica terminal (62% con deterioro de la función renal y 20% trasplantados), que concuerda con lo observado en la serie de los pacientes franceses. Nuestros resultados también están de acuerdo con los del grupo francés en cuanto al alto porcentaje, 88% y 91% respectivamente, de pacientes con anomalías oculares graves como



**Figura 1** – Desplazamientos poblacionales y pasos que han seguido los sujetos portadores de ciertas mutaciones causantes de algunas tubulopatías descritas en el texto. La mutación G47R que causa el síndrome de Bartter se ha descrito en el NO de la isla de Tenerife, así como en Venezuela y Brasil (flechas de color rojo). La mutación p.R149Q descrita en el gen CLDN16 que codifica la claudina 16 se ha descrito tanto en Japón como en Perú; en el mismo gen, la mutación p.G162 V se ha descrito tanto en Portugal como en la isla de Lanzarote (flecha de color verde). En el gen CLDN19 se ha descrito la mutación p.G20D que está presente en la mayoría de los pacientes españoles con hipomagnesemia familiar con hipercalcemia y nefrocalcinosis y en pacientes franceses del suroeste de Francia de origen español (flecha de color naranja). En la población de origen romaní se ha descrito la mutación c.1180 + 1G>T exclusiva de este grupo étnico, que origina la enfermedad de Gitelman (flechas de color azul claro). La mutación p.T125 M observada en el gen SLC2A9 se ha identificado en pacientes españoles con hipouricemia tubular renal y en uno de origen sefardí radicado en Israel (flecha de color violeta). El color de esta figura solo puede apreciarse en la versión electrónica del artículo.

miopía magna, nistagmo y coloboma. En contraste, los nueve pacientes con mutaciones en el gen CLDN16 estudiados por el grupo francés, la mayoría de los cuales provenían del norte de África, no tenían anomalías oculares. El análisis de mutaciones en nuestra cohorte mostró que todos los pacientes tienen mutaciones en el gen CLDN19. La mutación p.G20D se detectó en el 93% de los pacientes no relacionados y estaba presente en homocigosis en el 83% de los casos<sup>44</sup>.

#### Hipouricemia tubular renal

En 1950, Praetorius y Kirk describieron el caso de un paciente con una hipouricemia llamativa (0,3 mg/dl) en el que el aclaramiento de ácido úrico era superior al de creatinina. Esto hecho, hizo asumir que el riñón de dicho individuo secretaba ácido úrico. Fue el primer caso descrito de hipouricemia tubular renal<sup>45</sup>. El transportador URAT1 que reabsorbe el urato filtrado fue identificado por Enomoto et al. en 2002<sup>46</sup>. Está localizado en la membrana apical de las células del túbulo proximal y es codificado por el gen SLC22A12. La salida del ácido úrico hacia el espacio peritubular se realiza mediante transportadores basolaterales. En 2003, Jutabna et al. identificaron un nuevo transportador de iones orgánicos voltaje sensible, transportador de glucosa 9 (GLUT9), que facilita la salida de urato de la célula<sup>47</sup> (fig. 2). Es codificado por el gen SLC2A9. En un estudio reciente, nuestro Grupo ha estudiado 10 pacientes con mutaciones en SLC22A12<sup>48</sup>. Dos mutaciones asociadas con hipouricemia renal, c.1400C>T (p.T467 M) y c.1245\_1253del

(p.L415\_G417del), son muy frecuentes en la población romaní de la Península Ibérica, lo que sugiere una incidencia alta de esta tubulopatía en esa población<sup>48,49</sup>. Además, cuatro pacientes eran portadores de la mutación p.T125 M en SLC2A9. Esta mutación se identificó inicialmente en un paciente de origen sefardí radicado en Israel<sup>50</sup>. La expulsión de los judíos de España fue ordenada en 1492 por los Reyes Católicos. Como algunos judíos equiparaban España con la *Sefarad* bíblica, recibieron el nombre de sefardíes, quienes, además de su religión, mantuvieron muchas de sus costumbres españolas y, particularmente, conservaron su lengua que deriva del castellano que se hablaba en el siglo XV.

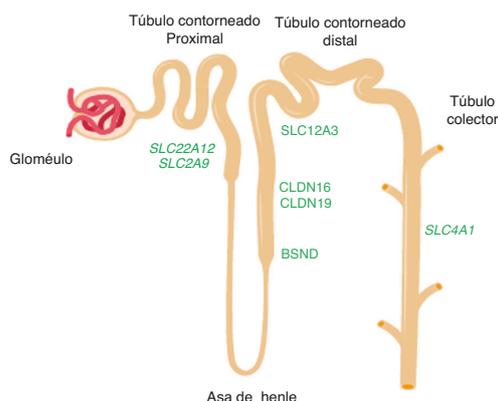
#### Conceptos clave

Las tubulopatías se definen como alteraciones clínicas en las que existe una disfunción tubular específica con afectación escasa o nula de la función glomerular.

Se trata de enfermedades hereditarias raras que son causadas por alteraciones en genes que se expresan distintas partes de la nefrona.

La mayoría de estas enfermedades tienen un patrón de herencia autosómico recesivo, y suelen ser más frecuentes en zonas aisladas geográficamente o con un mayor grado de consanguinidad.

Los desplazamientos poblacionales son la causa de la difusión de algunas de estas enfermedades. El conocimiento de estos desplazamientos permite a los investigadores perseguir



**Figura 2** – Esquema de la nefrona en el que se muestran los segmentos del túbulo donde se expresan los genes mencionados en el texto. Los genes *SLC22A12* y *SLC2A9* que codifican los transportadores de ácido úrico *URAT1* y *GLUT9* respectivamente, se expresan en el túbulo proximal renal. Los genes *CLDN16* y *CLDN19* que codifican las claudinas 16 y 19 respectivamente, se expresan en las zonas de unión estrechas de la rama gruesa ascendente del asa de Henle. El gen *BSND* que codifica la bartina se expresa en este último segmento tubular aunque, también, en las células de la *stria vascularis* del oído interno. El gen *SLC12A3* que codifica el cotransportador de NaCl sensible a tiazidas se expresa en las células del túbulo contorneado distal. El gen *SLC4A1* codifica las isoformas del intercambiador de aniones 1 (*AE1*) propias de eritrocitos y riñón. En ese último caso, la proteína se localiza en el ducto colector renal.

los pasos que han seguido determinadas mutaciones desde el origen del «ancestro fundador» hasta otros lugares del planeta muy distantes.

### Financiación

Nuestros estudios fueron financiados por el Instituto de Salud Carlos III – Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación (PI11/00342, PI14/00760, y PI17/00153) y por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional «Una manera de hacer Europa». No ha existido ningún tipo de participación por parte de estas instituciones en la realización de la investigación ni la preparación del manuscrito.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein -nephrin- is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell*. 1998;1:575–82.
2. Hallman N, Norio R, Kouvalainen K. Main features of the congenital nephritic syndrome. *Acta Paediatr Scand*. 1967;Suppl172:75–8.
3. Rutherford A. Breve historia de todos los que han vivido. El relato de nuestros genes, ed. esp. Barcelona: Pasado y presente. 2017.
4. Fareed M, Afzal M. Estimating the inbreeding depression on cognitive behavior: a population based study of child cohort. *PLoS One*. 2014;9:e109585.
5. Perera López J. La toponimia de La Gomera. Un estudio sobre los nombres de lugar, las voces indígenas y los nombres de plantas, animales y hongos de La Gomera. San Sebastián de La Gomera: Asociación Insular de Desarrollo Rural. 2005.
6. Lorenzo V, Torres A, Hernandez D, Posada J, Suria S, Getino M, et al. Evolución de la enfermedad ósea en pacientes con hiperoxaluria primaria en hemodiálisis. *Nefrología*. 1990;1:53–60.
7. Parodís López Y, Papoyan R, Inglés Torres E, Luis Yanes MI, Salido E, Sablón González N, et al. Hiperoxaluria primaria tipo 1 Evolución a largo plazo de los portadores de la mutación I244T asociada al polimorfismo P11L en el gen *AGTX*. *NefroPlus*. 2017;9:72–6.
8. Santana A, Salido E, Torres A, Shapiro LJ. Primary hyperoxaluria type 1 in the Canary Islands: a conformational disease due to I244T mutation in the P11L-containing alanine:glyoxylate aminotransferase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:7277–82.
9. García Nieto VM, Luis Yanes MI, Tejera Carreño P, Pérez Suarez G, Moraleda Mesa T. La hipercalciuria idiopática revisada ¿Anomalía metabólica o enfermedad? *Nefrología*. 2019 (en prensa).
10. Melián JS, García Nieto V, Sosa AM. Herencia y prevalencia de hipercalciuria en la población infantil de la isla de La Gomera. *Nefrología*. 2000;20:510–26.
11. García-Nieto V, Claverie-Martín F. Urolithiasis, idiopathic hypercalciuria and insularity. *Pediatr Nephrol*. 2006;21:1331–2.
12. Pérez Baena L, Luis Yanes MI, García Nieto V, Higuera M, Martín Conde L, Armas Rodríguez A. Cistinosis. Primer caso diagnosticado en Tenerife. *Can Pediatr*. 2009;33:162.
13. Landau D, Shalev H, Ohaly M, Carmi R. Infantile variant of Bartter syndrome and sensorineural deafness: A new autosomal recessive disorder. *Am J Med Genet*. 1995;59:454–9.
14. Estévez R, Boettger T, Stein V, Birkenhäger R, Otto E, Hildebrandt F, et al. Barttin is a Cl<sup>-</sup> channel  $\beta$ -subunit crucial for renal Cl<sup>-</sup> reabsorption and inner ear K<sup>+</sup> secretion. *Nature*. 2001;414:558–61.
15. García-Nieto V, Flores C, Luis-Yanes MI, Gallego E, Villar J, Claverie-Martín F. Mutation G47R in the *BSND* gene causes Bartter syndrome with deafness in two Spanish families. *Pediatr Nephrol*. 2006;21:643–8.
16. Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velázquez H, Al-Sabban E, Praga M, et al. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg<sup>2+</sup> resorption. *Science*. 1999;285:103–6.
17. Praga M, Vara J, González-Parra E, Andrés A, Álamo C, Araque A, et al. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Kidney Int*. 1995;47:1419–25.
18. Lorís C, Martín de Vicente C, Abio S, Justa ML, Ferrer C. Hipomagnesemia familiar con hipercalciuria y nefrocalcinosis y asociación con alteraciones oculares. *An Pediatr (Barc)*. 2004;61:502–8.
19. García Nieto V, González Acosta H, Vega Hernández MC, Luis Yanes MI, Espinosa L, Claverie Martín F. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis non associated to mutations in gene *CLDN16*. *Pediatr Nephrol*. 2007;22:1069.
20. Hou J, Renigunta A, Konrad M, Gomes AS, Schneeberger EE, Paul DL, et al. Mutations in the tight-junction gene claudin 19

- (CLDN 19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure and severe ocular involvement. *Am J Hum Genet.* 2006;79:949-57.
21. Hou J, Renigunta A, Konrad M, Gomes AS, Schneeberger EE, Paul DL, et al. Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation selective tight junction complex. *J Clin Invest.* 2008;118:619-28.
  22. Müller D, Kausalya J, Claverie-Martin F, Meij IC, Eggert P, García-Nieto V, et al. A novel claudin 16 mutation associated with childhood hypercalciuria abolished binding to ZO-1 and results in lysosomal mistargeting. *Am J Hum Genet.* 2003;73:1293-301.
  23. Gargantilla P. Enfermedades de los reyes de España. Los Austrias. De la locura de Juana a la impotencia de Carlos II el Hechizado. Madrid: La esfera de los libros; 2005.
  24. Alvarez G, Ceballos FC, Quinteiro C. The role of inbreeding in the extinction of a European royal dynasty. *PLoS One.* 2009;4:e5174.
  25. Karet FE, Gainza FJ, Györy AZ, Unwin RJ, Wrong O, Tanner MJ, et al. Mutations in the chloride-bicarbonate exchanger gene AE1 cause autosomal dominant but not autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:6337-42.
  26. Wrong O, Davies HEF. The excretion of acid in renal disease. *Q J Med.* 1959;28:259-313.
  27. Poy RK, Wrong O. The urinary pCO<sub>2</sub> in renal disease. *Clin Sci.* 1960;19:631-9.
  28. Walsh SB, Shirley DG, Wrong OM, Unwin RJ. Urinary acidification assessed by simultaneous furosemide and fludrocortisone treatment: an alternative to ammonium chloride. *Kidney Int.* 2007;71:1310-6.
  29. Khositseth S, Bruce LJ, Walsh SB, Bawazir WM, Ogle GD, Unwin RJ, et al. Tropical distal renal tubular acidosis: clinical and epidemiological studies in 78 patients. *Q J Med.* 2012;105:861-77.
  30. Luzzatto L. Genetics of red cells and susceptibility to malaria. *Blood.* 1979;54:961-76.
  31. Kidson C, Lamont G, Saul A, Nurse GT. Ovalocytic erythrocytes from Melanesians are resistant to invasion by malaria parasites in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78:5829-32.
  32. Gitelman HJ, Graham JB, Welt LG. A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. *Trans Assoc Am Physicians.* 1996;79:221-35.
  33. Simon DB, Nelson-Williams C, Bia MJ, Ellison D, Karet FE, Molina AM, et al. A new SLC12A3 founder mutation (p.Val647Met) in Gitelman's syndrome patients of Roma ancestry. *Nat Genet.* 1996;12:24-30.
  34. Coto E, Rodriguez J, Jeck N, Alvarez V, Stone R, Loris C, et al. A new SLC12A3 founder mutation (p.Val647Met) in Gitelman's syndrome patients of Roma ancestry. *Kidney Int.* 2004;65:25-9.
  35. Gil-Peña H, Coto E, Santos F, Espino M, Cea Crespo JM, Chantzopoulos G et al, Renaltube Group. *Nefrologia.* 2017;37:423-8.
  36. Mejía N, Santos F, Claverie-Martin F, García-Nieto V, Ariceta G, Castaño L. RenalTube group RenalTube: a network tool for clinical and genetic diagnosis of primary tubulopathies. *Eur J Pediatr.* 2013;172:775-80.
  37. Revilla N, Maldonado N, García-Nieto V, Claverie-Martin F. Mutación G47R en el gen SBSN causa síndrome de Bartter con sordera en dos hermanas venezolanas. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría.* 2009;72:135-8.
  38. Tajima T, Nakae J, Fujieda K. Two heterozygous mutations of CLDN16 in a Japanese patient with FHHNC. *Pediatr Nephrol.* 2003;18:1280-2.
  39. Bonnet Suarez SF. Antão Gonçalves Gobernador y Capitán General de Lanzarote 1448-1449. *M Can.* 1948:32.
  40. Pérez Vidal J. Esbozo de un estudio de la influencia portuguesa en la cultura tradicional canaria. Homenaje a Elías Serra Rafols. Universidad de La Laguna. 1970.
  41. Ronquillo Rubio M. Los orígenes de la Inquisición en Canarias, 1488-1526. Las Palmas: Ediciones del Cabildo Insular de Gran Canaria; 1991. p. 288.
  42. Blanchard A, Jeunemaitre X, Coudol P, Dechaux M, Froissart M, May A, et al. Paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle. *Kidney Int.* 2001;59:2206-15.
  43. Godron A, Harambat J, Boccio V, Mensire A, May A, Rigochier C, et al. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: phenotype-genotype correlation and outcome in 32 patients with CLDN16 or CLDN19 mutations. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012;7:801-9.
  44. Claverie-Martin F, García-Nieto V, Loris C, Ariceta G, Nadal I, Espinosa L, et al. Claudin-19 mutations and clinical phenotype in Spanish patients with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *PLoS One.* 2013;8:e53151.
  45. Praetorius E, Kir KJE. Hypouricemia: with evidence for tubular elimination of uric acid. *J Lab Clin Med.* 1950;35:865-8.
  46. Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha SH, et al. Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature.* 2002;417:447-52.
  47. Jutabha P, Kanai Y, Hosoyamada M, Chairoungdua A, Kim DK, Iribe Y, et al. Identification of a novel voltage-driven organic anion transporter present at apical membrane of renal proximal tubule. *J Biol Chem.* 2003;278:27930-8.
  48. Claverie-Martin F, Trujillo-Suarez J, González-Acosta H, Aparicio C, Justa Roldan ML, Stiburkova B, et al. URAT1 and GLUT9 mutations in Spanish patients with renal hypouricemia. *Clin Chim Acta.* 2018;481:83-9.
  49. Stiburkova B, Gabrikova D, Čepek P, Šimek P, Kristian P, Cordoba-Lanus E et al. Prevalence of URAT1 allelic variants in the Roma population. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2016;35:529-35.
  50. Dinour D, Gray NK, Ganon L, Knox AJ, Shalev H, Sela BA, et al. Two novel homozygous SLC2A9 mutations cause renal hypouricemia type 2. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27:1035-41.











**Universidad**  
de La Laguna