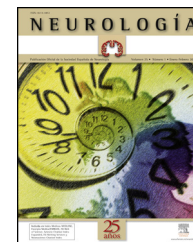




# NEUROLOGÍA

[www.elsevier.es/neurologia](http://www.elsevier.es/neurologia)



ORIGINAL

## Nueva mutación en el gen *STXBP1* en un paciente con síndrome de Ohtahara no lesional<sup>☆</sup>

L. Ortega-Moreno<sup>a,b</sup>, B.G. Giráldez<sup>a,b</sup>, A. Verdú<sup>c</sup>, O. García-Campos<sup>c</sup>,  
G. Sánchez-Martín<sup>a,b</sup>, J.M. Serratosa<sup>a,b,\*</sup> y R. Guerrero-López<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Neurología y Unidad de Epilepsia, Servicio de Neurología, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, España

<sup>b</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, España

<sup>c</sup> Unidad de Neuropediatría, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, España

Recibido el 17 de octubre de 2014; aceptado el 27 de octubre de 2014

### PALABRAS CLAVE

Genética clínica;  
Encefalopatía  
epiléptica de inicio  
precoz;  
Epilepsia;  
Síndrome de  
Ohtahara;  
*STXBP1*

### Resumen

**Introducción:** El síndrome de Ohtahara (SO, OMIM#308350, ORPHA1934) es una encefalopatía epiléptica de inicio precoz (EEIP) caracterizada por espasmos, crisis epilépticas intratables, un trazado electroencefalográfico de brote-supresión y retraso psicomotor grave. En la mayoría de los pacientes con SO se han identificado mutaciones en el gen *STXBP1*, que codifica para la proteína de unión a sintaxina 1 y que está implicado en el mecanismo de exocitosis de las vesículas sinápticas.

**Paciente y resultados:** Se presenta el caso clínico de un varón de 19 meses de edad diagnosticado de SO en el que se ha identificado una mutación no descrita (c.1249 + 2T > C, G417AfsX7) en el gen *STXBP1*. La mutación está localizada en uno de los sitios donadores implicados en el procesamiento del ARNm del gen, lo que produce la pérdida del exón 14 y el posterior truncamiento de la proteína que codifica.

**Conclusiones:** Esta nueva mutación en el gen *STXBP1*, identificada en un paciente sin lesión cerebral estructural subyacente, amplía el espectro mutacional asociado a este devastador síndrome epiléptico.

© 2014 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

<sup>☆</sup> Este trabajo fue presentado como póster en la sección de Enfermedades Neurodegenerativas del Congreso Europeo de Genética Humana (París) en 2013.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [joseserratosa@me.com](mailto:joseserratosa@me.com) (J.M. Serratosa).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2014.10.017>

0213-4853/© 2014 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Cómo citar este artículo: Ortega-Moreno L, et al. Nueva mutación en el gen *STXBP1* en un paciente con síndrome de Ohtahara no lesional. Neurología. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2014.10.017>

## KEYWORDS

Clinical genetics;  
Early-onset epileptic  
encephalopathy;  
Epilepsy;  
Ohtahara syndrome;  
*STXBP1*

## Novel mutation in *STXBP1* gene in a patient with non-lesional Ohtahara syndrome

### Abstract

**Introduction:** Ohtahara syndrome (OS, OMIM#308350, ORPHA1934) is an early-onset epileptic encephalopathy (EOEE) characterised by spasms, intractable seizures, suppression-burst pattern on the electroencephalogram, and severe psychomotor retardation. Mutations in *STXBP1*—a gene that codes for syntaxin binding protein 1 and is involved in synaptic vesicle exocytosis—has been identified in most patients with OS.

**Patient and results:** We report the case of a 19-month-old child with OS who displays a previously unreported mutation in *STXBP1* (c.1249 + 2T > C, G417AfsX7). This mutation is located in a donor splice site and eliminates exon 14, resulting in a truncated protein.

**Conclusion:** This previously unreported *STXBP1* mutation in a subject with Ohtahara syndrome and non-lesional magnetic resonance imaging (MRI) broadens the mutational spectrum associated with this devastating epileptic syndrome.

© 2014 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Introducción

El síndrome de Ohtahara (SO, OMIM#308350, ORPHA1934) es una encefalopatía epiléptica de inicio precoz (EEIP) caracterizada por espasmos, crisis epilépticas intratables, un trazado electroencefalográfico de brote-supresión y grave retraso psicomotor<sup>1</sup>. Cuando los pacientes no presentan alteraciones cerebrales a nivel estructural ni existe un trastorno metabólico subyacente, se debe considerar la posibilidad de una etiología genética. En la mayoría de los pacientes con SO se han identificado mutaciones en el gen *STXBP1*<sup>2,3</sup>.

El gen *STXBP1* codifica para una proteína de unión a sintaxina 1 que regula la secreción de las vesículas sinápticas a través de la unión a las proteínas soluble *N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor* (SNARE)<sup>4</sup>. Este complejo de proteínas tiene un papel esencial en la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática presináptica, lo que permite la liberación de los neurotransmisores en la hendidura sináptica<sup>5</sup>.

En este trabajo se describe una nueva mutación en uno de los sitios donadores implicados en el procesamiento del ARNm del gen *STXBP1* en un paciente con SO sin lesión cerebral subyacente.

## Paciente y métodos

El paciente fue diagnosticado en la Unidad de Neuropediatría del Hospital Virgen de la Salud de Toledo y se derivó para su estudio genético al Laboratorio de Neurología del IIS-Fundación Jiménez Díaz.

## Caso clínico

El paciente es un varón de 19 meses de edad, nacido de padres sanos, no consanguíneos y sin antecedentes familiares de epilepsia. En los primeros 15 días de vida presentó

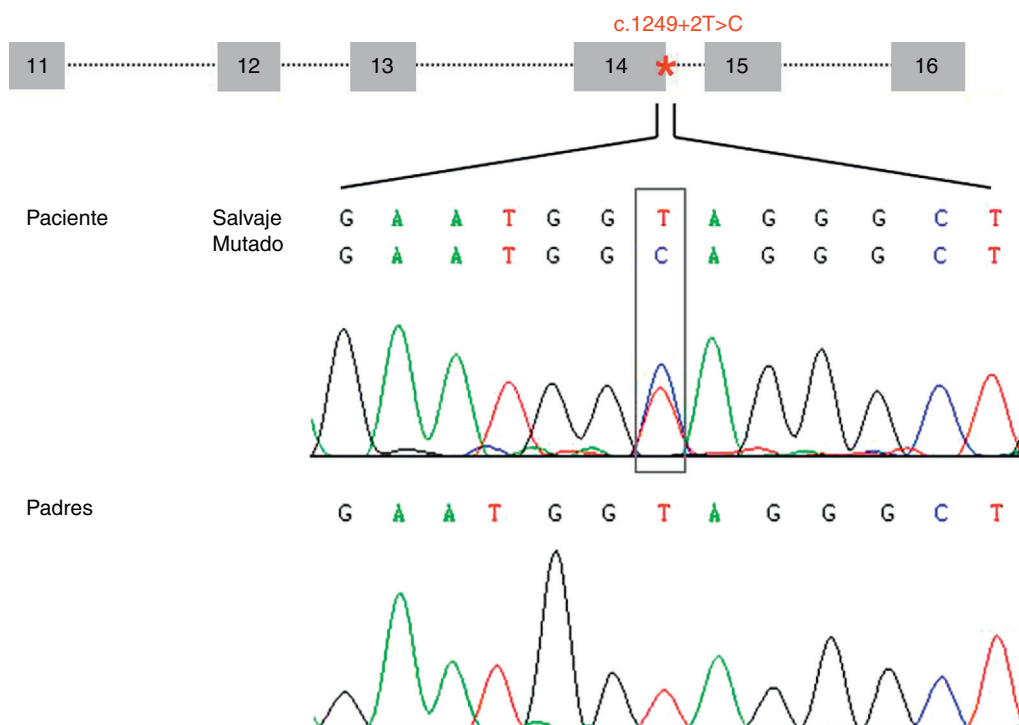
crisis epilépticas tónicas, clónicas focales y oculógiras. A los 45 días de edad, el electroencefalograma mostró un trazado de brote-supresión indicativo de SO. El examen físico no reveló dismorfias y la resonancia magnética y los estudios metabólicos no aportaron resultados positivos. A los 5 meses de edad inició espasmos. El tratamiento con vigabatrina y corticoides fue efectivo, aunque el paciente desarrolló posteriormente crisis parciales complejas refractarias. Actualmente, presenta un grave retraso psicomotor, con ausencia de soporte cefálico, ausencia de lenguaje, escasa fijación visual e hipotonía generalizada.

## Métodos

El ADN genómico se obtuvo a partir de linfocitos de sangre periférica usando protocolos estandarizados. La secuenciación del gen *STXBP1* se realizó en ambas direcciones en los fragmentos amplificados—mediante la reacción en cadena de la polimerasa— procedentes del ADN genómico, utilizando un kit de secuenciación (Life Technologies, Carlsbad, EE. UU.) y un secuenciador ABI 3130 (Life Technologies) con cebadores específicos para el gen *STXBP1*. El análisis incluyó las regiones exónicas, las zonas de unión exón/intrón y las regiones reguladoras en posición 5' y 3' de la secuencia del gen *STXBP1*. La secuencia de referencia utilizada para el análisis del ARNm del gen *STXBP1* ha sido NM\_001032221.3 (número de acceso del NCBI).

La nueva variante identificada se comprobó en 165 individuos sanos.

El ADNc se obtuvo mediante la reacción de transcripción inversa en cadena de la polimerasa del ARNm extraído de sangre total, utilizando un cebador oligo (dT) y el sistema de transcripción inversa ImProm-II (Promega, Fitchburg, EE. UU.). El ADNc fue posteriormente amplificado con cebadores específicos (5'-GAAGTCACCCGGTCTCTGAA-3' [directo] y 5'-CACCGTGAGAGCTGGTAGGT-3' [reverso]) para obtener un fragmento que incluyera del exón 11 al exón 16 del gen *STXBP1*.



**Figura 1** Representación esquemática de la estructura genómica de la zona (exones del 11 al 16) del gen *STXBP1* que contiene la mutación c.1249+2T>C (localizada en el intrón 14 e indicada con un asterisco). Los electroferogramas muestran la mutación c.1249+2T>C identificada en el paciente y la correspondiente secuencia en los progenitores, sugiriendo que es una mutación *de novo*.

La mutación se analizó con el programa Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF/>), una herramienta bioinformática que se utiliza para predecir el efecto de las variantes en zonas implicadas en el procesamiento del ARNm<sup>6</sup>.

## Resultados

Hemos identificado una nueva mutación en heterocigosis en el gen *STXBP1* (c.1249+2T>C) localizada en el sitio donador implicado en el procesamiento del ARNm del intrón 14. La mutación no se ha encontrado en los progenitores (fig. 1) y tampoco en los 165 individuos controles analizados. El análisis de esta variante con el programa bioinformático de predicción sugiere que se produce una pérdida de afinidad de la maquinaria implicada en el procesamiento del ARNm por el sitio donador que tiene la mutación ( $\Delta CV = -31,94$ ). No se predice activación de sitios crípticos.

Esta predicción se confirmó mediante amplificación de la región del ADNc que contiene la variante identificada. Se visualizó una única banda de 559 pb (amplicón correspondiente al transcrito salvaje) en el ADNc de los padres, y 2 bandas en el ADNc del paciente: la banda de 559 pb y una banda de 420 pb (amplicón correspondiente al transcrito mutado) (fig. 2A). El análisis mediante secuenciación directa reveló que el amplicón de 420 pb carece del exón 14, originándose un nuevo codón de parada

en la posición 424 de la secuencia proteica (G417AfsX7) (fig. 2B).

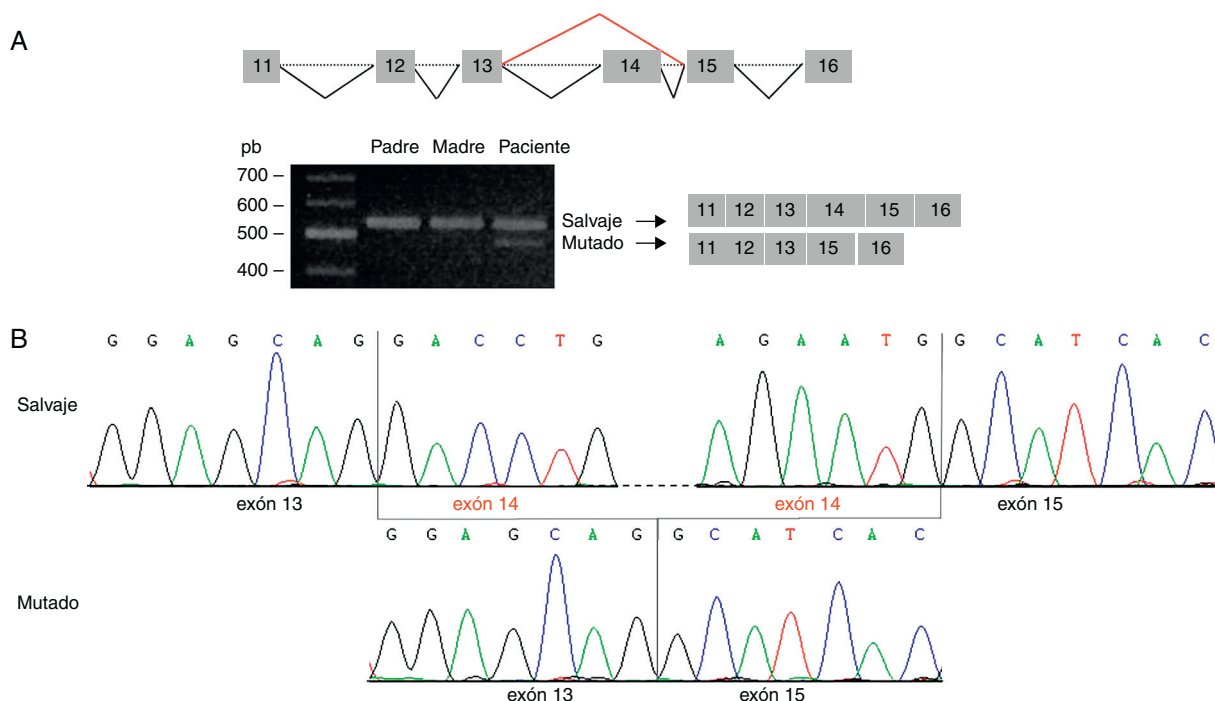
## Discusión

En este trabajo se ha identificado una nueva mutación en el gen *STXBP1* en un paciente con diagnóstico de SO sin lesión estructural cerebral subyacente.

Desde el año 2008 se han descrito mutaciones en el gen *STXBP1* en pacientes con SO, síndrome de West y EEIP, observándose en aproximadamente el 22% de los casos de SO sin lesión cerebral<sup>2,3,7</sup>.

El gen *STXBP1* está localizado en el cromosoma 9q34.11, contiene 20 exones y codifica para la proteína de unión a sintaxina 1 (STXBP1). La proteína STXBP1 regula el acoplamiento de las vesículas sinápticas, así como la liberación de los neurotransmisores mediante la unión específica a sintaxina 1A (STX1A), cambiando su conformación y regulando con ello al complejo SNARE<sup>5</sup>.

La nueva mutación identificada, c.1249+2T>C, produce la pérdida del sitio donador implicado en el procesamiento del ARNm del intrón 14. A nivel de la proteína, las consecuencias implican la pérdida completa del dominio 3b y parte del dominio 2 de STXBP1. Los dominios 1 y 3a forman la cavidad central que proporciona la superficie de unión a STX1A, un paso esencial para la formación del complejo SNARE y la posterior liberación de los neurotransmisores<sup>5</sup>. Por lo tanto, la mutación identificada no debería afectar a la unión de STXBP1 con STX1A.



**Figura 2** Análisis de la mutación c.1249 +2T > C por secuenciación del ADNc. A) La amplificación de la región del ADNc correspondiente a los exones 11-16 del gen *STXPB1* evidenció 2 tamaños de amplicón en el paciente: uno de 559 pb, visualizado también en los progenitores, y otro de 420 pb, correspondiente al amplicón del transcrito mutado. B) La secuenciación del amplicón de 420 pb confirma la pérdida del exón 14 del gen *STXPB1*.

Se han descrito mutaciones en el mismo dominio funcional de *STXPB1*<sup>9</sup>, indicando la patogenicidad de esta nueva mutación. Por otra parte, estudios realizados con *STXPB1* ortóloga de *Caenorhabditis elegans* indican que cambios en los residuos aminoacídicos anteriores a la posición p.Y402 podrían afectar al proceso de fusión de las vesículas sinápticas. El transcrito mutado probablemente sea degradado a través del mecanismo NMD, un mecanismo de degradación del ARNm mediado por mutaciones terminadoras, dando lugar a haploinsuficiencia de *STXPB1*, como se ha descrito en otros estudios realizados con mutaciones similares<sup>10</sup>.

Esta nueva mutación en el gen *STXPB1*, identificada en un paciente con SO sin lesión cerebral estructural subyacente, amplía el espectro mutacional asociado a este devastador síndrome epiléptico.

### Aprobación ética

Cada individuo participante o representante legal ha firmado un consentimiento informado aprobado por el Comité Ético de la Fundación Jiménez Díaz.

### Financiación

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2010-18586 and EUI-EURC-2011-4325). Laura Ortega Moreno tiene una beca de investigación de la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Bibliografía

- Ohtahara S, Yamatogi Y. Ohtahara syndrome: With special reference to its developmental aspects for differentiating from early myoclonic encephalopathy. *Epilepsy Res.* 2006;70:58–67.
- Saito H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, et al. De novo mutations in the gene encoding *STXPB1* (*MUNC18-1*) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet.* 2008;40:782–8.
- Saito H, Kato M, Okada I, Orii KE, Higuchi T, Hoshino H, et al. *STXPB1* mutations in early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern. *Epilepsia.* 2010;51:2397–405.
- Hata Y, Slaughter CA, Sudhof TC. Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature.* 1993;366:347–51.
- Gerber SH, Rah JC, Min SW, Liu X, de Wit H, Dulubova I, et al. Conformational switch of syntaxin-1 controls synaptic vesicle fusion. *Science.* 2008;321:1507–10.
- Desmet FO, Hamroun D, Lalonde M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human splicing finder: An online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:e67.
- Deprez L, Weckhuysen S, Holmgren P, Suls A, Van Dyck T, Goossens D, et al. Clinical spectrum of early-onset epileptic encephalopathies associated with *STXPB1* mutations. *Neurology.* 2010;75:1159–65.

8. Misura KM, Scheller RH, Weis WI. Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature*. 2000;404:355–62.
9. Weimer RM, Richmond JE, Davis WS, Hadwiger G, Nonet ML, Jorgensen EM. Defects in synaptic vesicle docking in unc-18 mutants. *Nat Neurosci*. 2003;6:1023–30.
10. Saitsu H, Kato M, Matsumoto N. Haploinsufficiency of *STXBP1* and Ohtahara syndrome. En: Noebels JL, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, Avoli M, editores. *Jasper's basic mechanisms of the epilepsies*. Bethesda: National Center for Biotechnology Information (US); 2012. p. 824–34.