

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 114**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2012 PCT/US2012/041406**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012 WO12170725**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2012 E 12797596 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2718466**

54 Título: **Materiales y procedimiento para identificar portadores de atrofia muscular espinal**

30 Prioridad:

07.06.2011 US 201161494282 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

31.01.2019

73 Titular/es:

**ICAHN SCHOOL OF MEDICINE AT MOUNT SINAI
(100.0%)**

**One Gustave L. Levy Place Box 1675
New York, NY 10029-6574, US**

72 Inventor/es:

**EDELMANN, LISA y
DESNICK, ROBERT J.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 698 114 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Materiales y procedimiento para identificar portadores de atrofia muscular espinal

Campo

5 La tecnología desvelada generalmente se relaciona con el campo del asesoramiento genético y, de manera más particular, con los procedimientos de identificación de portadores de determinantes genéticos asociados con afecciones deletéreas.

Antecedentes

10 La atrofia muscular espinal es una de las enfermedades autosómicas recesivas más comunes y graves, con una incidencia general de aproximadamente 1 por cada 6.000 a 10.000 nacidos vivos y una frecuencia de portador de 1 por cada 35 a 1 por cada 117, según la etnia. La enfermedad se caracteriza por la degeneración progresiva y la pérdida de células del asta anterior en la médula espinal y los núcleos del tronco encefálico que causan debilidad muscular simétrica y atrofia, y los subtipos clínicos se basan principalmente en la edad de inicio. La enfermedad de tipo I (enfermedad de Werdnig-Hoffmann, MIM nº 253300), que se presenta en el 60-70% de los pacientes, se caracteriza por la aparición de insuficiencia respiratoria al nacer o antes de los seis meses de edad, lo que lleva a la muerte dentro de los dos primeros años. Los pacientes de tipo I nunca se sientan o caminan. El inicio de la enfermedad de Tipo II (MIM nº 253550) ocurre generalmente después de los 6 meses de edad; estos bebés pueden sentarse, pero nunca caminar sin ayuda y tienen reducida significativamente la esperanza de vida. Los pacientes con enfermedad de tipo III (síndrome de Kugelberg-Welander, MIM nº 253400), se presentan después de los 18 meses de edad, se ponen de pie y caminan, pero a menudo quedan limitados a una silla de ruedas durante la infancia o la edad adulta temprana. La enfermedad de tipo IV (MIM nº 271150) se caracteriza por el inicio en la edad adulta (edad promedio de 35 años) y la progresión lenta de la enfermedad.

25 Las mutaciones homocigóticas del gen *SMN1* en el cromosoma 5q13.2 son la causa principal de AME (Lefebvre y col., Cell 80: 155-165, 1995). En aproximadamente el 95-98% de los pacientes con AME, ambas copias de los exones 7 y 8 de *SMN1* se eliminan o se vuelven no funcionales debido a la conversión génica de *SMN1* a *SMN2* (Ogino y col., J. Hum. Genet. 12:1015-1023 (2004)). El 2-5% restante de los pacientes son heterocigotos compuestos que portan una(s) mutación(es) intragénica(s) en un alelo y una mutación por delección o de conversión génica en el otro alelo (Wirth y col., Am J. Hum. Genet. 64:1340-1356, 1999). *SMN1* y *SMN2* están separados por aproximadamente 1.4 Megabases y comprenden los miembros teloméricos y centroméricos, respectivamente, de un conjunto de genes, incluido el *NAIP*, presente dentro de una duplicación segmentaria en 5q13.2. Los genes *SMN1* (secuencia de referencia NCBI NG_008691) y *SMN2* tienen una alta similitud de secuencia incluso en las regiones promotoras y no hay diferencias de aminoácidos codificados. Sin embargo, un solo cambio de base que afecta a un potenciador de empalme supuesto en el exón 7 (840C> T; posición 27006 de la SEQ ID NO: 1), da cuenta de las diferencias de empalme de manera que la mayoría de los transcritos de *SMN2* carecen del exón 7 (Lorson y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 96: 6307-6311 (1999)). Aunque se han establecido algunas correlaciones genotipo/fenotipo entre los pacientes que portan mutaciones puntuales de *SMN1*, la presencia de copias adicionales de *SMN2* modifica positivamente el pronóstico clínico (Wirth y col., 1999).

40 La mayoría de las mutaciones que causan los cuatro tipos de AME (es decir, los Tipos I-IV) implican la pérdida de número de copias de *SMN1*. La detección de mutaciones generalmente implica la amplificación por PCR del exón 7 de *SMN1*, que está ausente de manera homocigótica en la mayoría de los individuos afectados. El análisis de portadores, sin embargo, se realiza mediante procedimientos sensibles a la dosis pero no sensibles a la ubicación que pueden distinguir *SMN1* y *SMN2*, pero que no proporcionan información sobre la ubicación del gen. Estos análisis de portadores se realizan actualmente utilizando PCR cuantitativa (qPCR), Amplificación de Sondas dependiente de Ligandos Múltiples (MLPA) y/o tecnología cuantitativa Taqman. Estos procedimientos no pueden determinar el número de copias de *SMN1* presentes en cromosomas individuales. Dado el estrecho vínculo de los genes *SMN1* y *SMN2* relacionados estructuralmente y la oportunidad para la conversión de genes, así como la duplicación o delección de genes, no es sorprendente que estos procedimientos muestren una detectabilidad que varíe entre el 71 y el 94% debido a la incapacidad de identificar a los individuos que son portadores silenciosos de AME, tales como portadores silenciosos (2+0). Se necesita urgentemente información sobre la ubicación de los genes para permitir que el asesoramiento genético considere los efectos de la segregación en la producción de células germinales y sus implicaciones para la descendencia. Los individuos con dos copias de *SMN1* en un cromosoma (un alelo de duplicación) y ninguna copia en el otro (un alelo de delección), se denominan portadores silenciosos (2+0), ya que la mayoría de los individuos con dos copias de *SMN1* intactas, una copia en cada cromosoma (1+1) no son portadores (fig. 1). Por lo tanto, la detección de portadores de AME mediante técnicas actuales que no son sensibles a la ubicación genera resultados negativos falsos.

55 La frecuencia de portadores silenciosos (2+0) varía según la etnia y es directamente proporcional al producto de la frecuencia de alelos de delección y duplicación en una población dada. Entre los judíos Askenazis, se ha informado que la frecuencia de portadores de AME es de 1 por cada 41 con una detectabilidad de aproximadamente el 90%. Del 10% restante, aproximadamente el 8% son portadores silenciosos (2+0) y el resto portan mutaciones intragénicas. La frecuencia de portadores silenciosos de *SMN1* (2+0) en cualquier población modifica el riesgo de

ser portador después de un resultado de análisis negativo. Por ejemplo, en la población afroamericana (AA), la frecuencia de duplicación (2+1) de los individuos es relativamente alta (47%) y, en consecuencia, hay más portadores silenciosos (2+0), de modo que la tasa de detección de portadores es solo del 71% con un riesgo residual de 1 por cada 121 después de un resultado negativo.

- 5 En consecuencia, existe una necesidad en la técnica de analizar procedimientos para AME y para los portadores de AME que son sensibles a la ubicación además de ser sensibles al número de copias, por ejemplo, números de copias de alelos *SMN1* y/o *SMN2*. Una evaluación precisa del riesgo de producir descendencia con AME requiere el conocimiento tanto de los números de copias de *SMN1* y/o *SMN2* como de la ubicación de los alelos que se encuentran en un genoma dado. Tal información es vital para el asesoramiento genético competente de los futuros padres.

Sumario

15 La tecnología desvelada en el presente documento resuelve al menos uno de los problemas mencionados anteriormente en la técnica. De manera más específica, la divulgación proporciona procedimientos para identificar portadores de AME, tales como portadores de AME silenciosos, como se ejemplifica por portadores de AME silenciosos (2+0). La capacidad de identificar portadores silenciosos (2+0) mejoraría significativamente la detección de portadores y, por lo tanto, los esfuerzos se dirigieron a identificar los alelos fundadores de delección y/o duplicación de *SMN1* específico de etnia mediante el análisis de un genotipo único para los alelos de delección o duplicación presentes en portadores silenciosos (2+0).

20 La divulgación proporciona alelos fundadores en AJ para *SMN1*, incluido uno que está presente en aproximadamente la mitad del total de individuos AJ con duplicación de *SMN1* (2+1). Este haplotipo de duplicación se puede identificar por dos polimorfismos altamente específicos estrechamente vinculados en *SMN1* (SEQ ID NO: 1), g.27134T> G (posición 27134 de la SEQ ID NO: 1) en el intrón 7 y g.27706_27707delAT (posiciones 27706 y 27707 de la SEQ ID NO: 1) en el exón 8. Estos polimorfismos, y otras características genéticas observadas en esta divulgación, llevan la numeración utilizada para la secuencia de referencia *SMN1* presentada en Genbank con el número de acceso NG_008691.1 (secuencia de referencia de ARNm afín NM_000344.3; secuencia de referencia de aminoácidos codificada NP_000335.1). Estos polimorfismos se pueden usar junto con procedimientos sensibles a la dosis para detectar portadores silenciosos (2+0) y mejorar la tasa de detección general de portadores en un grupo étnico particular, como el grupo judío Askenazi y en otros grupos étnicos o raciales, como Caucásicos, Asiáticos, Afroamericanos e Hispanos. Por ejemplo, cualquiera de estos polimorfismos o ambos se pueden detectar utilizando cualquier técnica conocida, incluyendo, pero sin limitación, la hibridación de sonda en condiciones rigurosas, en donde la secuencia de la sonda es perfectamente complementaria a una secuencia que incluye el sitio polimórfico, una amplificación por PCR acoplada al análisis de secuencia, polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción, y similares. En vista de los polimorfismos desvelados en el presente documento, además, se contempla que estos puntos calientes relativos podrían producir otras formas de cambios localizados en la secuencia de ácido nucleico, tales como delecciones de 1-5 o 1-10 nucleótidos, inserciones de 1-5 o 1-10 nucleótidos y sustituciones en la posición 27134 de la SEQ ID NO: 1 en las que cualquier nucleótido convencional reemplaza la T/U de tipo salvaje y/o la AT de tipo salvaje en las posiciones 27706-27707 de la SEQ ID NO: 1.

Los aspectos particulares de la divulgación se describen en los siguientes párrafos enumerados.

- 40 1. Un procedimiento para identificar un sujeto humano como un portador de un alelo de duplicación de *SMN1* que comprende:

(a) analizar un ácido nucleico de una muestra de un sujeto humano determinando

(i) la identidad del nucleótido correspondiente a la posición 11678 de la SEQ ID NO: 1; o

(ii) la identidad del nucleótido correspondiente a la posición 15774 de la SEQ ID NO: 1; o

(iii) la identidad del nucleótido correspondiente a la posición 22804 de la SEQ ID NO: 1; o

45 (iv) la identidad del nucleótido correspondiente a la posición 26190 de la SEQ ID NO: 1; o

(v) la identidad del nucleótido correspondiente a la posición 27134 de la SEQ ID NO: 1, o

(vi) si se ha delecionado el dinucleótido A-T correspondiente a las posiciones 27706-27707 de la SEQ ID NO: 1; y

(b) identificar al sujeto humano como un portador de un alelo de duplicación de *SMN1* si

50 (i) el nucleótido correspondiente a la posición 11678 de la SEQ ID NO: 1 no es G o hay un nucleótido insertado entre los nucleótidos correspondientes a las posiciones 11678 y 11679 de la SEQ ID NO: 1;

(ii) el nucleótido correspondiente a la posición 15774 de la SEQ ID NO: 1 no es G o hay un nucleótido insertado entre los nucleótidos correspondientes a las posiciones 15774 y 15775 de la SEQ ID NO: 1;

(iii) el nucleótido correspondiente a la posición 22804 de la SEQ ID NO: 1 no es G o hay un nucleótido insertado entre los nucleótidos correspondientes a las posiciones 22804 y 22805 de la SEQ ID NO: 1;

(iv) el nucleótido correspondiente a la posición 26190 de la SEQ ID NO: 1 no es A o hay un nucleótido insertado entre los nucleótidos correspondientes a las posiciones 26190 y 26191 de la SEQ ID NO: 1;

5 (v) el nucleótido correspondiente a la posición 27134 de la SEQ ID NO: 1 no es T o hay, al menos, un nucleótido insertado entre los nucleótidos correspondientes a las posiciones 27134 y 27135 de la SEQ ID NO: 1; o

(vi) está deleciónado el dinucleótido A-T correspondiente a las posiciones 27706-27707 de la SEQ ID NO: 1.

10 2. El procedimiento de acuerdo con el párrafo 1 en el que el sujeto humano se identifica como un portador de un alelo de duplicación de *SMN1* basándose en la presencia de una estructura de nucleótido seleccionada del grupo que consiste en una T correspondiente al nucleótido en la posición 11678 o 11679 de la SEQ ID NO: 1, una A correspondiente al nucleótido en la posición 15774 o 15775 de la SEQ ID NO: 1, una A correspondiente a la posición 22804 o 22805 de la SEQ ID NO: 1, una G correspondiente al nucleótido en la posición 26190 o 26191 de la SEQ ID NO: 1, una G correspondiente al nucleótido en la posición 27134 o 27135 de la SEQ ID NO: 1 y una deleción AT correspondiente a los nucleótidos en las posiciones 27706-27707 de la SEQ ID NO: 1.

15 3. Un procedimiento para identificar un portador silencioso humano (2+0) de Atrofia Muscular Espinal (AME) que comprende:

(a) analizar el ácido nucleico de un sujeto humano determinando

20 (i) la identidad del nucleótido correspondiente a la posición 27134 de la SEQ ID NO: 1, o

(ii) si se ha deleciónado el dinucleótido A-T correspondiente a las posiciones 27706-27707 de la SEQ ID NO: 1; y

25 (b) identificar un individuo como un portador silencioso (2+0) de AME si el nucleótido correspondiente a la posición 27134 de la SEQ ID NO: 1 no es una T o si está deleciónado el dinucleótido AT correspondiente a las posiciones 27706-27707 de la SEQ ID NO: 1, o ambas cosas.

4. Un procedimiento para identificar un portador silencioso humano (2+0) de Atrofia Muscular Espinal (AME) que comprende:

(a) determinar la identidad del nucleótido correspondiente a la posición 27134 de la SEQ ID NO: 1;

30 (b) determinar además si se ha deleciónado el dinucleótido A-T correspondiente a las posiciones 27706-27707 de la SEQ ID NO: 1; y

(c) identificar un individuo como un portador silencioso (2+0) de AME si el nucleótido correspondiente a la posición 27134 de la SEQ ID NO: 1 es G o si está deleciónado el dinucleótido AT correspondiente a las posiciones 27706-27707 de la SEQ ID NO: 1.

35 5. El procedimiento de acuerdo con el párrafo 4, en el que la identidad del nucleótido correspondiente a la posición 27134 de la SEQ ID NO: 1 y las identidades de los nucleótidos correspondientes a las posiciones 27706 y 27707 de la SEQ ID NO: 1 se determinan mediante polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción.

6. El procedimiento de acuerdo con el párrafo 4, en el que se identifica una G en la posición correspondiente a la posición 27134 de la SEQ ID NO: 1 por polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción utilizando la endonucleasa de restricción HpyCH4III.

40 Otros rasgos y ventajas de la presente divulgación serán evidentes a partir de las siguientes descripciones detalladas, incluidos los dibujos. Debería entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas, se proporcionan solo con fines ilustrativos, ya que se harán evidentes diversos cambios y modificaciones dentro del ámbito de la invención para los expertos en la materia a partir de la descripción detallada.

45 **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1. Se proporciona un esquema de los alelos *SMN1* y *SMN2* en el cromosoma 5q13. (A) Tipo salvaje con una copia de *SMN1* y *SMN2* en cada cromosoma 5 (1+1) (B) Portador de AME con una copia de *SMN1* en un cromosoma 5 y pérdida de *SMN1* en el otro cromosoma (1+0). (C) Duplicación con dos copias de *SMN1* una en un cromosoma 5 y una copia en el otro cromosoma (2+1) (D) Portador silencioso de AME con dos copias de *SMN1* en un cromosoma 5 y pérdida de *SMN1* en el otro cromosoma (2+0).

50 Figura 2. Se muestra un esquema de Locus AME y Marcadores de Microsatélites de Flanqueo en 5q13.2. En la parte superior de la figura se encuentran los marcadores de microsatélites utilizados para el análisis de

individuos AJ con deleciones o duplicaciones de *SMN1* (coordenadas genómicas obtenidas del navegador de UCSC Genome Browser, NCBI36/HG18). Se muestran a continuación los locus AME, incluidas las repeticiones de copia baja con *SMN2* en la copia proximal y *SMN1* en la copia distal, desde las coordenadas genómicas 68.9 Mb a 70.36 Mb en 5q13.2. La orientación de cada uno de los genes se indica mediante la dirección de las flechas y se tomó a partir del contig genómico NT_006713.14.

Figura 3. Los polimorfismos g.27134T> G y g.27706_27707delAT en *SMN1* (Nº de acceso en Genbank NG_008691.1). (A) Secuencia genómica parcial de *SMN1*. Los exones están sombreados. Las secuencias de cebadores utilizadas para la amplificación y secuenciación se indican con *. Los polimorfismos se denotan con la designación dbSNP o mediante coordenadas genómicas y se indican encima de la secuencia y se denotan con asteriscos arriba (cebadores directos) o abajo (cebadores inversos). (B) trazas de secuencia que corresponden a (a) homocigoto g.27134T, (c) heterocigoto g.27134T/G, (e) homocigoto g.27134G y g.27706_27707delAT (b) de tipo salvaje, (d) heterocigoto g.27706_27707delAT y (f) homocigoto g.27706_27707delAT. (C) Ganancia de un sitio de restricción hpyCH4III creado en g.27134T> G. Los carriles 10, 11 y 12 representan resultados con g.27134T (371 pb), los carriles 2-7 representan resultados con individuos heterocigotos para g.27134T/G (371 pb, 218 pb y 153 pb) y los carriles 1 y 9 muestran resultados para individuos homocigotos para g.27134G (218 pb y 153 pb). M es el carril marcador con una escalera mostrada de 50 pb.

Descripción detallada

La Atrofia Muscular Espinal (AME) es la enfermedad hereditaria letal más común en niños. Aproximadamente el 94% de los individuos humanos afectados muestran una pérdida bialélica del exón 7 de *SMN1* y se sabe que dichas pérdidas son el resultado de mutaciones puntuales intragénicas que alteran los patrones de empalme del ARNm de *SMN1*, deleciones intragénicas que eliminan al menos parte del exón 7 así como la pérdida de la región de codificación *SMN1* a través de la deleción. Dispuestos en el cromosoma 5 humano están *SMN1* (SEQ ID NO: 1) y *SMN2* (que difiere de la secuencia de *SMN1* expuesta en la SEQ ID NO: 1 por C> T en la posición 27006 de la SEQ ID NO: 1). Estos dos genes son altamente homólogos, con una ubicación relativa telomérica para *SMN1* y una ubicación relativa centromérica para *SMN2*. La secuencia del gen *SMN2* difiere de la secuencia de *SMN1* en el exón 7 debido a una mutación puntual y esta diferencia es suficiente por sí sola para producir AME. Dada la proximidad relativa de *SMN1* y *SMN2*, y dada la presencia de repeticiones en esta región localizada del cromosoma 5 (es decir, 5q13.2), la genética de AME se complica por la posibilidad de conversión génica así como de duplicaciones y/o deleciones. Aunque los procedimientos actuales pueden identificar mutaciones individuales en términos de variación de secuencia e incluso pueden proporcionar una medida del número de copias de *SMN1*, estos procedimientos no pueden discriminar más allá del número de copias para identificar portadores de AME que tienen, por ejemplo, excesivas copias del gen *SMN1* en un cromosoma y ninguna copia de *SMN1* en el otro cromosoma. En ejemplos particulares, el número de copias de dos de tipo salvaje para *SMN1* está presente en el genoma de los portadores de AME debido a un desequilibrio de *SMN1* en los homólogos del cromosoma 5 (es decir, ambas copias de *SMN1* en un miembro del par de cromosomas 5). La divulgación promueve los esfuerzos para identificar portadores de AME al proporcionar procedimientos para identificar portadores silenciosos de Atrofia Muscular Espinal (AME) que contienen una carga de *SMN1* cromosómicamente desequilibrada, tal como los portadores de AME silenciosos (2+0).

Para ayudar a comprender la descripción detallada de las composiciones y procedimientos de acuerdo con la divulgación, se proporcionan algunas definiciones expresas para facilitar una divulgación no ambigua de los diversos aspectos de la divulgación.

Un "polimorfismo" es una diferencia en la secuencia de ADN o ARN entre individuos, grupos, o poblaciones que dan origen a diferentes alelos. Los alelos pueden ser alelos de un gen que codifica un producto génico, como *SMN1*, y el polimorfismo puede implicar un cambio de secuencia (en relación con la secuencia de tipo salvaje) en la región codificante, en la región transcrita pero no traducida asociada con un gen, en la región de control de la expresión de un gen, en el entorno de ácido nucleico proximal de un gen o ubicado a cierta distancia del gen. Normalmente, los polimorfismos de interés en la identificación de portadores de AME estarán vinculados genéticamente al gen *SMN1*. Los polimorfismos ejemplares incluyen sustituciones de uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) nucleótidos, deleciones de una región polinucleotídica que comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 500, 1.000 o más nucleótidos e inserciones de nucleótidos en una región polinucleotídica en el que la inserción es de una longitud definida anteriormente en el contexto de las deleciones de direccionamiento.

Un "SNP" es un polimorfismo de nucleótido único, o una diferencia de un único nucleótido en la secuencia de ácido nucleico en relación con la secuencia de tipo salvaje.

Tal como se usa en el presente documento, un "haplotipo" es un genotipo parcial de al menos un determinante que contiene al menos un polimorfismo, como el polimorfismo de nucleótido único (SNP), una deleción o una inserción, en un cromosoma. Para los haplotipos que comprenden más de un polimorfismo, los polimorfismos individuales muestran un desequilibrio de enlace estadísticamente significativo. Los polimorfismos ejemplares son sustituciones, inserciones o deleciones de nucleótidos únicos o múltiples y cada polimorfismo se puede localizar en un determinante que es un gen reconocido en la técnica, tal como *SMN1*, un nuevo gen o una región extragénica de un

cromosoma.

"Número de copia" se refiere al número de copias físicas de un determinante genético, como un gen o región del genoma de un organismo.

5 Un "portador" o "portador genético" es un individuo que contiene al menos una copia de un alelo de un determinante genético involucrado en la elaboración de un fenotipo dado, tal como AME, siempre que el individuo que contiene la copia o copias del determinante no muestre el fenotipo.

Un "portador silencioso" es un portador que no puede detectarse utilizando una técnica convencional de diagnóstico basada en el número de copias en la técnica.

10 AME es una enfermedad panétnica, y se conoce la frecuencia del número de copias del exón 7 de *SMN1* en varios grupos étnicos. En particular, las frecuencias genotípicas del exón 7 de copia única varían desde el 2,7% (1 de 37) en la población Caucásica, el 2.2% (1 de 46) en la población judía Askenazi, el 1.8% (1 de 56) en la población Asiática, el 1.1% (1 de 92) en la población Afroamericana, hasta el 0.8% (1 de 125) en la población Hispana. Hendrickson y col., J. Med. Genet. 46:641-644 (2009). Por lo tanto, la divulgación no se limita a la aplicación
15 de portadores de AME como los portadores de AME silenciosos (2+0) en cualquier población étnica, incluidas las poblaciones caracterizadas en el presente documento.

20 La identificación de alelos fundadores de delección/duplicación proporciona un enfoque general para la detección de portadores silenciosos y mejorar la detección de portadores en varios grupos étnicos/raciales, como lo ejemplifican los datos desvelados en el presente documento que se relacionan con la población judía Askenazi (AJ). Los datos
25 identifican alelos fundadores en la población judía Askenazi (AJ). El análisis de portadores de 692 adultos sanos AJ se realizó mediante un análisis de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA), que identificó 1 de 46 (2,2%) portadores de delección (1+0), y 1 de 7 individuos de duplicación (2+1). Estos datos indican que la detectabilidad del portador que utiliza solamente la dosis del gen *SMN1* en esta población es alrededor del 90%. Los análisis de
30 microsatélites de marcadores que flanquean el locus AME identificaron dos haplotipos de delección y un haplotipo causante de duplicación principal. Cabe destacar que, se detectaron dos polimorfismos estrechamente vinculados a *SMN1*, es decir, g.27134T> G en el intrón 7 (posición 27006 de SEQ ID NO: 1, véase número de acceso en Genbank NG_008691.1) y g.27706_27707delAT en el exón 8 (posiciones 27706-27707 de SEQ ID NO: 1, véase
35 número de acceso en Genbank Acc. NG_008691.1), en el alelo de duplicación principal de AJ, pero no en 351 individuos AJ con dos copias de *SMN1*, lo que hace que el haplotipo sea altamente específico para alelos de duplicación y aumente de manera eficaz la precisión de detección de portadores. Se espera obtener la mayor
precisión diagnóstica cuando se analicen los dos polimorfismos identificados anteriormente, pero la divulgación comprende procedimientos diagnósticos que analizan el polimorfismo solo o junto con uno o más polimorfismos. Se espera que la identificación de marcadores específicos para alelos de duplicación o delección mejore la detectabilidad del portador y reduzca el riesgo residual actual debido a la incapacidad de detectar portadores silenciosos (2+0) en cualquier población.

40 En 2008, El Colegio Americano de Genética Médica (ACMG) recomendó ofrecer pruebas de análisis de AME a todas las parejas sin importar la raza o la etnia. El asesoramiento genético para AME antes de la concepción se complica por la naturaleza de las mutaciones, que implican la pérdida del número de copias de *SMN1* por delección o conversión de genes con la copia centromérica altamente homóloga, *SMN2*, así como la alta tasa de mutaciones de
45 novo en el locus. Dado que la mayoría de las mutaciones implican la pérdida del número de copias, la detectabilidad del portador está limitada por la tasa de falsos negativos que varía del 4% al 27%, según el origen étnico, debido a la incapacidad de detectar portadores silenciosos (2+0) con dos copias de *SMN1* en un cromosoma y ninguno en el otro.

50 Para superar esta limitación y aumentar la detectabilidad de los portadores de AME en la población AJ, se buscaron alelos fundadores con polimorfismos únicos para distinguir los portadores silenciosos (2+0) de los individuos de tipo salvaje (1+1). El análisis de 692 individuos AJ por MLPA estableció las frecuencias de los alelos *SMN1* normales, delecionados y duplicados e identificó los individuos con delección (1+0) y duplicación (2+1) para buscar haplotipos de alelo único de delección y/o duplicación alrededor del locus *SMN1*. Los estudios de haplotipos de la población AJ se vieron favorecidos por la disponibilidad de mutaciones causantes identificadas en bloques de haplotipos compartidos, lo que facilitó la detección de portadores de trastornos recesivos prevalentes entre los individuos AJ.

55 Para buscar posibles alelos fundadores, se realizaron análisis de microsatélites con marcadores que flanqueaban el locus *SMN1* y se realizaron estudios de asociación de rasgos de marcador con cuatro de los marcadores más estrechamente vinculados (D5S681-D5S435-MS1-D5S610; SEQ ID NO: 5, 6, 2 y 7, respectivamente), tal como se describe en los siguientes ejemplos. Se presentó D5S681 en Morrison y col., Hum Mol Genet. 2(10):1753 (1993); Soares y col., Genomics. 15(2):365-71 (1993) presentó D5S435; para D5S610, véase Velasco y col., Eur J Hum Genet. 3(2):96-101 (1995). MS1 es un marcador de microsatélites recientemente identificado, al igual que MS2 (SEQ ID NO: 3) y MS3 (SEQ ID NO: 4). Los microsatélites también se denominan repeticiones de secuencias simples y constituyen una clase de polimorfismos genéticos comúnmente utilizados para el mapeo, el análisis de enlace y el rastreo de patrones de herencia. Normalmente, los microsatélites son secuencias repetidas en tándem. El número

de veces que se repite la unidad en un microsatélite dado puede ser muy variable, una característica que los hace útiles como marcadores genéticos.

Una comparación de las frecuencias de haplotipos en los individuos con delección (1+0) y duplicación (2+1) con los controles AJ no portadores, identificó dos haplotipos específicos de dos delecciones y tres duplicaciones con valores de $p \leq 0,001$ (Tabla 3). De estos haplotipos, uno apareció en aproximadamente el 46,4% (32/69) de los alelos de duplicación probados, pero estuvo ausente en los 78 individuos AJ control, lo que lo hace altamente específico. Los siguientes ejemplos ilustran realizaciones de la divulgación. El Ejemplo 1 desvela materiales y procedimientos utilizados en los estudios descritos en el presente documento. El Ejemplo 2 proporciona los resultados del análisis genético de la población AJ para las delecciones e inserciones asociadas con *SMN1*, junto con una determinación de la frecuencia de portadores silenciosos (2+0) de mutaciones de *SMN1* asociadas con AME. En el Ejemplo 3 se desvelan los resultados de los análisis genéticos de los grupos de mutación por delección (1+0) y duplicación (2+1) en la población AJ. El ejemplo 4 desvela la reconstrucción de haplotipos en individuos con delecciones (1+0) o duplicaciones (2+1). El ejemplo 5 describe la secuenciación del alelo de duplicación principal en la población AJ, la identificación de dos polimorfismos adicionales y la caracterización de estos polimorfismos en varias poblaciones humanas. El ejemplo 6 proporciona los resultados de los análisis de RFLP basados en el SNP g.27134T> G del exón 7 de *SMN1*. El Ejemplo 7 desvela datos y análisis de los mismos que establecen la identificación mejorada de portadores de AME, por ejemplo, portadores de AME silenciosos (2 + 0), en varios grupos raciales y étnicos.

Ejemplo 1

Recolección de muestras y aislamiento de ADN

El ADN genómico se obtuvo con el consentimiento informado de las muestras de sangre periférica de individuos anónimos de ascendencia Judía Askernazi, Afroamericana, Hispana y Europea que viven en el área metropolitana de Nueva York. Se aisló el ADN utilizando el kit de purificación de ADN Puregene® (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante.

Amplificación de Sondas Dependiente de Ligandos Múltiples (MLPA)

Se utilizó un total de 200 ng de ADN genómico de cada muestra para el análisis de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA) con el kit Salsa MLPA SMA P021 (MRC-Holanda, Ámsterdam, Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR de MLPA se separaron por electroforesis capilar utilizando el analizador genético ABI-3130XL (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA). Los resultados se importaron como archivos html al software GeneMarker (Softgenetics, LLC., State College, PA) para el análisis de datos de MLPA utilizando la normalización de la población con la proporción de MLPA como procedimiento de análisis y la altura de pico como procedimiento de cuantificación. Las alturas de los picos para cada uno de los 38 productos de ligandos de la sonda MLPA en la muestra de prueba se compararon con las alturas de los picos promedio de al menos tres controles normales, y se determinaron las proporciones de picos de altura de muestra de prueba/tipo salvaje para cada producto de ligandos de la sonda. Las proporciones pico-altura menores que 0,8 y/o mayores que 1,3 indicarían la pérdida o ganancia del número de copias para cada sonda, respectivamente.

Análisis de Microsatélites

El análisis de microsatélites se realizó con los marcadores descritos anteriormente, D5S681, D5S435, D5S610, que flanquean los genes *SMN1* y *SMN2* en 5q13 (Scheffer y col., Eur. J. Hum. Genet. 9:484-494 (2001)). Tres marcadores nuevos, MS1 (SEQ ID NO:2), MS2 (SEQ ID NO: 3) y MS3 (SEQ ID NO: 4), se basaron en la secuencia genómica humana disponible públicamente usando la base de datos de genoma UCSC. Los siguientes pares de cebadores se diseñaron para amplificar MS1: MS1F(5'-TAAATGTCAAATTTATGTATGGG-3'; SEQ ID NO:12) y MS1R (5'-CTGTGATTGAAAC AAAGACACCT-3'; SEQ ID NO: 13); MS2: MS2F(5'-TCCATGGATACGGAGAGCTG-3'; SEQ ID NO:16) y MS2R (5'- TGATGGCACCACAACCATGC-3'; SEQ ID NO: 17; y MS3: MS3F (5'-TCAGGACCCTCCTCATCATC-3'; SEQ ID NO:18) y MS3R (5'- CGGGATCTCTTCTCCACAGA-3'; SEQ ID NO:19). Todos los cebadores directos fueron marcados con 6-carboxifluoresceína o marcados con 6-FAM (Invitrogen). Cada par de cebadores se amplificó por separado en un volumen total de 25 μ l utilizando 200 ng de ADN genómico, tampón de PCR 1X (Invitrogen), $MgCl_2$ 1,5 mM, cebadores directos e inversos 0,3 μ M y 0,3 μ l de polimerasa Taq de platino (Invitrogen). Las amplificaciones se iniciaron con 10 minutos a 94°C, seguidas de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C, con una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR se diluyeron a 1:10 y se procesaron en un analizador de ADN ABI 3730 (Applied Biosystems) y se analizaron los resultados con el software GeneMapper v3.7 (Applied Biosystems).

PCR de largo alcance y Secuenciación

Se llevó a cabo la PCR de largo alcance que abarca el fragmento entre el exón 7 y el exón 8 (1025 pb) del gen *SMN1* en individuos AJ identificados con tres copias del gen *SMN1* por MLPA utilizando reactivos de PCR de largo alcance (Qiagen) con cebadores *SMN1-E7F* (5'-TCCTTTATTTTCCTTACAGGGTTTC-3'; SEQ ID NO:20) y *SMN1-E8R* (5'-CTGTGATTGAAAC CCATGTCCAC-3'; SEQ ID NO:21). Se diseñó el cebador *SMN1-E7F* para amplificar preferentemente *SMN1* mediante la inclusión de c.840C del Exón 7 en el extremo 3'. La amplificación por PCR se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante en 50 μ l de mezcla de reacción que contenía dNTP 500 mM,

tampón de PCR 1X, MgCl₂ 2,5 mM, 2 unidades (U) de enzima de largo alcance, 400 nM de cada cebador y 250 ng de ADN purificado. Después de 3 minutos de desnaturalización a 93°C, se llevaron a cabo 35 ciclos de amplificación de la siguiente manera: 15 segundos a 93°C, 30 segundos a 59°C y 1,5 minutos a 68°C.

5 Los amplicones de PCR se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen). El fragmento se secuenció utilizando el kit de secuenciación de ciclos BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems) y los productos se procesaron en el secuenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems). Se usaron también los mismos cebadores utilizados para la amplificación por PCR en las reacciones de secuenciación. Se diseñaron los cebadores adicionales SMN1-I7F2 (5'-AGGAAATGC TGGCATAGAGC-3'; SEQ ID NO:22) y SMNE8Ra (5'-CTGCTCTATGCCAGCATTTC-3'; SEQ ID NO:23) para confirmar los resultados de la secuencia en ambas
10 direcciones. Se analizaron las trazas de secuencia utilizando el software Mutation Surveyor v3.01 (SoftGenetics) y Sequencher™ versión 4.8 (Gene Codes, Ann Arbor, MI) y mediante examen visual.

Clonación de TA

Se sometieron a clonación de TA los fragmentos de PCR de largo alcance (1025 pb) de cinco alelos de duplicación mayor de AJ (2+1) (ver a continuación). En resumen, se purificaron los amplicones en gel (Qiagen) y se clonaron en el vector de PCR del kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se aislaron doce clones de cada uno de estos individuos portadores de duplicación para el análisis por PCR. Se subcultivaron los clones con el tamaño de inserto esperado (1025 pb) posteriormente y se purificaron los plásmidos utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) y se secuenciaron como se describe anteriormente utilizando cebadores M13 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA).

20 Análisis de Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)

Se realizaron reacciones de PCR para amplificar un fragmento de 372 pb que contiene la alteración de un nucleótido único g.27134T> G con los cebadores SMN1-E7F (arriba) y *SMN1-I7R1* (5' AAAAGTCTGCTGGTCTGCCTAC-3'; SEQ ID NO:24). La amplificación se llevó a cabo en una mezcla de reacción de 25 µl con 400 nM de cada cebador, dNTP 200 µM, MgCl₂ 1.5 mM y 1 U de ADN polimerasa Platinum®Taq (Invitrogen, Carlsbad, California). Las
25 condiciones de ciclos fueron las siguientes: 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 59°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto y una extensión final de 72°C durante 10 minutos. La alteración de un nucleótido único g.27134T> G dio lugar a una ganancia de un sitio de restricción para la enzima HypCH4III. Después de la amplificación, se digirieron 5 µl de producto de PCR con 4 U de HypCH4III (New England Biolabs, Ipswich, MA) a 37°C durante 4 horas y se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% o gel de agarosa al 1,5%, visualizado con transiluminador UV y fotografiado.

Análisis estadístico

Las frecuencias de genotipo para cada marcador de microsatélites se probaron para el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) utilizando el análisis χ^2 . Los haplotipos de los marcadores, D5S681-D5S435-MS1-D5S610, se estimaron para los controles AJ y AJ con delección de *SMN1* (1+0), duplicación (2+1) y silenciosos (2+0) utilizando
35 SAS/Genetics versión 9.2. Se proporcionan en la Tabla 8 las longitudes de los diversos alelos para cada marcador de microsatélites. Los haplotipos supuestos se infirieron a partir de su frecuencia entre todos los individuos examinados y se reconstruyeron en función de la combinación más probable de alelos. Se analizaron las diferencias en las frecuencias de haplotipos entre la cohorte de control AJ y la cohorte individuos AJ con delección o duplicación de *SMN1* mediante análisis χ^2 . Los valores de P para las comparaciones globales y por pares se calcularon para los
40 cuatro haplotipos marcadores con el umbral de 0,05 considerado estadísticamente significativo. Se estimó la mejora en la tasa de detección con la adición de nuevos marcadores utilizando el enfoque bayesiano.

Ejemplo 2

Análisis de población AJ para delecciones y duplicaciones de SMB1

Para determinar la frecuencia de individuos con delección (1+0) y duplicación (2+1) de AME en la población AJ, se examinaron 692 individuos de ascendencia 100% AJ (con cuatro abuelos AJ) mediante un ensayo MLPA específico de *SMN1* y *SMN2*, que detecta el número de copias de 38 regiones genómicas diferentes en una sola reacción. Específicamente, este ensayo determinó los números de copias individuales de *SMN1* y *SMN2* exón 7 y exón 8 para cada uno de *SMN1* y *SMN2*, así como el número combinado de copias *SMN1* y *SMN2* de sus respectivos exones 1,
45 4, 6 y 8. Se identificaron quince portadores de delección de *SMN1* (1+0) (1 de 46 o 2.1%), que es similar a la frecuencia reportada en otras poblaciones europeas. No obstante, Se identificaron 99 individuos con duplicación de *SMN1* (2+1) (1 de 7 o 14%), que es el doble de la frecuencia en los europeos. No se identificaron individuos con cuatro copias de *SMN1* (es decir, dos alelos de duplicación, 2+2), aunque la frecuencia esperada de individuos (2+2) fue de 0.5% (Tabla 2). Las frecuencias observadas no se desviaron significativamente del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) ($p > 0,05$ exacto) y se muestran en la Tabla 1 junto con las frecuencias esperadas.

55 Frecuencia de portadores silenciosos AJ (2+0)

Utilizando la frecuencia de delecciones (1+0) (2.2%) y duplicaciones (2+1) (14.3%), asumiendo el equilibrio de Hardy-

Weinberg para cada uno de los tres alelos ($SMN1 = 0, 1$ o 2 copias), se estimó que los portadores silenciosos ($2+0$) se producen a una frecuencia de $2pr$, (donde p es la frecuencia de 1 copia del alelo de tipo salvaje (WT) y r es la frecuencia de 0 copias o alelos de delección) que fue de 1 en 531 individuos AJ. Basándose en este cálculo, la frecuencia global de portadores para AME entre los individuos AJ fue aproximadamente 1 de 41.1 (2.4%), lo que incluye portadores identificados por MLPA con pérdida de una copia de $SMN1$ ($1+0$), portadores silenciosos ($2+0$) no detectados por procedimientos sensibles a la dosis, sensibles a la ubicación y la pequeña fracción de individuos que portan mutaciones intragénicas (0.00047). Estos valores asumen que r^2 es $0,00014$ (Pearn, J Med Genet 15: 409-413 (1978)) y que el 2% de los individuos afectados tienen una mutación intragénica, como se informó anteriormente (Wirth y col., 1999). La tasa de detección de portadores en la población AJ mediante ensayos de MLPA fue de aproximadamente el 90% basándose en este análisis con aproximadamente un 8% de portadores silenciosos ($2+0$) y aproximadamente un 2% de portadores de mutación intragénica. Por lo tanto, el riesgo residual de ser un portador después de un resultado de análisis negativo fue $1/402$ (Tabla 2).

Ejemplo 3

Grupos de mutación entre AJ con Delecciones ($1+0$) o Duplicaciones ($2+1$)

Se identificaron un total de 23 portadores AJ de delección ($1+0$) para estos estudios, incluidos 15 del análisis de la población descrito anteriormente y ocho que fueron identificados posteriormente por MLPA. Se encontraron cuatro grupos principales de mutación: $1del$) solamente delección de $SMN1$; $2del$) delecciones de $SMN1$ y $SMN2$; $3del$) delecciones de los exones 7 y 8 de $SMN1$ y delección de $SMN2$, o una delección de $SMN1$ y delección de los exones 7 y 8 de $SMN2$, y $4del$) delección de los exones 7 y 8 de $SMN1$ solamente (Tabla 5). De forma interesante, el 32% de los individuos AJ con dos copias de $SMN1$ portaban una delección de $SMN2$, lo que indica que la pérdida de $SMN2$ es un polimorfismo común en la población AJ y que puede haber una superposición significativa entre los grupos $1del$ y $2del$.

Para el grupo de duplicación de ganancia de copia, fueron analizados un total de 72 individuos AJ con duplicación ($2+1$) por MLPA, incluyendo tres con cuatro copias $SMN1$ ($2+2$), y se identificaron tres grupos principales: $1dup$) tres copias $SMN1$ sin copia $SMN2$; $2dup$) tres copias $SMN1$ con una copia $SMN2$, y $3dup$) tres copias $SMN1$ con dos copias $SMN2$ (Tabla 6). De los 72 individuos con duplicación ($2+1$) examinados, 26 (36.1%) no tenían copias de $SMN2$ y los 32 adicionales (44.4%) tenían una copia $SMN2$, lo que indica que la duplicación en estos 58 individuos surgió por un evento de conversión de genes que reemplaza secuencias $SMN2$ con secuencias $SMN1$. Como se señala en el presente documento, puede haber una superposición significativa entre los grupos $1dup$ y $2dup$ debido a la alta incidencia de delecciones de $SMN2$. De los individuos con duplicación de $SMN1$ ($2+1$), 11 ($15,3\%$) tenían dos copias de $SMN2$ y, sin desear quedar ligado a teoría alguna, se espera que esas duplicaciones surjan por un mecanismo diferente, como la recombinación homóloga no alélica (NAHR) o un evento de conversión de genes en individuos con duplicación de $SMN2$. Las duplicaciones de $SMN2$ no son infrecuentes, y se observaron por MLPA en la población AJ con una frecuencia de 1 de 38 (2.6%).

Ejemplo 4

Reconstrucción de haplotipos en AJ con Delecciones ($1+0$) o Duplicaciones ($2+1$)

Para determinar si los haplotipos fundadores estaban presentes para los alelos de eliminación de $SMN1$ ($1+0$), fueron genotipificados 20 portadores de los grupos $1del$, $2del$ y $3del$ (véase Ejemplo 3) que fueron identificados por MLPA con seis marcadores de microsatélites que abarcan 3.9 Mb en $5q13.2$ que rodea el locus $SMN1$. Incluyeron $D5S681$ (Genbank NT_006713.15; SEQ ID NO:5), $D5S435$ (Genbank NT_006713.15; SEQ ID NO:6) y $D5S610$ (NT_006713.15; SEQ ID NO: 7) que flanquean los genes $SMN1$ y $SMN2$ (Scheffer y col., 2001), y tres marcadores nuevos, $MS1$ (Genbank NT006713.15; SEQ ID NO:2), $MS2$ (Genbank NT006713.15; SEQ ID NO:3) y $MS3$ (Genbank NT006713.15; SEQ ID NO: 4) que se crearon a partir de la secuencia de referencia genómica humana disponible públicamente utilizando el navegador de base de datos del genoma UCSC. Se presenta una representación esquemática de esta región del genoma humano en la Fig. 2. Usando estos marcadores, se genotipificaron 78 individuos AJ control con dos copias de $SMN1$ ($1+1$). Según estos resultados, los cuatro loci consecutivos elegidos para los estudios de asociación de marcadores fueron $D5S681$ - $D5S435$ - $MS1$ - $D5S610$. Sus configuraciones de marcadores más probables se muestran en la Tabla 3. Los haplotipos para estos marcadores se construyeron para los 20 portadores de delección de $SMN1$ ($1+0$), incluidos todos los individuos de los grupos $1del$, $2del$ y $3del$ (Tabla 5). El grupo $4del$ fue excluido porque los tres individuos solamente tuvieron pérdida de las secuencias de los exones 7 y 8 .

Se enriquecieron significativamente dos supuestos haplotipos fundadores ($p \leq 0,001$) en los portadores de delección ($1+0$) en comparación con los controles. La combinación de alelos más común entre los 20 ($1+0$) portadores examinados, $2-5-4-5$, fue asignada en $22,5\%$ de los portadores y era posible en ocho portadores adicionales (40%). El haplotipo $2-5-4-5$ también se asignó a un solo cromosoma de 78 controles ($0,6\%$), lo que indica que este haplotipo no fue específico de los alelos de delección. El otro haplotipo de alelo específico de portador, $2-1-4-5$, no se asignó a ningún individuo control; sin embargo, dos individuos control podrían potencialmente portarlo. Uno de los portadores del grupo $4del$ con la delección de los exones 7 y 8 de $SMN1$ solo podría tener el haplotipo $2-5-4-5$, lo que indica que puede no ser específico a los alelos de pérdida de copia del gen completo de $SMN1$ o que puede ser el haplotipo de

alelo de tipo salvaje en el portador no. 23 (Tabla 5).

Para analizar los individuos con duplicación (2+1) para los haplotipos compartidos únicos, se genotipificaron seis marcadores de microsatélites en 69 de los 99 individuos AJ identificados con tres copias de *SMN1* y en tres individuos AJ adicionales que posteriormente se identificaron con cuatro copias de *SMN1* (Tabla 6). Se utilizaron los mismos cuatro genotipos de marcadores, D5S681-D5S435-MS1-D5S610, en la reconstrucción de haplotipos para 42 individuos con duplicación (2+1) de los grupos 1dup y 2dup. De estos, 26 individuos tenían tres copias de *SMN1* y ninguna copia de *SMN2* y 16 tenían tres copias de *SMN1* y una copia de *SMN2*; 31 de estos individuos con duplicación (2+1) seleccionados para el análisis tenían el alelo 6 de MS1 (Tabla 8). Se realizó un análisis separado para los nueve individuos del grupo 3dup que portaban tres copias *SMN1* y dos copias *SMN2*, ya que probablemente representaban un grupo de duplicación separado.

Los haplotipos de marcadores más probables para los tres grupos se muestran en la Tabla 3. Un haplotipo de marcador de duplicación principal, 2-5-6-10, se enriqueció significativamente en los Grupos 1dup y 2dup (19%). Este haplotipo estuvo completamente ausente en la población de control y fue altamente específico para los portadores de duplicación ($p < 0,0001$). De los 58 individuos del grupo 1dup y 2dup, 23 (39.7%) tenían el haplotipo completo de cuatro marcadores y ocho (13.8%) tenían el haplotipo parcial 2-5-6. Además, uno de los individuos del grupo 3dup (no. 59, Tabla 6) tenía el haplotipo 2-5-6-10 que indica que este individuo probablemente portaba una duplicación de *SMN2* en el alelo de tipo salvaje. El haplotipo de duplicación principal también fue positivo en dos de los individuos con cuatro copias de *SMN1*, una de las cuales fue homocigótica para el haplotipo 5-6-10 (n° 70, Tabla 6). Hubo dos haplotipos que se enriquecieron significativamente en los individuos del grupo 3dup, 2-5-4-5 y 2-5-9-4, en comparación con los controles ($p < 0,0001$). El haplotipo 2-5-4-5 fue también el haplotipo de delección principal, que también estaba presente en una pequeña fracción de los controles.

Ejemplo 5

Secuenciación del Alelo de Duplicación de AJ Principal

Varios supuestos haplotipos fundadores de AJ se infirieron de manera informática en los alelos de delección y duplicación de *SMN1*. Solo el haplotipo de duplicación principal, 2-5-6-10, o el haplotipo parcial, 2-5-6, estuvo presente en la mayoría (51.7%) de individuos AJ con duplicación (2+1) con 0 o 1 copia de *SMN2* genotipificado (Tabla 6) y estuvo ausente en la población AJ control. El alelo de duplicación principal se examinó adicionalmente mediante secuenciación. Se amplificó un fragmento de 1025 pb específico para *SMN1* entre los exones 7 y 8 de cinco individuos AJ diferentes con el alelo de duplicación principal utilizando el cebador SMN1-E7F, que incluye c.840C en el extremo 3' y el cebador SMN1-E8R (Fig. 3A).

Se identificaron dos variantes de secuencia en el gen *SMN1*, g.27134T> G en el intrón 7 y g.27706_27707delAT en el exón 8 (véase el número de registro en Genbank NG_008691.1; Fig. 3B). Ninguno de estos polimorfismos ha sido presentado previamente en la base de datos NCBI ENTREZ (SNP). Un análisis de secuencia adicional indicó que ambos polimorfismos estaban presentes en todos los individuos que portaban el haplotipo de duplicación principal (2-5-6-10) o haplotipo parcial (2-5-6) y estaban ausentes de todos los demás individuos con duplicación. Por lo tanto, cada una de estas secuencias polimórficas solas es diagnóstica de duplicación, al igual que la combinación de ambas secuencias de polimorfismo. Usando una combinación de PCR de largo alcance y análisis de clonación de TA, la presencia de los dos polimorfismos dentro del mismo clon en los 12 individuos con duplicación (2+1) probados indicó que estos polimorfismos residían en el mismo alelo *SMN1*. No se identificaron otras variantes de secuencia específicas para el alelo de duplicación principal dentro de los 1025 pb que se analizaron.

La secuenciación de 1025 pb entre el intrón 7 y el exón 8 de *SMN1* en individuos que portaban el haplotipo de duplicación principal identificó dos polimorfismos estrechamente vinculados, es decir, g.27134T> G en el intrón 7 y g.27706_27707delAT en el exón 8. Ninguno de estos polimorfismos ha sido descrito en la literatura o en la base de datos NCBI ENTREZ (SNP) como encontrado en o asociado con los genes *SMN1* o *SMN2*. La transversión de g.27134T> G introdujo un sitio de restricción hpyCH4III que estaba presente en la mayoría de los individuos con duplicación (2+1), pero no en ninguno de los 315 controles AJ sanos probados (1+1). Por lo tanto, un individuo AJ con dos copias de *SMN1* determinado por MLPA (u otro procedimiento sensible a la dosis) que sea positivo para el sitio de escisión hpyCH4III generado de g.27134T> G y su polimorfismo vinculado en g.27706_27707delAT, es altamente probable que sea un portador *SMN1* silencioso (2+0). Por lo tanto, la detección de g.27134T> G y/o g.27706_27707delAT aumentaría la detección de portador de AME en la población AJ del 90% al 94% y reduciría el riesgo residual después de un resultado negativo de análisis de portadores de 1 de aproximadamente 400 a 1 de aproximadamente 700 (Tabla 2). Debido a que el 83,5% (tabla 1) de los individuos AJ tendrá un resultado negativo de análisis de portadores (con dos copias de *SMN1*), este ensayo se puede realizar de forma rutinaria para detectar los portadores silenciosos (2+0) entre ellos, lo que aumenta la detectabilidad del portador de AME. Un experto reconocerá, además, que se pueden realizar análisis de RFLP convenientes para detectar portadores de AME con cualquier endonucleasa de restricción que tenga un sitio que dependa de la presencia o ausencia de un alelo marcador que abarque ese sitio. Por lo tanto, HpyCH4III distinguirá los alelos de tipo salvaje de los alelos que albergan la transversión g.27134T> G, al igual que cualquier otra endonucleasa de restricción que requiera la "T" o la "G" en la posición 27134. En la presente divulgación se contemplan todas estas realizaciones del análisis basadas en RFLP o los ensayos basados en diagnóstico.

De forma interesante, los dos polimorfismos vinculados también estaban presentes en diferentes frecuencias entre AA, AS y HI, pero no en la población Europea. En las poblaciones AA, AS y HI, los polimorfismos de g.27134T> G y g.27706_27707 fueron más frecuentes en individuos con duplicación (2+1) que en aquellos con 1 o 2 copias de *SMN1*. Por ejemplo, en la población AS, los polimorfismos vinculados fueron exclusivos de individuos con duplicaciones de *SMN1*, aunque solo estuvieron presentes en aproximadamente el 11,5% (3 de 26) de los alelos de duplicación examinados. La prueba de estos polimorfismos aumentaría la detección de portadores de AME en aproximadamente un 0,7% en la población AS y aumentaría la detectabilidad del portador a aproximadamente el 93,3% (Tabla 2). En las poblaciones AS y HI, los polimorfismos vinculados no eran específicos de los alelos de duplicación y estaban presentes en una minoría de alelos de copia única *SMN1*. La población AA tiene la tasa más baja de detección de portadores de AME (71%) debido a la alta prevalencia de alelos de duplicación. Tanto g.27134T> G como g.27706_27707delAT estuvieron presentes en la mayoría de los alelos de duplicación AA (83.7%), lo que indica que probablemente surgieron de un alelo antiguo que participó en el evento original de conversión/recombinación de genes que llevó a la duplicación de *SMN1*, que está presente en las poblaciones AJ, AA, AS y HI. Ninguno de los individuos con duplicación (2+1) examinados en las poblaciones AA, HI o AS que tenían los polimorfismos g.27134T> G y g.27706_27707delAT tenían el alelo 6 del marcador de MS1, que estaba presente en todos los individuos AJ con el haplotipo de duplicación principal. Se espera que el examen del haplotipo SNP de *SMN1* extendido en individuos con g.27134T> G y g.27706_27707delAT permita la estimación de la fecha de origen del alelo de duplicación y confirme si es de origen similar en otras poblaciones. La expansión de estos estudios a grupos étnicos o demográficos adicionales será útil para encontrar haplotipos específicos que delimitan las delecciones o duplicaciones de *SMN1* y facilitan la identificación de portadores silenciosos (2+0) que actualmente escapan a la detección.

Ejemplo 6

Análisis de RFLP para el polimorfismo g.27134T> G (Intrón7)

La digestión de los amplicones de PCR que contienen el polimorfismo g.27134T> G con hpyCH4III reveló una ganancia de sitio de restricción (Fig. 3C) atribuible al polimorfismo. El análisis de RFLP de 315 individuos AJ control con dos copias de *SMN1* reveló que ninguno tenía el sitio de restricción hpyCH4III, lo que indica que el polimorfismo era específico del alelo principal de duplicación de AJ. De forma interesante, el individuo nº 69 (Tabla 6), que era homocigoto para la combinación de alelos 2-5-6-10 (Tabla 6) con cuatro copias de *SMN1* y sin copias de *SMN2*, era heterocigoto para el sitio de restricción, produciendo fragmentos tanto no digeridos (391 pb) como digeridos (153 pb y 218 pb) después de la exposición a hpyCH4III, consistente con el polimorfismo que está presente en una sola copia de la duplicación de *SMN1*. Este hallazgo también confirmó la heterocigosidad observada para los polimorfismos g.27134T> G y g.27706_27707delAT entre todos los individuos AJ con duplicación (2+1) que se secuenciaron. Un total de 49 de los 99 individuos con duplicación (2+1) identificados durante el análisis de la población portaban el polimorfismo 27134T> G tal y como se determinó por el análisis de RFLP. Por lo tanto, la prueba de este polimorfismo en la población AJ aumentaría la detección de portadores de AME en aproximadamente un 4%, identificando aproximadamente la mitad de los portadores silenciosos (2+0), para una tasa de detección total del 94%. Además, el riesgo residual de ser un portador de AME después de un resultado del análisis negativo disminuiría de 1 de aproximadamente 400 a 1 de aproximadamente 700.

Para determinar si el polimorfismo g.27134T> G también estaba presente en los alelos de duplicación de *SMN1* en otros grupos étnicos, se realizaron análisis de MLPA y RFLP en ADN genómicos de 276 individuos afroamericanos (AA), 250 asiáticos (AS), 262 hispanos (HI) y 137 europeos (UE). Los resultados, resumidos en la Tabla 4, indican que g.27134T> G estaba presente en alelos de duplicación en todas las poblaciones examinadas, excepto para los individuos de la UE. En la población AA, el RFLP se observó en individuos con 1, 2, 3 o 4 copias de *SMN1*, lo que indica que no es específico de sus alelos de duplicación. Sin embargo, la mayoría (81%) de los individuos AA con duplicación (2+1), eran heterocigotos para g.27134T> G, mientras que solo el 21% de los individuos con dos copias (1+1) de *SMN1* eran positivos para el polimorfismo. Cabe destacar que, uno de los cinco AA portadores de delección fue positivo para el RFLP, probablemente en el alelo de tipo salvaje. De forma similar, el RFLP estaba presente en aproximadamente la mitad de los individuos HI con duplicación (2+1), pero también estaba presente en aproximadamente el 5,5% de los alelos de tipo salvaje. Por el contrario, en la población AS, el RFLP no se encontró en alelos de tipo salvaje, pero estaba presente solamente en aproximadamente el 14% de los individuos con duplicación (2+1). La secuenciación se realizó en 142 individuos AA, 2 AS y 5 HI que resultaron positivos para el RFLP para confirmar que las variantes tanto g.27134T> G como g.27706_27707delAT estaban presentes en los alelos positivos para el RFLP. En todos los casos examinados, los dos polimorfismos se produjeron juntos dentro del mismo alelo *SMN1*, independientemente de cuántas copias de *SMN1* estuvieran presentes.

Ejemplo 7

Identificación Mejorada de Portadores de AME en Varios Grupos Raciales y Étnicos

Los resultados prometedores desvelados en los ejemplos anteriores establecieron que el procedimiento de detección de cargas de *SMN1* cromosómicamente desequilibradas, como el que se encuentra en los portadores de AME silenciosos (2+0), puede mejorar notablemente la identificación de portadores de AME en grupos étnicos y raciales, y en particular, en la población judía askenazi (AJ). Los datos mostraron además que la identificación de portador de AME mejoró en los asiáticos, y dio algunos indicios de que el procedimiento tenía un intervalo aún más amplio de

mejorar la detección de cargas de *SMN1* cromosómicamente desequilibradas en varios grupos étnicos y raciales. Los datos proporcionados en la Tabla 9 revelan los riesgos residuales de ser portadores después del análisis positivo y negativo para g.27134T> G en el intrón 7 y g.27706_27707delAT en el exón 8. Lo que se desprende de la Tabla 9 es que el procedimiento de identificación desvelado en el presente documento mejora la detección de cargas *SMN1* cromosómicamente desequilibradas, llevando a una mayor detección de portadores de AME, tales como portadores silenciosos de AME (2+0), en una variedad de grupos étnicos y raciales, incluyendo AJ, Asiáticos, Afroamericanos e Hispánicos.

Las implicaciones de estos resultados para el asesoramiento genético y la planificación familiar son importantes. Con el procedimiento desvelado en el presente documento, se puede hacer una evaluación más precisa del riesgo modificado de tener un hijo con AME si uno de la pareja es un portador conocido y el otro tiene dos copias de *SMN1*, como se desvela en la Tabla 10. Los datos muestran que añadir el procedimiento sensible a la dosis y sensible a la ubicación para identificar portadores de AME lleva a una reducción significativa en los resultados falsos negativos potencialmente devastadores, en los cuales los padres potenciales creen erróneamente que pueden reproducirse sin un riesgo significativo de descendientes con AME. Los datos en la Tabla 10 establecen que el beneficio de reducir la frecuencia de resultados falsos negativos atribuibles al procedimiento desvelado en el presente documento abarca grupos étnicos y raciales y, por lo tanto, tiene un valor generalizado para las poblaciones humanas.

Más allá de los polimorfismos desvelados en los ejemplos anteriores, se espera que los polimorfismos adicionales sean útiles para evaluar el riesgo residual de AME debido al estado de portador de uno o ambos padres. Tal como se catalogó en la Tabla 11, estos nuevos polimorfismos pueden ocurrir en todo el gen *SMN1*, incluidos los intrones 1, 2a, 6, 7 y 8. Con estos polimorfismos y los polimorfismos desvelados anteriormente, se minimiza el riesgo de error en la identificación del estado de portador de AME, lo que permite que los padres potenciales, guiados por asesores genéticos, estén mejor informados para tomar decisiones de planificación familiar.

Tabla 1. Análisis de portadores de *SMN1* de 692 individuos judíos Askenazis

Número de copias de <i>SMN1</i>	Genotipo	n	%	Esperado* (n)	Esperado* (%)
0	0+0	0	0	0,1	0,01
1	1+0	15	2	14	2
2	1+1	578	84	583	84
	2+0	-	-	1	0,2
3	1+2	99	14	91	13
4	2+2	0	0,0	4	0,5

* Las frecuencias esperadas se calcularon utilizando el tipo salvaje observado (p^2 con 2 copias de *SMN1*) y la frecuencia de portadores observada ($2pq$ con 1 copia de *SMN1*) y la ecuación $p^2+2pq+q^2+2qr+2pr+r^2=1$

Tabla 2 Detección de portadores de AME y Riesgo Residual con la adición de *SMN1* g.27134T> G y g.27706_27707delAT

Etnia	Frecuencia de portadores	Tasa de detección	Riesgo residual después del análisis del portador negativo	Tasa de detección con adición de <i>SMN1</i> g.27134T> G y g.27706_27707delAT	Riesgo residual después de un resultado negativo para <i>SMN1</i> g.27134T> G y g.27706_27707delAT
Judía Askenazi	1 de 41,1	90%	1 de 402	94%	1 de 683
Asiática	1 de 53*	92.6%*	1 de 628*	93,3%	1 de 765

* Tomado de Hendrickson BC, Donohoe C, Akmaev VR, Sugarman EA, Labrousse P, Boguslavskiy L, Flynn K, Rohlfis EM, Walker A, Allitto B, Sears C, Scholl T Differences in *SMN1* allele frequencies among ethnic groups within North America. J. Med. Genet. 2009;46:641-44.

Tabla 3 Análisis de haplotipos para Locus AME.

Marcador	D5S681	D5S435	MS1	D5S610	Frecuencia de haplotipos en WT, % (N=78)	Frecuencia de Haplotipos en Portadores, %	Valor p
Portadores de delección de <i>SMN1</i>	2	1	4	4	0	7,5	1,0
(N=20)	2	5	4	5	0,6	22,5	0,001
Duplicación de <i>SMN1</i>	2	3	7	5	0	4,7	0,01
	2	5	3	4	2,6	3,6	0,12

Valor P general <,0001

(continuación)

Marcador	D5S681	D5S435	MS1	D5S610	Frecuencia de haplotipos en WT, % (N=78)	Frecuencia de Haplotipos en Portadores, %	Valor p
Grupos 1dup y 2dup (N = 42)	2	5	6	6	0	19,0	<, 0001
	2	5	9	9	1,8	4,8	0,19
	4	3	4	4	0	3,4	0,03
	4	5	4	4	0,8	3,6	0,003
Valor P general <,0001							
Duplicación de SMN1	2	4	9	5	0	5,6	0,035
	2	5	4	5	0,6	11,1	<, 0001
Grupo 3dup (N=9)	2	5	7	2	0	5,6	1,0
	2	5	9	4	0	16,7	<, 0001
	4	1	4	10	0	5,6	1,0
	4	5	4	9	1,8	11,1	0,02
	6	4	4	5	0	5,6	0,025
	7	3	2	5	0	5,6	0,003
Valor P general <,0001							

Los haplotipos mostrados en negrita representan un significado en comparación con las frecuencias de tipo salvaje (WT) (2 copias). Solamente se muestran los haplotipos con una frecuencia superior al 3% en portadores.

Tabla 4 Datos del Análisis Poblacional RFLP de SMN1 para g.27134T> G

Etnia	Número de copias de SMN1	RFLP Negativo	RFLP Heterocigoto	RFLP Homocigoto	Total
Judía Askenazi	2	315	0	0	315
	1	4	0	1	5
Afroamericana	2	108	26	2	136
	3	21	86	4	111
	4	1	23	0	24
Asiática	1	2	0	0	2
	2	222	0	0	222
	3	20	2	0	22
Hispana	4	1	1	0	2
	1	1	0	0	1
	2	206	12	1	219
Europea	3	20	20	0	40
	4	0	2	0	2
	1	12	0	0	12
Europea	2	413	2	0	415
	3	23	4	0	27
	4	2	2	0	4

5

Tabla 5 Análisis de Microsatélites de los Portadores de Delección AJ

MARCADOR	D5S6 81	D5S4 35	MS 1	SMN	D5S6 10	MS 2	MS 3
LOC FÍSICA (Mb)	67,64	68,13	68,7 6	68,9-70,36	71,02	71,2 9	71,5 1
Número de copias de MLPA							
Grupo 1del	Muestra N°						
SMN1/SMN2 (1/1)	1	2,4	2,5	4,5	2,5	1,4	1,2
	2	2,2	1,6	3,4	2,5	2,4	2,2
	3	2,2	1,5	4,10	2,4	4,10	1,2
	4	2,4	1,3	4,4	2,5	4,6	2,4
	5	2,4	4,5	1,4	5,5	5,5	3,4
Grupo 2del							
SMN1/SMN2 (1/2)	6	2,4	1,1	4,8	5,11	4,5	2,2

(continuación)

MARCADOR LOC FÍSICA (Mb)		D5S6 81 67,64	D5S4 35 68,13	MS 1 68,7 6	SMN 68,9-70,36	D5S6 10 71,02	MS 2 71,2 9	MS 3 71,5 1
	7	2,5	1,5	3,8		2,3	5,5	1,2
	8	1,2	1,5	3,7		4,5	4,5	1,3
	9	2,2	1,5	4,5		1,5	4,5	2,2
	10	2,2	5,5	4,7		5,5	1,4	2,3
	11	2,4	1,3	4,11		5,5	2,4	1,2
	12	2,4	1,4	4,4		4,9	2,10	3,6
	13	2,4	1,3	4,5		4,9	4,6	2,2
	14	2,9	1,5	4,8		5,7	1,4	2,4
	15	1,4	3,5	5,15		4,4	4,5	1,2
	16	2,6	4,5	1,4		5,12	5,5	1,3
	17	2,2	1,5	4,13		4,5	5,5	1,3
Grupo 3del								
SMN1/SMN2 (1/del ex7,ex8) o (del ex7,ex8/1)								
	18	3,6	3,5	3,4		2,10	2,5	1,3
	19	2,6	1,5	4,4		4,5	4,6	2,2
	20	2,2	5,5	4,7		5,9	4,4	1,3
Grupo 4del								
SMN1/SMN2(del ex7,ex8/2)								
	21	2,4	3,5	4,9		2,9	4,5	2,2
	22	3,5	4,5	2,4		4,5	3,6	1,2
	23	2,4	1,5	4,4		5,6	4,5	2,3

Tabla 6 Análisis de Microsatélites de los Portadores de Duplicación AJ

MARCADOR LOC FÍSICA (Mb)		D5S68 1 67,64	D5S43 5 68,13	MS1 68,7 6	SMN 68,9-70,36	D5S61 0 71,02	MS2 71,2 9	MS3 71,5 1
Número de copias de MLPA								
Grupo 1dup SMN1/SMN2 (3/0)	Muestra N°							
	1	2,4	4,5	6,8		6,10	2,4	1,1
	2	2,3	3,5	4,6		2,10	2,5	1,1
	3	2,3	5,5	6,9		2,10	2,4	1,4
	4	2,4	5,5	6,9		4,10	2,2	2,2
	5	2,2	3,5	4,6		5,10	4,5	1,2
	6	2,4	5,6	4,6		5,10	4,4	1,2
	7	2,4	4,5	6,9		9,10	4,4	1,1
	8	2,4	4,5	6,9		5,10	2,4	2,3
	9	2,2	3,5	2,6		5,10	2	1,2

ES 2 698 114 T3

(continuación)

MARCADOR LOC FÍSICA (Mb)		D5S68 1 67,64	D5S43 5 68,13	MS1 68,7 6	SMN 68,9-70,36	D5S61 0 71,02	MS2 71,2 9	MS3 71,5 1
	10	2,2	5,5	4,6		9,10	4,4	1,6
	11	2,2	4,5	5,6		4,10	2,5	1,2
	12	10,11	2,5	5,6		4,10	2,4	1,2
	13	2,6	5,5	3,6		4,9	4,10	1,3
	14	2,6	3,5	4,6		2,5	2,4	1,2
	15	2,3	1,5	4,6		4,11	3,5	2,2
	16	2,10	2,5	6,17		2,2	2,4	1,2
	17	2,2	2,5	6,12		2,2	2,4	1,2
	18	2,4	1,5	3,5		4,4	2,4	1,2
	19	2,4	5,5	3,5		2,6	4,5	1,1
	20	2,2	1,4	4,4		6,9	4,5	1,1
	21	4,6	5,5	4,5		6,9	5,5	1,2
	22	2,6	1,4	4,9		2,10	5,6	1,2
	23	2,4	3,3	4,7		2,5	2,6	4,6
	24	2,4	3,3	7,7		5,5	2,2	2,6
	25	2,6	3,5	4,7		5,5	2,6	2,6
	26	2,4	4,5	4,4		6,7	3,4	1,2
Grupo 2dup								
SMN1/SMN2 (3/1)								
	27	2,7	3,5	5,6		8,10	10,5	2,3
	28	2,2	1,5	8,6		10,11	4,5	2,4
	29	2,4	5,5	4,6		2,10	4,5	1,2
	30	4,4	3,5	4,6		2,10	2,4	2,5
	31	2,4	5,5	5,6		2,10	2	1,2
	32	2,3	1,5	8,6		9,10	4	2,4
	33	2,8	4,5	4,6		5,10	2,6	1,2
	34	2,2	4,5	4,6		4,10	2,10	2,2
	35	2,2	3,5	4,6		2,10	2,4	2,2
	36	2,4	5,5	6,8		6,10	2,5	1,5
	37	2,4	1,5	4,6		2,5	4,4	1,3
	38	2,4	3,5	4,6		2,9	4,4	2,4
	39	2,2	5,5	13,6		5,9	2,5	1,3
	40	2,2	4,5	4,6		5,9	6,10	3,4
	41	2,4	5,5	5,9		2,6	5,7	1,2
	42	2,4	2,5	5,9		2,6	5,7	1,2
	43	2,6	5,5	3,4		4,9	4,4	3,4

ES 2 698 114 T3

(continuación)

MARCADOR LOC FÍSICA (Mb)		D5S68 1 67,64	D5S43 5 68,13	MS1 68,7 6	SMN 68,9-70,36	D5S61 0 71,02	MS2 71,2 9	MS3 71,5 1
	44	2,7	5,5	3,4		4,11	4,4	2,4
	45	2,5	1,5	3,5		4,4	4,6	1,2
	46	2,4	3,5	3,5		2,4	2,4	2,4
	47	2,2	5,5	4,5		9,11	8,5	1,2
	48	2,2	4,4	4,4		4,5	2,8	1,5
	49	4,6	5,7	1,4		2,5	2,4	1,3
	50	2,6	5,5	7,9		2,5	2,6	6,1
	51	2,2	1,5	7,9		2,5	2,2	6,4
	52	2,4	3,8	5,7		5,9	2,5	6,6
	53	2,2	1,3	3,7		2,5	2,5	1,2
	54	2,2	3,5	4,7		5,5	2,4	6,3
	55	3,4	5,8	5,7		5,9	2,5	6,6
	56	2,4	3,10	7,9		1,2	2,5	1,2
	57	2,4	3,4	2,10		5,5	2,4	1,3
	58	2,5	3,5	5,9		2,8	4,10	1,2
Grupo 3dup								
SMN1/SMN2 (3/2)								
	59	2,4	3,5	3,6		4,10	2,5	2,4
	60	2,7	3,5	2,9		4,5	2,4	2,9
	61	2,2	4,5	9		4,5	4	3,9
	62	2,4	5,5	4,9		4,9	4,5	1,3
	63	2,2	5,5	4,7		2,5	2,4	1,3
	64	4,6	3,3	2,8		5,9	2,5	1,2
	65	2,6	1,1	3,3		5,11	2,4	1,2
	66	2,4	1,5	4,4		5,10	2,5	3,5
	67	4,6	4,5	4,4		5,9	9,10	1,3
	68	2,6	3,5	2,10		2,5	NA	NA
	69	2,10	3,4	3,5		5,5	4,9	1,3
SMN1/SMN2 (4/0)								
	70	2,5	5,5	6,6		10,10	2,4	2,4
	71	3,7	7,7	4,9		9,12	3,5	2,2
	72	2,5	2,5	6,9		2,10	4,4	1,1
		Na=No Analizado						
NA=No Analizado								

Tabla 7 Análisis de Microsatélites de los Controles AJ - 2 copias de SMN1

MARCADOR		D5S681	D5S435	MS1	SMN	D5S610	MS2	MS3
LOC FÍSICA (Mb)		67,64	68,13	68,76	68,9-70,36	71,02	71,29	71,51
	Muestra N°							
	1	2,4	4,5	4,5		2,5	2,4	2,3
	2	1,2	5,5	3,4		4,5	4,4	2,2
	3	2,4	5,5	4,4		5,5	4,4	3,3
	4	4,5	5,7	4,6		5,7	4,5	1,2
	5	2,4	5,5	3,4		5,11	5,10	1,6
	6	4,4	5,9	4,11		2,5	2,2	2,2
	7	2,4	1,5	3,4		4,5	2,7	1,3
	8	1,2	4,4	3,4		5,9	4,6	1,2
	9	3,3	1,3	4,7		4,5	2,4	1,1
	10	1,1	7,8	4,5		5,11	2,4	1,3
	11	2,5	1,4	3,5		2,10	4,5	2,5
	12	2,4	4,5	4,9		2,4	2,4	3,3
	13	2,4	5,5	3,3		2,5	2,5	1,2
	14	4,4	5,5	4,7		2,11	5,5	1,2
	15	2,5	1,3	3,4		1,3	5,5	2,2
	16	2,2	1,5	1,5		4,5	5,6	3,3
	17	2,4	1,1	3,6		2,6	1,10	2,4
	18	2,6	3,4	4,5		7,8	5,10	3,4
	19	2,6	4,5	4,5		9,10	2,4	1,1
	20	1,2	1,1	3,8		3,11	8,8	1,2
	21	2,3	1,4	4,6		5,9	4,9	1,2
	22	3,7	4,4	4,7		2,7	3,6	1,2
	23	4,5	4,5	4,4		4,7	5,10	3,3
	24	2,7	4,4	4,5		9,9	5,5	1,1
	25	2,4	1,5	4,6		2,11	4,5	1,2
	26	4,6	1,4	4,9		2,2	3,5	1,2
	27	2,4	4,5	7,10		2,5	4,5	2,3
	28	2,4	4,5	9,9		5,9	2,5	1,2
	29	4,4	3,10	3,5		2,4	2,4	1,4
	30	2,2	1,5	3,10		11,11	4,5	1,2
	31	2,4	1,3	5,11		2,11	2,4	2,5
	32	2,3	5,5	7,10		2,5	2,4	2,2
	33	2,6	3,5	4,5		2,4	4,5	2,2
	34	5,6	5,5	4,7		5,5	2,6	2,4
	35	6,10	3,4	4,9		2,5	4,9	1,4

ES 2 698 114 T3

(continuación)

MARCADOR		D5S681	D5S435	MS1	SMN	D5S610	MS2	MS3
LOC FÍSICA (Mb)		67,64	68,13	68,76	68,9-70,36	71,02	71,29	71,51
	Muestra N°							
	36	2,9	1,3	4,8		2,7	4,4	2,4
	37	2,4	3,5	4,6		2,5	4,10	2,2
	38	2,4	4,5	3,5		4,9	2,4	1,4
	39	2,4	3,5	5,7		2,2	4,9	1,1
	40	3,5	5,5	4,7		2,5	2,2	2,4
	41	1,4	5,5	4,7		2,6	1,10	1,1
	42	2,2	3,5	2,3		2,5	2,10	1,2
	43	4,5	3,5	2,9		5,5	2,2	2,2
	44	4,4	5,5	4,4		5,9	3,5	2,3
	45	2,4	3,5	5,5		2,2	2,9	2,4
	46	4,4	4,5	4,9		2,11	4,5	1,2
	47	2,2	5,5	3,4		4,10	4,5	2,3
	48	2,4	1,5	4,6		2,9	1,4	1,1
	49	4,4	3,4	4,4		4,9	2,10	3,3
	50	2,2	1,3	4,5		5,9	5,6	1,3
	51	2,2	5,5	3,4		5,6	2,6	1,2
	52	2,4	1,5	3,7		2,4	4,5	2,2
	53	2,4	4,5	5,9		2,5	5,5	1,2
	54	2,7	5,5	3,4		10,10	3,4	1,2
	55	1,4	2,8	4,5		2,4	3,4	1,3
	56	2,2	3,5	3,5		2,3	2,2	3,4
	57	2,3	5,5	9,9		2,12	2,4	1,5
	58	2,4	4,5	5,9		2,9	4,6	1,1
	59	2,2	5,5	3,3		8,8	2,2	3,3
	60	2,4	5,5	4,5		2,4	2,4	1,2
	61	2,2	5,5	3,8		4,9	5,5	1,3
	62	4,5	3,5	4,14		2,5	3,4	1,3
	63	2,2	5,5	3,8		5,7	5,5	1,1
	64	4,4	3,4	4,5		2,6	2,4	3,4
	65	2,4	3,5	4,4		2,9	1,2	1,3
	66	3,4	3,4	3,4		2,6	2,5	3,4
	67	3,4	5,5	7,8		5,6	2,5	2,3
	68	3,6	1,5	4,4		2,9	3,6	1,1
	69	2,4	1,5	3,5		4,9	4,6	1,2
	70	2,2	3,5	3,5		2,2	2,9	3,4

ES 2 698 114 T3

MARCADOR		D5S681	D5S435	MS1	SMN	D5S610	MS2	MS3
LOC FÍSICA (Mb)		67,64	68,13	68,76	68,9-70,36	71,02	71,29	71,51
	Muestra N°							
	71	2,4	5,5	3,7		4,5	4,10	3,4
	72	3,8	1,1	4,8		9,10	2,4	2,2
	73	2,2	3,5	5,7		5,11	5,10	1,2
	74	2,4	5,5	3,3		4,5	5,5	2,3
	75	2,6	3,8	5,5		2,11	2,2	3,3
	76	4,5	5,5	4,9		2,11	3,5	2,6
	77	2,6	1,5	3,4		2,5	2,4	1,3
	78	2,4	4,5	4,4		4,7	5,5	2,2

Tabla 8 Longitudes de marcadores alélicos

LOC FÍSICA (Mb) Alelos para Marcador	67,64 D5S681	68,13 D5S435	68,76 MS1	71,02 D5S610
1	143	122	98	124
2	145	124	114	128
3	149	130	116	132
4	151	132	118	139
5	155	134	120	141
6	157	138	122	134
7	141	126	124	136
8	147	128	126	143
9	153	140	128	126
10	137	136	130	117
11	128	116	132	130
12			136	147
13			112	
14			134	
15			102	
16			106	
17			108	

Tabla 9 Detección de portadores de AME y Riesgo Residual con la adición de SMN1 g.27134T> G y g.27706_27707delAT

Etnia	Frecuencia de portadores	Tasa de detección	Riesgo residual después del análisis del portador negativo con 2 copias de SMN1	Tasa de detección con adición de SMN1 g. 27134T> G y g.27706_27707delAT con dos copias de SMN1	Riesgo residual después de resultado negativo para SMN1 g.27134T> G y g.27706_27707delAT con dos copias de SMN1	Riesgo residual después de resultado positivo para SMN1 g.27134T> G y g.27706_27707 con 2 copias de SMN1/g.27134T
Judía Askenazi	1 de 41,1	90%	1 de 345	94%	1 de 580	portador
Asiática	1 de 53 ¹	92.6% ¹	1 de 628 ¹	93,3%	1 de 701,8	portador
Afroamericana	1 de 66 ¹	71.1% ¹	1 de 121 ¹	N/A	1 de 395,7	1 de 33,5
Hispana	1 de 117 ¹	90.6% ¹	1 de 1061 ¹	N/A	1 de 1762	1 de 139,6
Caucasiana	1 de 35 ¹	94.9% ¹	1 de 632 ¹	N/A	1 de 769,3	1 de 28,6
N/A - no aplicable o no puede ser calculado, Hendrickson y col., 2009						

Tabla 10 Riesgo de tener un hijo con AME si un miembro de una pareja es un portador conocido y el otro tiene dos copias de SMN1

Etnia de la pareja con 2 copias de SMN1	Resultado negativo por procedimientos sensibles a la dosificación	Resultado negativo para SMN1 g. 27134T>G y g. 27706_27707delAT	Resultado positivo para SMN1 g. 27134T>G y g. 27706_27707delAT
Judía Askenazi	1 de 1380	1 de 2320	1 de 4
Asiática	1 de 2512	1 de 2807	1 de 4
Afroamericana	1 de 484	1 de 1583	1 de 134
Hispana	1 de 4244	1 de 7048	1 de 558,4
Caucasiana	1 de 2528	1 de 3185	1 de 114

Tabla 11 Lista de nuevas variantes de secuencia identificadas en los alelos de duplicación en AJ y AA RFLP+

Etnia		AJ	AJ	AJ	AJ	AA	AA	AA	AA	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.
Chr. Posición	Gen SMN1. Posición	Exón/Intrón	Ref. Nuc.	dup/RFLP_hot	dup/RFLP_wt	non dup/RFLP_wt	dup/RFLP_homo	dup/RFLP_het	dup/RFLP_wt	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
70232445	11678	Intrón 1	G	G I	G	G	I	G I	G	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.
70236541	15774	Intrón 2a	G	G A	G	G	A	G A	G	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.
70243571	22804	Intrón 6	G	G A	G	G	A	G A	G	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.
70246957	26190	Intrón 6	A	A G	A	A	G	A G	A	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.
70247901	27134*	Intrón 7	T	T G	T	T	G	T G	T	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.
70248473-4	27706-27707	Exón 8	AT	AT delAT	AT	AT	[delAT]	AT delAT	AT	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.	SEQ.

* g.27134T>G, HypCH4III RFLP, AJ: Judía Askenazi, AA: Afroamericana; las dos últimas filas representan el g.27134T>G y g.27706_27707delAT; se resaltan los restos variantes

De lo que antecede se apreciará que, aunque se han descrito realizaciones específicas de la invención en el presente documento con fines ilustrativos, pueden realizarse diversas modificaciones sin desviarse del ámbito de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> Edelman, y col.	
	<120> MATERIALES Y PROCEDIMIENTO PARA IDENTIFICAR PORTADORES DE ATROFIA MUSCULAR ESPINAL	
	<130> 29636/46193A	
10	<150> 61/494.282	
	<151> 07/06/2011	
	<160> 24	
	<170> PatentIn versión 3.5	
15	<210> 1	
	<211> 28072	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 1	
	ccacaaatgt gggagggcga taaccactcg tagaaagcgt gagaagttac tacaagcggg	60
	cctcccggcc accgtactgt tccgctccca gaagccccgg gcggcggaag tcgtcactct	120
	taagaagggg cgggggccca cgctgcgcac ccgcgggttt gctatggcga tgagcagcgg	180
	cggcagtggg ggcggcgctc cggagcagga ggattccgtg ctgttccggc gcggcacagg	240
	ccaggtgagg tcgcagccag tgcagtctcc ctattagcgc tctcagcacc cttcttccgg	300
	cccaactctc cttccgcagc ctcgggacag catcaagtcg atccgctcac tggagttgtg	360
	gtccgcgttt ttctacgtct tttccactc cgttccctgc gaaccacatc cgcaagctcc	420
	ttcctcgagc agtttgggct ccttgatagc gttgagtgga ggcctgccg cgacttggca	480
	gtagcttatt ttgttctctc ctctctggct ggtgtggggg aggtgggggc attagggcag	540
	ggtgaagcag ggaaccact taggagtctg ttaagatgat ctgaacttca gaacaagatg	600
	ttattaacag agtgaaagta tttggattct gggatatatt tgaaatcgga ggcaacaggt	660
	ttttcagata gattcgataa cggaggttat cctgaatagt tgaaaagata aagttgcctt	720
	ttgctgaggt gggaaagaga agattgccag tagagcaggt ttctcaggag ttcagtcttg	780
	ggcatagcat ggtaggggtg aatttggctg gagtgagttg gagagtagga gaagagaaat	840
	ccaaggcaac atttgaccag cctgggcaac atagtgtgac tccgagtctg caaaaattag	900
	acgggtgttg tggtgcgctg ctgtggtctc agctacctgg aaggttcagg ccttgggaag	960
	ctcagggagg tggaggctgc agtgatctgt gattgcgctt ctgactcca gcctgggcga	1020
	cagagccaga ccctgtctta aaacaaaata aacggccggg gcgggtggct caagcctgta	1080
	atcccagcac tttgggaggc cgaggcggcc ggatcacaag gtcaggagat cgagaccatc	1140
	ctggctaaca cggtgaaacc ccgtctctac taaaaataca aaaaattagc cgggctgtgt	1200
	gacgggcgcc tgtagtccca gctactcggg aggctgaggc aggagaatgt catgaagccg	1260

ES 2 698 114 T3

ggaggcggag cttgcagtga gccgagatcg cgccactgca ctccagcctg ggcgatagag 1320
 caagactccg tctcaaataa ataaataaat aaataaataa ataataaaaa catcggtagg 1380
 catatttcaa ggaattctat ttaaaaaaaaa tttttttaga gacaagtctg ctctctgtgg 1440
 cccaggctgg agtacagtgg catgatccta gcccatggca gcgttgatct cttggcctca 1500
 agcgaccctc ctttgagtc gctgggccta aaggagtggag ccaccacgaa attttattat 1560
 aatggaggg tagagaaatt gggcaataaa tggaggggga agtgagttaa gaggaatfff 1620
 aattatgtgt gtgtggtttt aaaagagggg ggtcttgctc tgttgcccag gctgctgggg 1680
 tgccagtggc gcaatcatga atcactacag ccttgactc ctggcctcaa gctatcctcc 1740
 cacctctgcc tcccaaagta ctgggattac tagtgtgagc cactgcacta agataggagc 1800
 aacatgtttc agcatgtttg tgggttgata ggaaagatga gaatgggaaa gttgatgtcg 1860
 gaaagaagac aatggctaga gcaatgtcct agagtaggta agaagggatg gatttggcct 1920
 ttgttgaaa cattagcggg tcttttggtg acagctatat agttaacaca tctatgatac 1980
 gtgaatgggc agataggatg gcaggagatt ttgaaagttc tcttgattct tactgtttctc 2040
 ttagtgaaag aagcaagggt atcagctaga agctgggatg ggagaggaaa gagaagatgg 2100
 gaagtagata gttcttttaga agagtgggca agggttggac tagggaagtt tagtggaaat 2160
 attgctaggc aacataaaga gcctacttga gattcgtggt catgagttga aggagaccag 2220
 acagcaagat tgtgtatgag ggcaccaca gagtaaattg agagttgaaa ttaatgcagt 2280
 tgtgatttta ccacgtggat atgaagaagt gagggggaga agtacaagg agttctctta 2340
 atgattgacc atggaattta agctggctaa gaaaggaagt gagaggccgg gcgcggtggc 2400
 tcacgcctgt aatcccagca ctttgggaga ctgaggtggg tggattacct gaggtcagga 2460
 gtttgagacc aacctggccg atatggcgaa accccatctc taataaaaat acagaaaaat 2520
 tagccgggaa tgggtggcagg tgcctgtaat cccagctact caagaggctg tggcaggagt 2580
 atcccttga cccaggaggt ggaggttgca gtgagccgag atcacgccac tgtactccag 2640
 cctggacgat atagtgagac ttcacctcaa aaaaaaaaaaaa aaaagaaagg aagtgaggat 2700
 ttttaagacc tgagagacag tttaaaaagt gggaggatcg gccgggcgct gtggctgaca 2760
 cctgtaatcc cagcactttg ggaggccgag ttgggcagat cacaaggtca ggagttcgag 2820
 accagcctgg ccaatatggt gaaaccttgt ctctactaaa aatacaaaaa ttagccgggc 2880
 atggtgtcac gtgtctataa tcccagctac tcgggaggct gaggcagaaa aattgcttga 2940
 acctgggag cagaggttgc agacagctga gatcactcca ttgcactcca gcctgggcaa 3000
 caagagcaaa actttgtctt taaaaaaaaa aaaaaaaaaa gaatacaaaa attagccggg 3060
 cgtggtggcg cgtgcctata atcccagcta cttgggaggc tgaggcagga gaatcagttg 3120

ES 2 698 114 T3

aacacgggag gcgaggtttg cagtgagccg agattgcgcc actgcactcc agcctgggcg 3180
acagagcagg actcctcttg gaaaaaaaaa attagctggg catggtggca ggtgcctgta 3240
gtctcagcta ctagggaggc tgaggcagga aaatcacttg aaccgggat gtggagtttg 3300
cagtgaccog agatcgtgcc actgtactcc atcctgggog acaaaatgag actctgcctc 3360
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaagtggg aggatcaatg tactgccagt cctaataagag 3420
tggaatgatt gtcccatca aatcactagt aggagtaagt tgcagagcct agaaggtgat 3480
ggttaagaga gtgggattct tgaaactgca tttatggaga ggttgtggtt attggttata 3540
ataaataaat acagttgaag tgagtgagta gctgagatth ggggatgtat cagttcattc 3600
ttactactgct acaagacat acctgagacc aggtattht aaagataaga ggtttaatca 3660
gctcacagtt ctgctgcctg tacaggcttc tcttgtggag gcctaaggaa acttacagtc 3720
atggtggaag gtgaagggga aacaagcaca gtcttccat gccagcagg agagagagag 3780
aagggggaag tgctacatac tttaaaaca ccagatcttg tgagaacgct tadcaggaaa 3840
cagcacttgg ggatggtgct aaatcattag aaatcacccc catgatccag tgcctccta 3900
ccatgcccac ctccaacact ggggatcaca attcagcatg agatttgggt aggaacacag 3960
agctgcacca catcagagga tgtacaagat tgtggtggag aggagtthag agacctgcaa 4020
atatagggta attgaagga tcatctacat ggatathaa atcaccaaaa attatgacag 4080
gagtagtgtt ggagagagaa ctgcatgta aacattaagg aatgaggaag agtgactcgg 4140
taggctgtag gtgactgcaa taggaaacga taatagactg tgagtctggt gacaagatth 4200
tccttcttcc ttttttccc ccccccgag acagggcctc ttttgttgc ccaggtggga 4260
gtgcagtggc gcatcacgg ctactacaa cctcctccca agctcaaggg attctcccac 4320
ttcagcctct caagtagctg gaactacagg tgctgaccac catgcctggc tactthttgt 4380
caggatthtc aaggctggga atthtgagag gggaatggag gagaataatc tgaaagtgca 4440
agtaaggagc agggagatt tctthttct tthttthtt tthttthtgag tggagtctg 4500
gctcagtcgc ccaggctgga gtgcagtggc gagatctccg ctactgcaa gctccgcctc 4560
ccgtgttca cccattctcc tcttcagcc tcccgagtag ctgggactac aggcgcccgc 4620
caccacgccc agctaattgt tthtttgtat tthtagtaga gacggggtth caccgtgtha 4680
gccaggatgg tctcaatctc ctgactthgt gatccgccc cccggcctc ccaaagcgt 4740
tggtattaca ggcgtgagcc accgcgccag ccagagcagg gaagatthct tccccacatc 4800
tccagtaggt acagtgatat gaagtgtgtg gaggagaaaa gaggaaacat ctatcatttg 4860
agatggctgc gaaagaaaa ggcacctca gggagctaga tthacttag agcaagaaat 4920
gaagggatga ttcagaggtt aaaagagtgg atthtatgaa thactcaagg gagcacagtg 4980
gaagthtcag gaagtgttag gagaaggtag aagatggcag ggtgtggga ataathtgag 5040

ES 2 698 114 T3

aaatctgagc tactggaaat gactgagaat cagatataaa ggcagtcctg gtggtccggt 5100
 ctggctgccg ttgctgtgta acgaatctgc caaaacttag tggcttgaaa caacaaagaa 5160
 cattttatta tctctcattg tttctgtggg ttaggaatth gtgagagccg tgctgggcag 5220
 tttcgtgcg gctgtctcgt ggttgcacct acatagttgc tagagctaca gtagctgggg 5280
 actgagcagc tagggattgg caggctatct ctttttttca tgtagtctca tgaagatttc 5340
 tttatgtggt ttcaatgtgt gggctggttt ggatttcctt atagcatggt ggcctcagtt 5400
 ggattgctgt tttgtgatcc tttcatccc tcttgtcct gtccccagac aaccactgat 5460
 ctactttctg tcaccataga ttagcctgca tttttaagaa tttttataaa cgtggaatga 5520
 tagagtacct tttttgtcac gtttctttta tttatcatag ctattttgat tttcatccat 5580
 tttattgctg agtagtatcc cattgcatgt atatactata ctgtattcat tcgcttgctt 5640
 gtgaacattt gggctttttc cagtttggga ctgttaacaa gtagagccac tatgaatatt 5700
 agtgataag acttcatata gccaaaggctg gcagatcgct tgagcccagg agtttgagac 5760
 cagcctggga aacatggtga aacctctatt tttattttta aatcaaaaat taaaaatttt 5820
 ctataaaaaa ttttaagaa gactttgtat agacatacgc tttcattttt cttgagtga 5880
 tacttaggtc tcagggtaga tgtattttta gtctttaagg agctgtcaaa ctcttcctca 5940
 aagtgggtgt tgtaccatgt tactttttta tataacagag attaattgag caaagaaaaa 6000
 ttcaaaagt ggacagcccc cacaactaaa taggttcaga acagctcccc cattttgcat 6060
 tttgaccagc aatgtatgaa agttccattt gctcagtgct cctgcaaca cctggtatgg 6120
 tcagtctttt taatttttagg cattataata gatatagtggt cttcttgtga ttttaattag 6180
 catttcctaa tgaccagtgc tgctgttgat catttcatga gtgtatttgc catccgtata 6240
 tcttttttg tgaagtgtct attcaaatca tttgggtttt tttttttttt gttttttttt 6300
 tttggagaca gtgtctcact ctgtcaccca ggctgttggt cagtgggtgca atcacacagc 6360
 ctactgcagc ctccacctcc tgcgctcagt cttcttgtct cagccttctg agtagctgaa 6420
 attacgagca cacgccacaa tgcctggcta attttttaaa atttttaga aacaaggctct 6480
 cattatgttg cctgggcttg tcgtgaactc ctgggctcaa gcaatcttcc tgcctcagcc 6540
 tcccaaagat tgggattgca agtatgagcc actgcacccg gccaaacttac ccatctttta 6600
 attgaatttt tttgttgttg aggtttgaga gttcttcatg tttgctgggt acaatatctt 6660
 tatcagatag gtaacttgca tgtattttct cccggtttac actttggttt ttcattttgt 6720
 taacaacgtc tttttaagaa cagaaaatct taattttgct gaaatctaat ttttcagttt 6780
 tttctttgat ggttttgaga gaggaggtaa aaaaagacta ggtaagccga tagttagaca 6840
 gagtcctcgg tagaacttcc cttctaacaa aaagcagccc aagaaatcac ttctcttcta 6900

ES 2 698 114 T3

acaaggagca gcctggaaga tcgggctgta aacatgtata aggaagcagc tctggcacag 6960
 agggggagct tcctgggtaa tcagcaagct tcacatacgt aaggtgggta tgtgaagtaa 7020
 acacagtatg tgaagtaaac acagtggacc ttagtacata ctacagataag gaagctggaa 7080
 gcttgcatgt tgtgagttgt tggggttgcc tgcagctgca cggagagaaa ggggtacctg 7140
 gggccaggca tgtccaccat ggtggctcca cctcccctta tttagcacat gcacaatag 7200
 aaagagataa gcaatgtgga gtagctcagg ccaaggacct gcctgcataa taaaagggtg 7260
 ggggtggggga tgccagagat tcacgctctg tgcagatggc aacacctggc cctaactggc 7320
 tttttgctcc ctatgtgtag ataagctacc cccttccat tagctcattt ataaaaatgc 7380
 ttgcatttca ctgtggaatg ggaactcttt tcaggacctc tctctgcagg agagagctag 7440
 tctctttctt ttgcctatta aacttctgct ctacgctcac acccttggcg tgtcagcgctc 7500
 cttgatttcc tcagcgtgag accaagaacc tcgggtgccca cccagggcaa caaggccatt 7560
 tcagtttggt cttttgttat aggcaatcca tgatcacaga tttttctctc tttttttttt 7620
 ttacacagtt tagagtttta gttttacact taggtctgta atccattttg tattaattct 7680
 tatatgtggc tcagtgtagg tggaaatttg gtttgttttt gcataaggat ttccaatagt 7740
 tttaccacca tttcttgaaa ctactatgct ttctctatta aaccacattt gtaactttag 7800
 ttaaaatcag tcacatatat cacagggcta tttctgactc tcaattctgt tacattgtct 7860
 attagtgtat attgatgtca gtactacact ttttaattact attgcttcag ggtatgtctt 7920
 gtaaaccaaa aataaaatta tagggccccc ccgcccctgc acaaccaact gaatggacc 7980
 atcctctcag ccaagggcat tccaaaatta acctgaaaaa ctagttcaag ccatgatggg 8040
 aagggggagt tggacatgtc tcatcacacc ctactacctt ttggaattac tgatagaaca 8100
 gactcttaaa gtctgaaaag aaacatttac aacctaccct ctctgaagcc tgctacctgg 8160
 gagcttcatc tgcatgataa aaccttggct tccacaaccc cttatggtaa cccaacatt 8220
 cttttctggt gataataact ctttcaacta gttgccaatt agaaaatctt taaatcttcc 8280
 tatgacctag aaacctccct acccccactt tgagttgtcc tgcccttccct gacagaactc 8340
 atgtacatct tacatatatt gattgatgcc tcatgtctcc ctaaaatgta taaaacaaag 8400
 ctgtacccca ccacctggg gacatgtcat caggacctcc tgtggctgtg tcataggagc 8460
 gtctttaact ttggcaaaat aaactttcta aattgattga aacctgtctt agctacttct 8520
 ggtttacagt cttaaagta gataatgtaa attgtccagc tttggtttat ttttgcctt 8580
 agtagttcca tataaathtt agaactcagct tttcaattta atacactact ttcctcttag 8640
 atccacaatt aaatatatt gatgctaaca attctgtttt atgtttttog tttttttttt 8700
 ttgagacaag agtttcgctc ttgttgccca ggctggagtg cagtggcgcg atcttgctc 8760
 accacaacct ccacctcca ggttcaagca attcttctgc ctacgcctcc cgagtagctg 8820

ES 2 698 114 T3

ggattacagg catgogccac cacgcccggc taatthttgta thtttagtag agacggggtt 8880
 tcaccatggt gatcaggctg gtcttgaact cctgacctca ggtgatccac ccacctggc 8940
 ctcccaaagt gttgggatta caggcgtgaa ccaccatgcc tggccagttc tgttathttt 9000
 aaaaccaag thtccctggc catatcttg gtgatgaag cgtathttca atagattacc 9060
 ctggaaaggc tagtgagtac ggtattcttc tacathtttag actthttctta gtcttgctac 9120
 ttcaaggaca gctaggctgc atataaaatt ctggctcat actthttccc cataaatttc 9180
 tatgagaaag tctaatgata actgathttc thtathttgt aacttagtct thttgcttag 9240
 aggctctctg aggatgggag ggggttcttc ctcccatccc taggaathtt thttthtttt 9300
 aattcctaa tcactagacc accaggaaga ttgtttgtht tgthttgtht thattcttca 9360
 gggaccccat ttatacatac gttaaataaa tactgtttgc caatgatca accathttgc 9420
 thcttathta thtttgthc thtggtctt thtcatggct ttgctthgt gtccttaga 9480
 thttcagtca gatgathttg tccttgggta ccttgaatc agtattacct thtctctgt 9540
 cgctthgtt thtgttctg ttgaaattac ttgtthctg gtctggcaat aacagttgag 9600
 atatgaggag thtgagctgc catctgtcta tgtatcttg thtaagactg cactcttcta 9660
 ttgatcac tggccttgat thtgtgath thttathttc tcaggaccac cthcathtt 9720
 ctactgttg thtctthtt thttgagatg gagtctcact ctgtcactca ggctggagtg 9780
 cagtgatctt ggctcattgc aacctctgcc tcccggttc cagcaathct cctgcctcag 9840
 cthccaaagt atctgggact acaggtgtgc accacctgc ccggctaagt thtgtathtt 9900
 taatagagac ggggtthtg cacattggca ggtggtctc aaactcctga tgtcaagtga 9960
 tccaccacc ccaaccacct ctgcatccc aagtgtggg attacaggaa tgagctgccg 10020
 tgccagcct cccctacc thctthtt thttctgaga cagagathat aggtgtgagc 10080
 cactggacc agcctgtht thttcttht accaaatctc caaggaath thtcccttc 10140
 aagtgcgaat gtaacctta gtcagthaac thctthtgta thactthttc thctgcaaa 10200
 gtgactaat gatcttaagt actthtttht thtgagacag ggtctcactg tcacctggc 10260
 tggagtgcag tggcacgatc thtgatctc actcactgca atctctct thctggttca 10320
 agcggccctc ccaccttagc thtctgggta gctgggacta cagatgtgaa ccaccacgcc 10380
 cagctaatth thgtacttht ttagagatg ggtthttgc atgttgcca ggctgggath 10440
 athaagtact thttatcata cagcaagath gacathttat attggaath atthgtctc 10500
 atataacgga gattaacagg aaaatgaca gcctgggtgc ggtggctcat gcctgthaac 10560
 ccagcactth gggaggctga ggtgggagga tcacttgagg tcaggagthc gagaccagth 10620
 ttccaagat gatgaaagcc catgtctact aaaaataca aaathagccc agcttgatgg 10680

ES 2 698 114 T3

tgggcgccta taatcccagc tatttgagag actgaggcag gagaatcact tgaacctggg 10740
 cggcagaggt tgcagtgagc cgagatcatg ccaactgcact ccagcctggg tggcatagcg 10800
 agactcctgt ctcaagagaa aacaaaacaa aacaaaaaaaa aacaggaaa atgacaaaaa 10860
 gtaatattac aactcagtga attttataac aaactttttt ggaattcatt gactaatact 10920
 ataccaaatc caaaatactc tctagtatac caaatccaac tctaccctat agtataaatt 10980
 ggattctatt tggacttgtc tcaactaatcc ctcatacagt gtgttttatt ttttattgaa 11040
 gtaaaaaaat ttgtcatttt aaccattttt aagtatatag ttcagtaata ttaagtatgt 11100
 tcatgttgtt gcgcaataga tcttcggaag tttttcgtct tgcaacctga aactctacc 11160
 attagcaaat tcccatttct ccttacactt agcccttggg aatcatcatt cttttttttt 11220
 tttttttgag atggagtttt actccttgtt gccaggctgg agtgcaatgg tgcaatctcg 11280
 actcaccaca acctccgcct cccaggttca agcaattcta cctcagcctc ccgagtagct 11340
 gggattacag tcatgcacca ccacgcccgg ctaattttgt attttttagta gagaaggggt 11400
 ttctccatgt tgaggctggt ctggaactcc tgacctcagg tgatctgcc acctcggcct 11460
 cccaaagtgc tgggattaca ggcgtgagcc actgocgctg gccattctt tctaattcta 11520
 taaatttgac tacttagtta ccttacataa ataaattctt atagttagtg ttatttttgc 11580
 ttccatgcct tttttgttgt tgttcatgct cttacttggg atgcgttcta ttttgtctac 11640
 ctatgcacat cctgttggggt tttttttttt tttgggggtt ttttttgttt ttttttgttt 11700
 ttttttccca gacaaggtct caatttgtta cccaggctgg agtgcagcgg cgccatctcc 11760
 actcactgca tcctcaactt cctgggccc ggtgatcctc tcgcctcagc ccctgcaggt 11820
 agctgggact atagggcatgt gccaccatgc ccagctaaat ttggtttttt ttgtttgtttg 11880
 tttttgagac agagtctcac tctgtcacc aggctggagt gcagtggcac aatctcagct 11940
 cactgcaatc tctgccgcc gggttcaagt gattctcctg cctcagcctc ccaagcagct 12000
 gggattacag gtgactgcc caacgccagc taagttttgt agtttttagta gagatgggggt 12060
 ttcaccttgt tggccatgct ggtctcgaac tctcagcctc gtgatctgcc tgcttctgcc 12120
 tcccaaagtg ctggaattac aggcattgag caccacgcc gcccagaatt tttgtatttt 12180
 tagtagacac aaggttctta ccctgttgcc taggctggtc tggaaagtct ggactcaagc 12240
 aattcacctg ccttggcctc ccaaatgct gggattacaa gccaccatgc ccggcctaaa 12300
 tcctgttgtt ttgttttgtt ttattttgtt ttgttttgtt ttgtttgttt tttgagacag 12360
 agtctcgta tgtctctcag gctgtagtgc agtggcgca tcttggctca ctgccacctc 12420
 tgcctcccag gttcaagtga ttctcctgcc tcagcctccc aagtagctgg gattacaggc 12480
 atgtgctact atgtccggct aatttttgta ttttttagtag agacaggggt tcaccatggt 12540
 gcccaggctg gtctcgaact cctgacctcg tgatccacc acctcggcca cccaaagtgc 12600

ES 2 698 114 T3

tgggattaca	ggcgtgagtg	gtttttat	cttaggccgg	tttcctccat	atgatcttgc	12660
agtagacatt	aatttctttc	ctttttaatt	aaaatactgt	ttgtatttca	cattttgatg	12720
tttgtaaga	tttgttttat	attgtttttt	gttttgtcct	gtgtgatagt	cttaaatccc	12780
tagttagata	ataactggag	agtaccatgt	ttctatatat	ctctcagtga	cttgcacagt	12840
gctagcagat	agtgctaaaa	aattat	tattattatt	at	ttt	12900
gttgtagac	agggctttcc	tctgtcacc	aggctagagg	gcaatgggat	gatcatagct	12960
tactgcagcc	tccaacaact	gggctcatgt	aattctcctg	cctcagcttc	ccaagtagct	13020
gggattacag	gcatgagcca	ccatgtctgg	acaaaaatat	ttccaggtgc	agtggctcat	13080
gcctgtaatt	cccacacttg	ggaggccgag	cgaggctgga	ggatcacttg	agcctaggag	13140
ttcaagacca	gcttggctaa	gatggcgaga	ccccgtccct	acaaaaaatt	ttaaaaacta	13200
gccaggcatg	gtggcatgca	cctatattcc	caactactca	gtgggctgag	gtgggagggt	13260
catttgaaca	caggaatttg	aggggagaaa	aaaagaagag	agaaagagaa	gtgaaggaag	13320
gaagaaagga	aggaggagg	gagagaagaa	agaaacgaaa	gaaaggaaaa	gaaaaggaag	13380
gaaagaaat	tggtaccagg	aaagcaggaa	agggaaatgg	aagtaaaaaa	ataataataa	13440
taataaaatg	aaaattggtt	agtcactatt	aacaatttgt	atccttataa	tctggaaca	13500
ttataatttc	aaaagaaaaa	atattctttg	gatcataggt	tctgaggtca	gaacagcatt	13560
cccgtagtct	agatgaagtc	aagttttatc	tgatcttaat	tgaaataaat	atagctggcc	13620
ttgaacaaat	ctactcatgg	tatgtggata	ggaattaaat	tgtaggggca	ttcacttgat	13680
ggcattcatt	cttagaacat	ttacctatgt	ctagcttttg	gagtaaagtc	acataacctc	13740
taaccaggta	agtttcctgt	ggctttat	aggattttaa	atactcattt	tcagtgtaat	13800
tttgttatgt	gtggattaag	atgactcttg	gtactaacat	acattttctg	attaaaccta	13860
tctgaacatg	agttgttttt	at	tttcttacc	ctttccagag	cgatgattct	13920
atgatacagc	actgataaaa	gcatatgata	aagctgtggc	ttcatttaag	gtatgaaatg	13980
cttgcttagt	cgttttctta	tttctcgtt	attcatttgg	aaaggaattg	ataacatacg	14040
ataaaagtgtt	aaagtacatg	ttattcagtt	ttcattttga	agattagatg	gtagtatgag	14100
ttagttaa	caggtgat	cctcctttag	aagttgatag	cctatatatg	tcacctttg	14160
tggaggcaat	ttaaataaaa	tttaa	acat	ctgggtatgg	tggctcactc	14220
ctgtaatccc	agcactttga	gaggctgagg	cggggtggatc	acctgaggtc	aggagtttga	14280
gaccagcctg	gccaacatgg	tgaacccccg	tctttactaa	aaatacaaaa	attagccaag	14340
catggtggca	cgtgcctgta	atcccagctg	cttgggacac	tgaggcagga	gaattgcttg	14400
aacctggggg	gcagagggtg	caatgattgc	accactgcac	tccagcctgg	gcatagagt	14460

ES 2 698 114 T3

gagactccat ctcagaaaac gaacaaacaa tgtattcctt ttagtatttt tacattgtat 14520
caaactatgg aagtcctcta attgagatta ataagaaaa gacaatctga attataatth 14580
taaacattta acaagcatgt agtaaaataa tgatgaagat aaatagcatt agtacagcaa 14640
ttaatatttg tagcatgctg acagtgctct gtgtgctgtt catatattaa attactctaa 14700
tcatcccaa tcctgtaagt tgggtatcaa ttcaagtgtt cctattgggt aggaatatac 14760
agttctttta ggaaatgtag tatggttctg tgtctcaaac aggacactta cacagttggc 14820
caacatcacc accttctcca ttctctgaga tgttttagtct tactgagcac taaatatggg 14880
tcatcaatag tccagactac cttgagcaaa caatagtcca gactaccttg agcaaacaga 14940
gcatatactc atacagtgta taaagagcac caagcataca gatttcatgt ctttctcata 15000
gttactcttg taacatgagc taaagatcag acctctatgt cacctttgta actgatttct 15060
agattttttt ttttttttga gatgggtctc tgccctgtca cccaggtgg agtgtagtgg 15120
cgtgatcatg cctcattgga gccttcaact catgagctca aacaatcctc ctacctcagc 15180
ttcctgagta gttgggacca caggtgtgtg ccaccacacc cagctcattt ttgtattctt 15240
tgtagagatg cagtctcacc ctggtgcccc cgctggcctg gaactcctga gctcaaaaga 15300
tcctccgcc ttgaccttcc aaagtgtctg gattacaagc atgaaccact gcacccggcc 15360
tagattttta aatgtgcttt ccagtataca ctgaaactag aagtcgacta aagaattacc 15420
aagagaattc tataaaatag agattgaaat ggggctcgat gtgggatggg ttggtgatata 15480
tgcagggaga agtaatctga gtaaaggagg aaaagaactg atttgggaaa acgatagttt 15540
tagtagtgag tttgagtatg aattaagttg agattgaatt tgaattaagt tgaggtgaa 15600
tatgaattaa gttgaggttg agtttgaggt atgaattaag atgtgaaatt gatcattgga 15660
aatgttagat tgagaaaagt cacagctgga ttaatagctt cagaagtgtg tttgcagaca 15720
gttgcaacta aagtaataag aatagatggc cttggccggg cgcggtggct cacgcctgta 15780
atcccagtac tttgggaggc tgaggcgagc aaatcacgag gtcaggagtt caagaccagc 15840
ctggcccaca tggtgaaacc ccgtctttat taaaataca aaaattagct gtgcacagtg 15900
gtgcacgcct gtaatcccag ctactcggga ggctgagaca ggagaatcgc ttgaacctgg 15960
gaggtggagg ttgcagttag ctgagatcag tgtgactgca ctccagcccg gtgacagagt 16020
gagactctgt gtaaaaaaat aaaataaata aaataatggc cgtaaagcaag taaagaagga 16080
tggccagctc ttattgggaa tgccataatc taaggcttga tcagaagtaa tgaaacctgt 16140
ggggccctac attgctatga catccaaagg gccatgaata tcaggaagaa agataattaa 16200
caggtctaa tgttacagag aggttgagag caaggagatt tgattaaaag ggtctttaga 16260
gctgatgtca ggtgtatgat gcctttaaga gcagttttta tagtgcaggg ggtggtcaaa 16320
agagaaaata ggtgctttct gaggtgacgg agccttgaga ctagcttata gtagtaactg 16380

ES 2 698 114 T3

ggttatgtcg tgacttttat tctgtgcacc accctgtaac atgtacattt ttattcctat 16440
 tttcgtagca tgctctaaag aatggtgaca tttgtgaaac ttcgggtaaa ccaaaaacca 16500
 cacctaaaag aaaacctgct aagaagaata aaagccaaaa gaagaatact gcagcttcct 16560
 tacaacaggt tatttttaaaa tgttgagatt taacttcaaa ggatgtctca ttagtcctta 16620
 tttaatagtg taaaatgtct ttaacttaag tgattagtac agtgtttcta ttgacatata 16680
 cttatacaac ttcaaaaaca actattaaat tttctgttat ttaggaacat gcatattagt 16740
 catgaaagta taaagaatta gatgggaatg ataaatgcta aaatcaggac atgtgttcca 16800
 tttgtgaatg gaaggcaggg agaaggtgcc gtttggaagg agtacccaag agccgtaagc 16860
 tgaattggca gtgttttaca tcttaagctg agagatagat tttttttcc cctttttctt 16920
 taaaaactct aaaactgtta attccaagga acccagaagt ctaggtagat tatttctgct 16980
 agttaaagc agtagtcctg aaagctgaat attttgggtg cttttgagcc aactttagtt 17040
 tcatcattac caagggggaa gagagctaac agttgatgag cacttgctct aggccagtcc 17100
 agagtgtggt gcaccatacg cattttatct ccctcccgct attcacaaca aatatgggag 17160
 gtagtttata ttatagccat ctaataagat ggggaaacta agactcaaag agattcagaa 17220
 acttgtccat gattataaat gtaagagagt tggaattcag atttatgtat ttagacccca 17280
 agcctttctc attacatcat tttgccttcc aaatctctac cctctatcct tcacctcccc 17340
 actgatcaaa acgagatgat agtttgcctt cttcaaaaga aatgtgtgca tgtatatac 17400
 tttgatttct tttgtagtgg aaagttgggg acaaatgttc tgccatttgg tcagaagacg 17460
 gttgcattta cccagctacc attgcttcaa ttgattttaa gagagaaacc tgtgttgtgg 17520
 tttacactgg atatggaaat agagaggagc aaaatctgtc cgatctactt tccccaatct 17580
 gtgaagtagc taataatata gaacaaaatg ctcaagaggt aaggatacaa aaaaaaaaa 17640
 attcaatttc tggaagcaga gactagatga gaaactgtta aacagtatac acagttgtca 17700
 gtttgatcca ccgaggcatt aattttttct taatcacacc cttataacaa aaacctgcat 17760
 attttttctt tttaaagaat gaaaatgaaa gccaaagtcc aacagatgaa agtgagaact 17820
 ccaggtctcc tggaaataaa tcagataaca tcaagcccaa atctgctcca tggaaactct 17880
 ttctccctcc accacccccc atgccagggc caagactggg accaggaaag gtaaaccttc 17940
 tatgaaagtt ttccagaaaa tagttaatgt cgggacattt aacctctctg ttaactaatt 18000
 tgtagctctc ccatgaaact tttgtagctt aaatacacia gaattttttg aaaaggaaat 18060
 aagataatga tgcaaaatag ttaatttttt aaaaaaatgt tagacactgc agtggatgca 18120
 acaaaaactt ttatatgaaa gatttatcca gttaactttt gtggagtatt aggtattaga 18180
 ctaataatta gcacacttac ttaagttaga aagtataata atgcgccgga cgcggtagct 18240

ES 2 698 114 T3

cacgcctgta atcccagcac tttgggaggc caaggtgggc ggatcacaag gtcaggagat 18300
cgagaccatc ctggctaaca cggtgaaacc ccatctctac tgaaaataca aaaaaatttg 18360
ccgggcgtga tggcgggcac ctgtagtccc agctactcgg gaggctgagg caggaggatg 18420
gtgtgaaccc cggaggcaga gcttgcaagt agtcaagatc gtgccactgc actccaacct 18480
gggcgacaga atgagactcc atctcaaaca aaaaaacaaa aaaaaacaaa aaaaagtgt 18540
ataataatth atcattagct ggatgatatg ctgttgthtc ccatgtcacc tgtataagat 18600
atgtaaaata agaacacatt atttacatct aatatagata aaatcctgag gcgctctcag 18660
attgthttgt agagttcaaa tgtaaatatt gthttcattt atggctcttt tggttataag 18720
taacagaaat caactctaaa aagathttta ttataggtha gattatgtca tggaacctta 18780
aggcttgthc cthttctagth cthttgtgta aagcggthgat thcttccatg gagggaatgg 18840
tathtaggca aththththth ththttcgaga tggagthctg ctctgtcgtc caggctggag 18900
tgcagthgca ccaththcagc tcactgcaac thccacctcc tgggthcaag thattctctc 18960
gththcagct cccaagthagc tgagathaca ggcacctgcc accacacctg gththththg 19020
tathththth agagathggg ththcaccatg thggccaggc tggthctgaa ctctgacct 19080
caagthgatc cccacctg gcctthcaaa thgctaggat tacagggcc thgcctaggc 19140
agthcaththc aaaaaacaag catgactcac caaagththt aagaththct thgataatgt 19200
thctthththg gththacatta ththacagth thctgaaatc aaaathgatg accctcttag 19260
gatathataca thcatgctthc thggtctcag ggggctgath ththataagga gagaththgct 19320
agthththcaca aththgthctc thagththgca thgthathgta aacagthctth cataaaaata 19380
thacaaththth thaatgaaat thgggathata thctthththth athgaaataa thththgthaa 19440
thagctgthct ctgathththt aggthaatcac cactctththt thgthththth thctthaatg 19500
ctacathagaa aggaaathgag aaaaathccag aggththctat thgactththg agthctgththg 19560
actthcaggat thggtathcag aathththct thaatctththt gaththgthata aacaaathat 19620
thctgggthaat thththththc thththggtht thgagthcttht thththctat caththgaaa 19680
thggtthagth aathththct thgaaaththc ththathgca gthctthaaat thcaathggcc 19740
accacctgca ccgcccacc caccacctca ththctththc thgctgththg thctcaththc 19800
thctgggacca ccagthagth aaaaagagth thagththgath ththgctththc cathacaathth 19860
gathaththg agathagag ththgthaaat thcathththg aacathctth gggccagath 19920
ctathgggth gaaaththgaa thaaacctct gggthththth thththththth gcctththctg 19980
thacctgathc cagthgctct ththgthccaa thcthaagthc thagththgct thctthctgth 20040
cagathgthg thgthctgthc athagggth agthctgtht agathgggath thaththacc 20100
ththataagth aaththgtht thgctththc ththathgthg thgththgth thctgathgth 20160

ES 2 698 114 T3

actggatttc ttttctttc tctctctttt tttttttttg ttttgaggc agagttttgc 20220
 ccttgtacc caggctggag tgcagtggg tgatctcagc tcacagcaac ctccgcctcc 20280
 tgggttcaag caattctgcc tcggcctccc aagtagctgg gattacaggc gactgccacc 20340
 acaccggct aatttttgtt ttattagtag agatgggggtt tcacatggt gccagactg 20400
 atcttgaact cctgacctca ggtgatccac ccgccttggc ctcccaaagc gctgggatta 20460
 caggcgtgag ctgocgcacc cagctgtaaa ctggatttct aatggtagat ttttaggtat 20520
 taacaataga taaaaagata ctttttggca tactgtgtat tgggatggg ttagaacagg 20580
 tgttctacc aagacattta cttaaaatcg ccctcgaaat gctatgtgag ctgtgtgtgt 20640
 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt attaaggaaa agcatgaaa tatttatgct tgattttttt 20700
 ttttactca tagcttcata gtggaacaga tacatagtct aatcaaaat gtttaaactt 20760
 tttatgtcac ttgctgtctt ttcgtcctcg ttaaatttaa tttgttggc cttttgttgt 20820
 tattggttg ttttctcaa atgctagcta tgtaagaaa ttaaggcca ggtacagtgg 20880
 ctcatgcctg taatccggc attttagaag gctgaggcag gaggatcact tgagctcagg 20940
 agtttgagac cagtctggc aacatagcaa gacctcgtct ttgtttagg gaaaaaaag 21000
 aaatttaagt aggagattat ataagcaaaa atacaattaa tttccagcat tcaactatata 21060
 atataaatct ccagacttta cttttttgtt tactggatat aaacaatct ttttctgtc 21120
 tccagataat tccccacca cctcccatat gtccagattc tcttgatgat gctgatgctt 21180
 tgggaagtat gtaatttca tggtagatga tgggctatca tactggctat tatatggtaa 21240
 gtaatcactc agcatctttt cctgacaatt tttttgtagt tatgtgactt tgtttttaa 21300
 atttataaaa tactacttgc ttctctctt atattactaa aaaataaaaa taaaaaata 21360
 caactgtctg aggttaaat tactcttga ttgtccctaa gtataatttt agttaatttt 21420
 aaaaagcttt catgctattg ttagattatt ttgattatac acttttgaat tgaattata 21480
 ctttttctaa ataatgtttt aatctctgat ttgaaattga ttgtaggga tggaaaagat 21540
 gggataattt tcataaatg aaaaatgaaa ttcttttttt ttttttttt tttttgagac 21600
 ggagtcttgc tctgttgccc aggctggagt gcaatggcgt gatcttggct cacagcaagc 21660
 tctgccttct ggattcacgc cattctcctg cctcagcctc agaggtagct gggactacag 21720
 gtgcctgcca ccaogcctgt ctaatttttt gtattttttt gtaaagacag ggtttcactg 21780
 tgtagccag gatggtctca atctcctgac ccgctgatcc accgcctcg gcctccaag 21840
 agaatgaaa tttttttaat gcacaaagat ctggggtaat gtgtaccaca ttgaacctg 21900
 gggagtatgg cttcaaactt gtcactttat acgttagtct cctacggaca tgttctattg 21960
 tatttagtc agaacattta aaattatttt atttattttt attttttttt tttttttgag 22020

ES 2 698 114 T3

acggagtctc gctctgtcac ccaggctgga gtacagtggc gcagtctcgg ctcaactgcaa 22080
 gctccgcctc ccgggttcac gccattctcc tgcctcagcc tctccgagta gctgggacta 22140
 caggcgcccg ccaccacgcc cggctaattt ttttttattt ttagtagaga cggggtttca 22200
 ccgtgggtctc aatctcctga cctcgtgatc caccogcctc ggctcccaa agtgctggga 22260
 ttacaagcgt gagccaccgc gcccggccta aaattatttt taaaagtaag ctcttgtgcc 22320
 ctgctaaaat tatgatgtga tattgtaggc acttgtattt ttagtaaatt aatatagaag 22380
 aaacaactga cttaaaggtg tatgttttta aatgtatcat ctgtgtgtgc cccattaat 22440
 attcttattt aaaagttaag gccagacatg gtggcttaca actgtaatcc caacagttt 22500
 tgaggccgag gcaggcagat cacttgaggt caggagtttg agaccagcct ggccaacatg 22560
 atgaaacctt gtctctacta aaaataccaa aaaaaattta gccaggcatg gtggcacatg 22620
 cctgtaatcc gagctacttg ggaggctgtg gcaggaaaat tgctttaatc tgggaggcag 22680
 aggttgagct gagttgagat tgtgccactg cactccaccc ttggtgacag agtgagattc 22740
 catctcaaaa aaagaaaaag gcctggcacg gtggctcaca cctataatcc cagtactttg 22800
 ggaggtagag gcaggtgat cacttgaggt taggagttca ggaccagcct ggccaacatg 22860
 gtgactactc catttctact aaatacacia aacttagccc agtggcgggc agttgtaatc 22920
 ccagctactt gagaggttga ggcaggagaa tcacttgaac ctgggaggca gaggttgag 22980
 tgagccgaga tcacaccgct gcactctagc ctggccaaca gagggagaat ttgaggagg 23040
 aaaaaaaagt cacgcttcag ttgtttagt ataaccttg tatattgtat gtatcatgaa 23100
 ttctcattt taatgaccaa aaagtaataa atcaacagct tgtaatttgt tttgagatca 23160
 gttatctgac tgtaaacactg taggcttttg tgttttttaa attatgaaat atttgaaaaa 23220
 aatacataat gtatatataa agtattggt taatttatgt tctaaataac tttcttgaga 23280
 aataattcac atggtgtgca gtttacctt gaaagtatac aagttggctg ggcacaatgg 23340
 ctcaagcctg taatcccagc actttgggag gccaaaggcag gtggatcacg aggtcaggag 23400
 atcgagacca tcctggctaa catggtgaaa ccccgctct actaaaagta caaaaacaaa 23460
 ttagccgggc atgttggcgg gcacctttg tcccagctgc tcgggaggct gaggcaggag 23520
 agtggcgtga acccaggagg tggagcttgc agtgagccga gattgtgcca gtgcactcca 23580
 gcctgggcga cagagcgaga ctctgtctca aaaaataaaa taaaaagaa agtatacaag 23640
 tcagtggttt tggttttcag ttatgcaacc atcaactaca ttaagaaca ttttcatcac 23700
 cccaaaaaga aaccctgtta ctttatttt cccagccct aggcagtcag tacactttct 23760
 gtctctatga atttgtctat tttagatatt atatataaac ggaattatac gatatgtggt 23820
 cttttgtgtc tggcttctt cacttagcat gctattttca agattcatcc atgctgtaga 23880
 atgcaccagt actgcattcc ttcttattgc tgaatattct gttgtttggt tatatcacat 23940

ES 2 698 114 T3

tttatccatt	catcagttca	tggacattta	ggttggtttt	atTTTTgggc	tataatgaat	24000
aatgttgcta	tgaacattcg	ttgtgttct	ttttgttttt	ttgggttttt	gggttttttt	24060
tgTTTTgttt	ttgtttttga	gacagtcttg	ctctgtctcc	taagctggag	tgcaagtggca	24120
tgatcttggc	ttactgcaag	ctctgcctcc	cgggttcaca	ccattctcct	gcctcagccc	24180
gacaagtagc	tgggactaca	ggcgtgtgcc	accatgcacg	gctaattttt	tgtattttta	24240
gtagagatgg	ggtttcaccg	tgtagccag	gatggtctcg	atctcctgac	ctcgtgatct	24300
gcctgcctag	gcctcccaa	gtgctgggat	tacaggcgtg	agccactgca	cctggcctta	24360
agtgttttta	atacgtcatt	gccttaagct	aacaattctt	aacctttgtt	ctactgaagc	24420
cacgtggttg	agataggctc	tgagtctagc	ttttaacctc	tatctttttg	tcttagaaat	24480
ctaagcagaa	tgcaaatgac	taagaataat	gttggtgaaa	taacataaaa	taggttataa	24540
ctttgatact	cattagtaac	aaatctttca	atacatctta	cggctctgta	ggtgtagatt	24600
agtaatgaag	tgggaagcca	ctgcaagcta	gtatacatgt	agggaaagat	agaaagcatt	24660
gaagccagaa	gagagacaga	ggacatttgg	gctagatctg	acaagaaaaa	caaatgtttt	24720
agtattaatt	tttgacttta	aatttttttt	ttattttagtg	aatactggtg	tttaatggtc	24780
tcattttaat	aagtatgaca	caggtagttt	aaggtcatat	atTTTatttg	atgaaaataa	24840
ggtataggcc	gggcacggtg	gctcacacct	gtaatcccag	cactttggga	ggccgaggca	24900
ggcggatcac	ctgaggtcgg	gagttagaga	ctagcctcaa	catggagaaa	ccccgtctct	24960
actaaaaaaaa	atacaaaatt	aggcgggcgt	ggtggtgcat	gcctgtaatc	ccagctactc	25020
aggaggctga	ggcaggagaa	ttgcttgaac	ctgggaggtg	gaggttgcgg	tgagccgaga	25080
tcacctcatt	gcactccagc	ctgggcaata	agagcaaaac	tccatctcaa	aaaaaaaaaa	25140
ataaggtata	agcgggctca	ggaacatcat	tggacatact	gaaagaagaa	aaatcagctg	25200
ggcgcagtgg	ctcacgccgg	taatcccaac	actttgggag	gccaaggcgg	gtgaatcacc	25260
tgaagtcggg	agttccagat	cagcctgacc	aacatggaga	aaccctgtct	ctactaaaaa	25320
tacaaaacta	gocgggcatg	gtggcgcgatg	cctgtaatcc	cagctacttg	ggaggctgag	25380
gcaggagagt	tgcttgaact	gagaaggcgg	aggttgcggt	gagccaagat	tgaccatttg	25440
cactccagcc	tgggcaacaa	gagcgaact	ccgtctcaaa	aaaaaaagga	agaaaaatat	25500
ttttttaaat	taattagttt	atTTTatTTT	taagatggag	ttttgccctg	tcgcccaggc	25560
tggggtgcaa	tggtgcaatc	tcggctcact	gcaacctccg	cctcctgggt	tcaagtgatt	25620
ctcctgcctc	agcttcccga	gtagctgtga	ttacagccat	atgccaccac	gccagccag	25680
ttttgtgttt	tgTTTTgttt	ttgttttttt	ttttttgaga	gggtgtcttg	ctctgtcccc	25740
caagctggag	tgcagcggcg	cgatcttggc	tcaactgcaag	ctctgcctcc	caggttcaca	25800

ES 2 698 114 T3

ccattctctt gcctcagcct cccgagtagc tgggactaca ggtgcccgcc accacacccg 25860
 gctaattttt ttgtgttttt agtagagatg gggtttcact gtgttagcca ggatggtctc 25920
 gatctcctga ccttttgatc caccgcctc agcctcccca agtgctggga ttataggcgt 25980
 gagccactgt gcccggccta gtcttgatt tttagtagag tcggggtttc tccatggtgg 26040
 tcaggctggt ctccaaatcc gacctcaggt gatccgcccg ccttggcctc caaaagtga 26100
 aggcattaca ggcatgagcc actgtgaccg gcaatgtttt taaattttt aaatttaaat 26160
 tttatttttt agagaccagg tctcactcta ttgctcaggc tggagtgcaa gggcacatc 26220
 acagctcact gcagccttga cctccagggc tcaagcagtc ctctcacctc agtttccga 26280
 gtagctggga ctacagtgat aatgccactg cacctggcta atttttattt ttattttatt 26340
 attttttttt gagacagagt cttgctctgt caccaggct ggagtgcagt ggtgtaaate 26400
 tcagctcact gcagcctccg cctcctgggt tcaagtgatt ctctgcctc agcctccaa 26460
 gtagctggga ttagaggctc ccaccacat gcctggctaa tttttgtac tttcagtaga 26520
 aatggggttt tgccatggtg gccaggctgt tctcgaactc ctgagctcag gtgatccaac 26580
 tgtctcggcc tcccaaagtg ctgggattac aggcgtgagc cactgtgcct agcctgagcc 26640
 accacgcggg cctaattttt aaatttttg tagagacagg gtctcattat gttgccaggg 26700
 gtggtgtcaa gctccaggtc tcaagtgatc ccctacctc cgctccaa agttgtggga 26760
 ttgtaggcat gagccactgc aagaaaacct taactgcagc ctaataattg ttttctttgg 26820
 gataactttt aaagtacatt aaaagactat caacttaatt tctgatcata ttttgttgaa 26880
 taaaataagt aaaatgtctt gtgaaacaaa atgcttttta acatccatat aaagctatct 26940
 atatatagct atctatgtct atatatgctat ttttttaac ttcctttatt ttccttacag 27000
 ggtttcagac aaaatcaaaa agaaggaagg tgctcacatt ccttaaatta aggagtaagt 27060
 ctgccagcat tatgaaagtg aatcttactt ttgtaaaact ttatggtttg tggaaaacaa 27120
 atgtttttga acatttaaaa agttcagatg ttaaaaagtt gaaaggtaa tgtaaaacaa 27180
 tcaatattaa agaattttga tgccaaaact attagataaa aggttaatct acatccctac 27240
 tagaattctc atacttaact ggttggttat gtggaagaaa catactttca caataagag 27300
 ctttaggata tgatgccatt ttatatcact agtaggcaga ccagcagact tttttttatt 27360
 gtgatatggg ataacctagg catactgcac tgtacactct gacatatgaa gtgctctagt 27420
 caagtttaac tgggtgtccac agaggacatg gtttaactgg aattcgtcaa gcctctgggt 27480
 ctaatttctc atttgcagga aatgctggca tagagcagca ctaaatgaca ccaactaaaga 27540
 aacgatcaga cagatctgga atgtgaagcg ttatagaaga taactggcct catttcttca 27600
 aaatatcaag tgttgggaaa gaaaaagga agtggaatgg gtaactcttc ttgattaaaa 27660
 gttatgtaat aaccaaagtc aatgtgaaat attttactgg actctatttt gaaaaacat 27720

ES 2 698 114 T3

	ctgtaaaaga ctgggggtggg ggtgggaggc cagcacgggtg gtgaggcagt tgagaaaatt	27780
	tgaatgtgga ttagatTTTTg aatgatattg gataattatt ggtaatttta tgagctgtga	27840
	gaagggtggt gtagtttata aaagactgtc ttaatttgca tacttaagca tttaggaatg	27900
	aagtgttaga gtgtcttaaa atgtttcaaa tggtttaaca aatgtatgt gaggcgtatg	27960
	tggcaaaatg ttacagaatc taactggtgg acatggctgt tcattgtact gtttttttct	28020
	atcttctata tgtttaaaag tatataataa aaatatttaa ttttttttta aa	28072
	<210> 2	
	<211> 172	
5	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 2	
	taaagtcaa atttatgtat gggctgtgat tgaacaaaag acaccttaa tgtcaaattt	60
	atgtatggga acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac	120
	atatatataa attttttacc tgagaagtta ggtgtctttg tttcaatcac ag	172
	<210> 3	
	<211> 146	
10	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 3	
	tccatggata cggagagctg tgatggcacc acaacatgc tccatggata cggagagctg	60
	actctgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tatggcttca	120
	tttcatgcat ggttgtggtg ccatca	146
	<210> 4	
	<211> 236	
15	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 4	
	tcaggaccct cctcatcatc cgggatctct tctccacaga tcaggaccct cctcatcatc	60
	tccctttcat actgagtaga aatcagaggc ttgctttatt cttcaactac catttctatt	120
	tccttcttcc aaaaccaggg tgaagcctct gaggggtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg	180
	tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tagatgaatg ctaaactctg tggagaagag atccccg	236
	<210> 5	
	<211> 196	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 5	

ES 2 698 114 T3

	ggatctctga ggctgcacat gaaagtcttt gatgagatac cgggatctct gaggctgcac	60
	atgtgcgtgc gcaaacacac acacacacac acacacacac acacacacac ccctccacac	120
	ctttcttctt gctgcagtct gttgcctttc aaaatctttt ccctcactta tttacggtat	180
	ctcatcaaag actttc	196
	<210> 6	
	<211> 180	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 6	
	acacacatgc acgctctctc aagagcacag tttggagtga gagacacaca tgcacgctct	60
	ctcagacatg atctgatgtc gcacacacac acacacacac acacacacac acacacacac	120
	gattcaacaa ataagtgatg agttcaaaca tggggttctc tcaactcaaa ctgtgctctt	180
	<210> 7	
	<211> 170	
10	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 7	
	ctaaaatctt ttgttaagct cctcctaaac tgaactttca aagctctaaa atcttttgtt	60
	aagctcctcc agtgaatctt catttcagat actgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg	120
	tgtgtgtacc aactgaatat atatattcag ctttgaaagt tcagtttagg	170
	<210> 8	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Sintético	
20	<400> 8	
	ggatctctga ggctgcacat 20	
	<210> 9	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Sintético	
	<400> 9	
	gaaagtcttt gatgagatac 20	
30	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador Sintético	
	<400> 10	
	acacacatgc acgctctctc 20	

	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador Sintético	
	<400> 11	
	aagagcacag ttggagtga	20
10	<210> 12	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Sintético	
15	<400> 12	
	taaagtcaa atttatgat ggg	23
20	<210> 13	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Sintético	
	<400> 13	
	ctgtgattga aacaaagaca cct	23
25	<210> 14	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador Sintético	
	<400> 14	
	ctaaaatctt ttgtaagct cct	23
35	<210> 15	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Sintético	
	<400> 15	
40	cctaaactga actttcaaag ct	22
45	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Sintético	
	<400> 16	
	tccatggata cggagagctg	20
50	<210> 17	
	<211> 20	

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador Sintético

 5 <400> 17
 tgatggcacc acaacctatgc 20

 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador Sintético

 <400> 18
 tcaggacct cctcatcatc 20

 15 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Cebador Sintético

 <400> 19
 cgggatctct tctccacaga 20

 <210> 20
 <211> 25
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador Sintético

 <400> 20
 30 tccttattt tccttacagg gtttc 25

 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> Cebador Sintético

 <400> 21
 caatgaacag ccatgtccac 20

 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador Sintético

 45 <400> 22
 aggaaatgct ggcatagac 20

 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador Sintético

<400> 23
ctgctctatg ccagcatttc 20

5 <210> 24
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador Sintético

<400> 24
aaaagtctgc tggctgcct ac 22

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para identificar un sujeto humano como un portador de un alelo de duplicación de *SMN1* que comprende:

(a) analizar un ácido nucleico de una muestra de un sujeto humano determinando

- 5 (i) la identidad del nucleótido correspondiente a la posición 11678 de la SEQ ID NO: 1; o
- (ii) la identidad del nucleótido correspondiente a la posición 15774 de la SEQ ID NO: 1; o
- (iii) la identidad del nucleótido correspondiente a la posición 22804 de la SEQ ID NO: 1; o
- (iv) la identidad del nucleótido correspondiente a la posición 26190 de la SEQ ID NO: 1; o
- 10 (v) la identidad del nucleótido correspondiente a la posición 27134 de la SEQ ID NO: 1, o
- (vi) si se ha deleciónado el dinucleótido A-T correspondiente a las posiciones 27706-27707 de la SEQ ID NO: 1; y

(b) identificar al sujeto humano como un portador de un alelo de duplicación de *SMN1* si

- 15 (i) el nucleótido correspondiente a la posición 11678 de la SEQ ID NO: 1 no es G o hay un nucleótido insertado entre los nucleótidos correspondientes a las posiciones 11678 y 11679 de la SEQ ID NO: 1;
- (ii) el nucleótido correspondiente a la posición 15774 de la SEQ ID NO: 1 no es G o hay un nucleótido insertado entre los nucleótidos correspondientes a las posiciones 15774 y 15775 de la SEQ ID NO: 1;
- (iii) el nucleótido correspondiente a la posición 22804 de la SEQ ID NO: 1 no es G o hay un nucleótido insertado entre los nucleótidos correspondientes a las posiciones 22804 y 22805 de la SEQ ID NO: 1;
- 20 (iv) el nucleótido correspondiente a la posición 26190 de la SEQ ID NO: 1 no es A o hay un nucleótido insertado entre los nucleótidos correspondientes a las posiciones 26190 y 26191 de la SEQ ID NO: 1;
- (v) el nucleótido correspondiente a la posición 27134 de la SEQ ID NO: 1 no es T o hay, al menos, un nucleótido insertado entre los nucleótidos correspondientes a las posiciones 27134 y 27135 de la SEQ ID NO: 1; o
- (vi) está deleciónado el dinucleótido A-T correspondiente a las posiciones 27706-27707 de la SEQ ID NO: 1.

25 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el sujeto humano se identifica como un portador de un alelo de duplicación de *SMN1* basándose en la presencia de una estructura de nucleótido seleccionada del grupo que consiste en una T correspondiente al nucleótido en la posición 11678 o 11679 de la SEQ ID NO: 1, una A correspondiente al nucleótido en la posición 15774 o 15775 de la SEQ ID NO: 1, una A correspondiente a la posición 22804 o 22805 de la SEQ ID NO: 1, una G correspondiente al nucleótido en la posición 26190 o 26191 de la SEQ ID NO: 1, una G correspondiente al nucleótido en la posición 27134 o 27135 de la SEQ ID NO: 1 y una deleción AT correspondiente a los nucleótidos en las posiciones 27706-27707 de la SEQ ID NO: 1.

3. Un procedimiento para identificar un portador silencioso humano (2+0) de Atrofia Muscular Espinal (AME) que comprende:

(a) analizar un ácido nucleico de una muestra de un sujeto humano determinando

- 35 (i) la identidad del nucleótido correspondiente a la posición 27134 de la SEQ ID NO: 1, o
- (ii) si se ha deleciónado el dinucleótido A-T correspondiente a las posiciones 27706-27707 de la SEQ ID NO: 1; y

40 (b) identificar un individuo como un portador silencioso (2+0) de AME si el nucleótido correspondiente a la posición 27134 de la SEQ ID NO: 1 no es una T o si está deleciónado el dinucleótido A-T correspondiente a las posiciones 27706-27707 de la SEQ ID NO: 1, o ambas cosas.

4. El procedimiento según la reivindicación 3 que comprende:

- (a) determinar la identidad del nucleótido correspondiente a la posición 27134 de la SEQ ID NO: 1;
- (b) determinar además si se ha deleciónado el dinucleótido A-T correspondiente a las posiciones 27706-27707 de la SEQ ID NO: 1; y
- 45 (c) identificar un individuo como un portador silencioso (2+0) de AME si el nucleótido correspondiente a la posición 27134 de la SEQ ID NO: 1 es G o si está deleciónado el dinucleótido A-T correspondiente a las posiciones 27706-27707 de la SEQ ID NO: 1.

5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la identidad del nucleótido correspondiente a la posición 27134 de la SEQ ID NO: 1 y las identidades de los nucleótidos correspondientes a las posiciones 27706 y 27707 de la SEQ ID NO: 1 se determinan mediante polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción.

6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que se identifica una G en la posición correspondiente a la posición 27134 de la SEQ ID NO: 1 por polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción utilizando la endonucleasa de restricción HpyCH4III.

Figura 1

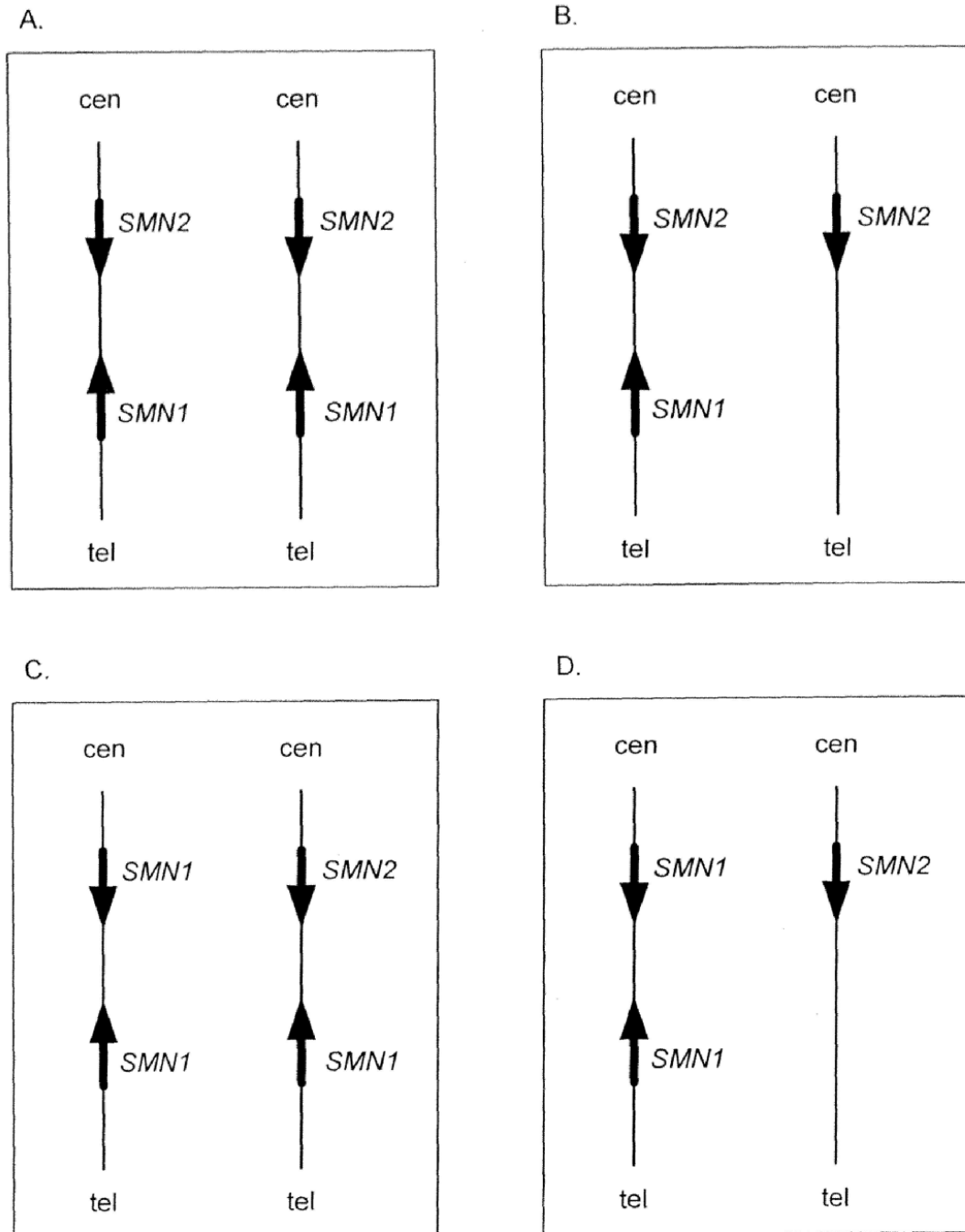


Figura 2

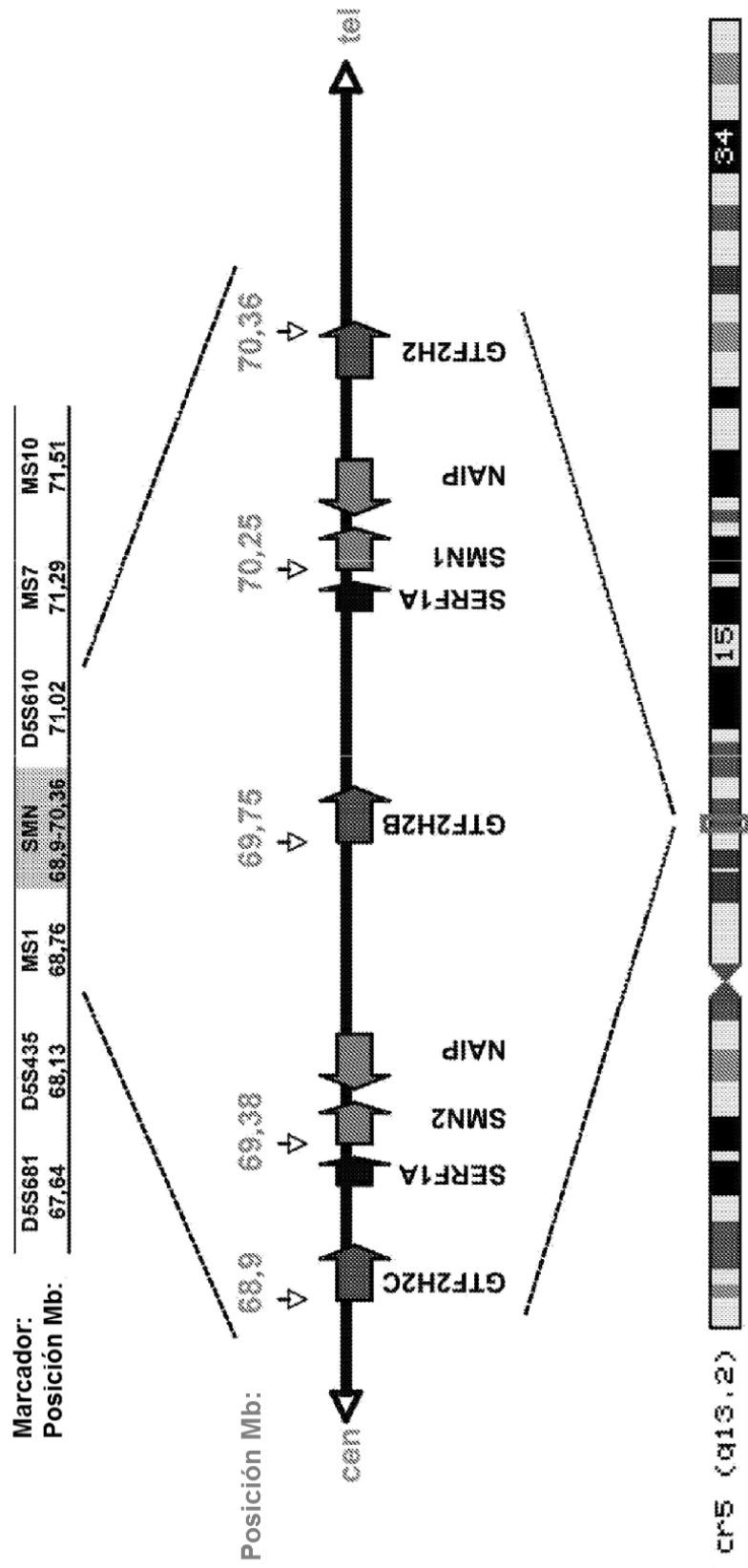


Figura 3A

```

rs 4916, C en SMN1/T en SMN2
*
26972 TTTTAACT TCCTTAATT TCCTTACAGS GTTTCAGCA AAACAANA GAGGAGGT SCTCKAATC CTTAAKTA GGNCTAAGTC TGCCAGCAAT
AAAAATTGA AGGAATAA AAAAGATGCC CAAAGCTGT TTATGTTTT CTTCTTCCA GAGATGAGS GAATTAAT CACTATCAG ACGGTCGTAA
*****
SMN1-E7F
Exon 7
g.27134T>G
*
27072 ATGAAAGCA ATCTACTTT TGTAAACTT TATGTTTT GSAACAAA TGTTTTGA CATTAAAA GTTCAGATG TAAAGTTG AAGGTTTAT
TACTTTCACA TAGAATGAA ACAATTGAA ATACCAACA CCTTTTCTT ACAAAACTT GTAAATTTT CAGTCTACA ATTTTTCAC TTTCANATA
* ***
HpyCH4III
27172 GTAAACAAT CAATATATA GAATTTGAT CCCAAACTA TTAGATAAA GGTAACTCA CATCCCTACT AGAATCTCA TACTTAACTG GTTGCTTAG
CAATTTGTTA GTTATAATTT GTTAAACTA CGTTTTGAT AATCTAATTT CCAATTAGT GTAGGAGTA TCTTAAAGAT ATGAATTGAC CAACCAATC
27272 TGGAGAAC ATACTTTCAC AATAGAGC TTATAGAT ATCCCAAT TTATACTA GTAGGAGAC CAGGAGACT TTTTTATT TGNATGGA
ACCTCTTTG TATGAAAGTG TTAATCTCG AAATCTATA CTACGGTAA ATATAGTAT CACTGCTCG GTCTCTGAA AAAAATAAC ACTATACCT
*****
SMN1-I7R1
27372 TAACCAGGC ATACTGACT GTACACTCG ACATAGAG TGCTCTAGT AAGTTAAT GGTGCCCA GAGGCAATG TTACTGGA ATGCTAAG
ATTGGATCG TATGAGTGA CATGAGAC TGTATACTC ACSAGATCAG TTCAATTA CCACAGGTGT CTCCTGTACC AAATTTGACCT TAAGCACTTC
*****
SMN1-I7F2
27472 CCTCTGTTT TAAFTTCTA TTTCAGGAA ATGTTGCTAT AGGAGAGC AATAGAGC CACTAAGA AGATAGAC AGATGGA TGTGAGCTG
GGAGACCAAG ATTAAAGAT AAACCTCTT TACAGCTCA ATCTCTCTG ATTACTGAG GTATTTCT TCTATGCTG TCAAGCTT ACATCTCCA
*****
Exon 8
SMN1-E8Ra
27572 TATAGAGAT AACGGGCTC ATTTCTTCA ATATCAAT GTTGGAGAG AAAAAGAA GTGCAATGG TAACTTTCT TCAATAAA TATATATAA
ATATCTTCA TTGAGGGAG TAAAGAGTT TAAATCTA CAGCCTTC TTTTTCTT CACTTACCC ATTSAGAA ACTAATTTTC AATACATAT
*****
g.27706_27707delAT
**
27672 ACCAAATCA ATGTGAATA TTATAGGCA CHTCTTTTG AAAACCTTC TGTAAAGC TGGGTGGG GTGGAGGCC ACGAGGCTG TGGGGCAAT
TGGTTACCT TACACTTAT AAATGACCT CAGAAAAC TTTTGTGAG ACATTTTTC ACCCCCTCC CAGCTCCGC ACTCCCTCA
*****
27772 GAGAAATTT GAATGCGAT TACATTTCA ATGATATG ATATATAT GTATTTAT CAGCTGAG AAGGCTGTC TACTTATA AAGCTGTCT
CTTTTAA CTGACCTTA ACTAATCT TACTTATG TATATAT CATTAAATA GTGCACTC TTGCACAC ATGATAT TCTGAGGA
*****
27872 TAAATGGAT ACTAAGCAT TTAGATCA AGCTTAGG TACTTAAA TGTWCAAT GTWTAACA AATATGTC AGGCTATCT GCAAAATGT
ATTAAACCTA TGAATCTGA AATCTTACT TCAATCTC ACAGATTTT ACAAGTTTA CCAATTTCT TTACATCAC TCCCTATCA CCGTTTACA
*****
27972 TACAGATCT AACCTGCA CAGCTGCTT CATTCTACT TTTTTCTA TCTCTATAT GTTAAACT GTTAAATA AATATTAAT TTTTTTAAA
ATGCTTGA TTGACGCTT CAGCCGAAA GAAATGATC AAAAAGAT AGAGATAA GAATTTCA TATATATT TTAATAATA AAAAATAAT
*****
SMN1-E8R

```

Figura 3B

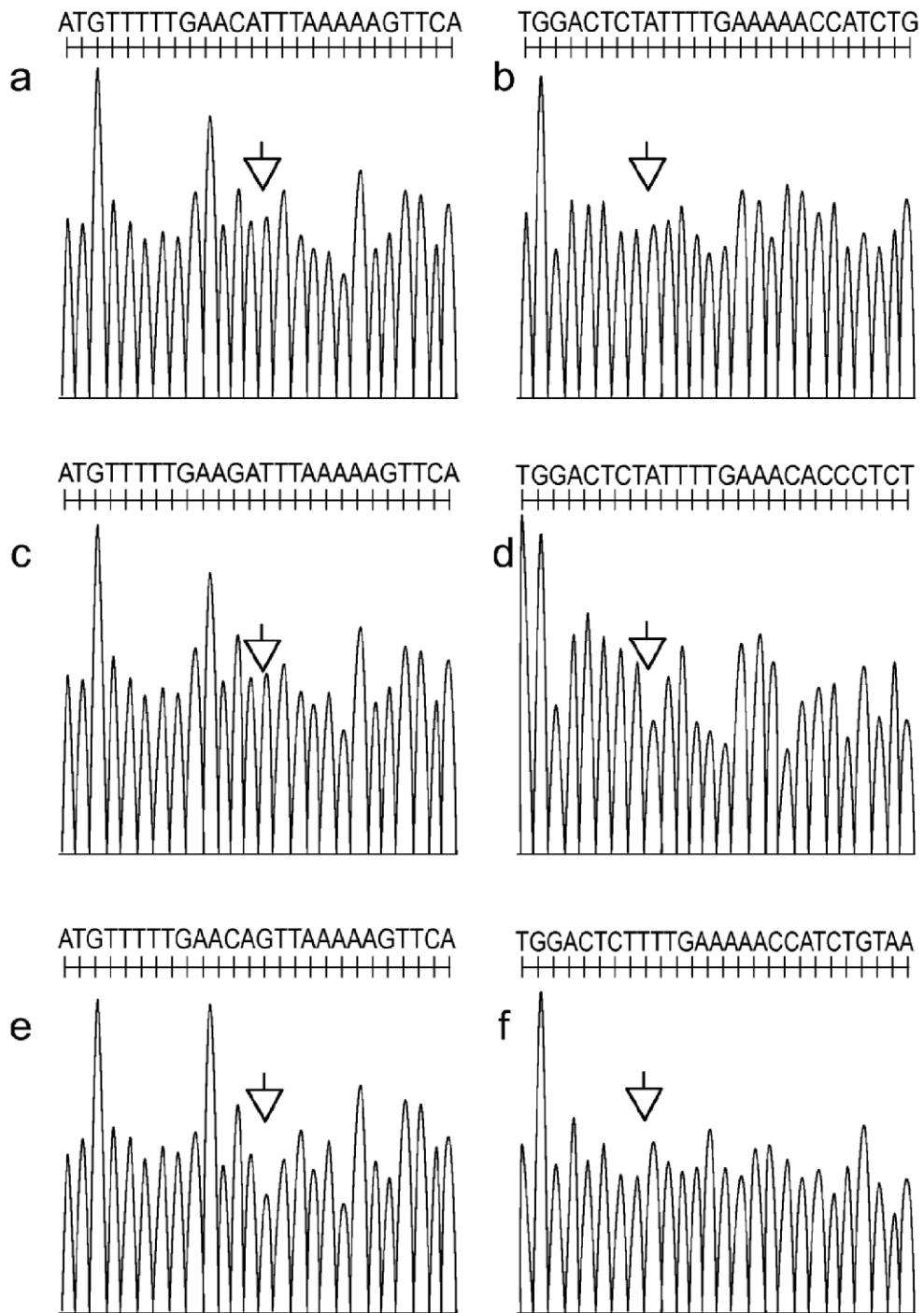


Figura 3

C

hpyCH4III

...ACNG*T...

...TGNC*A...

