

**OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE ANÁLISIS DE
FRAGMENTOS PARA EVALUAR LOS EVENTOS DE *SPLICING*
DEL GEN *BRCA2***

Paula Fernández Gómez

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

Tutor académico: Ricardo Román Cordero Otero

En cooperación con: Unidad de Consejo Genético en Cáncer del Hospital Universitario
Sant Joan de Reus

Supervisora de prácticas: Bárbara Roig Bourgine

Reus, junio del 2022

Jo, “Paula Fernández Gómez”, amb DNI “39952429A”, sóc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueixen cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, juny de 2022



ÍNDICE

Abstract.....	4
Resumen.....	4
Introducción.....	5
Hipótesis.....	16
Objetivo.....	16
Materiales y métodos.....	16
Resultados y discusiones.....	20
Conclusiones.....	24
Agradecimientos.....	24
Bibliografía.....	24
Autoevaluación.....	28
Información complementaria.....	29

ABSTRACT

Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) syndrome is an inherited genetic condition mostly caused by variants in the *BRCA1* and *BRCA2* genes, although other genes can also occur. Genetic testing is recommended for people who have a family history of these types of cancers.

The *BRCA1* and *BRCA2* genes play a fundamental role in DNA repair and cell cycle control, therefore, any affectation in any of these processes can trigger the variant to end up being pathogenic. Specifically in *BRCA2*, genetic alterations have been described that are located in the exon-intron junction zones and that can affect the correct transcription of the gene and consequently the normal functionality of the protein. These are called genetic variants of the splicing type (mRNA maturation process in which all introns are eliminated). However, each gene can give rise to several different RNA molecules thanks to alternative splicing.

For this reason, computational studies are needed to predict the pathogenic effect of variants and identify them in the splicing process. The most standardized are mRNA sequencing and analysis of fragments generated from this mRNA.

Keywords: BRCA1, BRCA2, splicing, HBOC, MLPA, fragment analysis, VUS, hereditary cancer

RESUMEN

El síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (HBOC) es una afección genética hereditaria mayoritariamente causada por variantes en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, aunque también puede suceder otros genes. Se recomiendan realizar pruebas genéticas a las personas que tienen antecedentes familiares con este tipo de cánceres.

Los genes *BRCA1* y *BRCA2* juegan un papel fundamental en la reparación de ADN y en el control del ciclo celular, por lo tanto, cualquier afectación en alguno de estos procesos puede desencadenar que la variante acabe siendo patogénica. Específicamente en *BRCA2* se han descrito alteraciones genéticas que se localizan en las zonas de unión exón-intrón y que pueden afectar la correcta transcripción del gen y consecuentemente la funcionalidad normal de la proteína. Estas se llaman variantes genéticas de tipo *splicing* (proceso de maduración del ARNm el cual se eliminan todos los intrones). Sin embargo, cada gen puede dar lugar a varias moléculas de ARN diferentes gracias al *splicing* alternativo.

Por esta razón se necesitan estudios computacionales para predecir el efecto patogenico de variantes e identificarlas en el proceso de *splicing*. Las más estandarizadas son la secuenciación ARNm y el análisis de fragmentos generados a partir de este ARNm.

Palabras Clave: BRCA1, BRCA2, splicing, HBOC, MLPA, análisis de fragmentos, VUS, cáncer hereditario

INTRODUCCIÓN

Cuando una célula presenta alguna anomalía o ha envejecido, por lo general la célula muere. El cáncer surge cuando algo sale mal en este proceso, ocasionando que las células anormales se reproduzcan y las células viejas no perecen como debería suceder. A medida las células cancerosas se reproducen de forma descontrolada, eventualmente pueden superar en número a las células sanas, Esto hace que al cuerpo le resulte difícil funcionar de la manera que debería hacerlo. Estas células se desarrollan a raíz de múltiples cambios en su genética. Estos cambios pueden surgir a raíz de muchas causas diversas como: el estilo de vida y los genes que heredamos de nuestros padres, así como la exposición a ciertos agentes cancerígenos en el entorno (sustancias o elementos causantes de cáncer) pueden estar entre las causas. Y en muchos de los casos, no hay una causa que sea evidentemente atribuible.

Existen organismos internacionales y nacionales como la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) o la Sección de Cáncer Hereditario de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) que han establecido criterios clínicos de sospecha de síndromes hereditarios en cáncer, como el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (HBOC).

Tabla 1. Criterios de selección para la realización de estudios genéticos con pacientes con sospecha del HBOC, publicados por la sección del cáncer hereditario de la SEOM.

Independientemente de la historia familiar:

- Diagnóstico de cáncer de mama y ovario sincrónico o metacrónico
- Diagnóstico de cáncer de mama ≤ 40 años
- Cáncer de mama bilateral (el primer diagnosticado ≤ 50 años)
- Diagnóstico de cáncer de mama y ovario en el propio individuo
- Cáncer de mama triple negativo ≤ 60 años
- Cáncer de ovario epitelial de alto grado, no mucinoso (o de trompas de falopio o cáncer primario peritoneal)
- Antepasados con mutaciones fundadoras
- Detección de mutación somática en BRCA en cualquier tipo tumoral con una frecuencia alélica $> 30\%$
- Cáncer de mama metastático HER2-negativo para considerar a estos pacientes para una posible terapia con agentes inhibidores de la PARP.

Dos o más familiares de primer grado con alguna combinación de las siguientes características de alto riesgo:

- Cáncer de mama bilateral y otro cáncer de mama < 60 años
- Cáncer de mama < 50 años y cáncer de próstata o cáncer de páncreas < 60 años
- Cáncer de mama en hombre
- Cáncer de mama y cáncer de ovario
- 2 casos de cáncer de mama diagnosticados < 50 años

Tres o más familiares con cáncer de mama (al menos un pre-menopáusico) y/o cáncer de ovario y/o cáncer de páncreas o cáncer de próstata con un Gleason ≥ 7 .

SINDROME DEL CANCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO

Actualmente el cáncer de mama es la neoplasia más diagnosticada, además de la primera causa de muerte entre las mujeres de más de 64 años. Los principales factores de riesgo de padecer cáncer de mama son la historia familiar, la edad y los factores ambientales, aunque toda enfermedad oncológica tiene un origen multifactorial (Claus et al., 1998).

El 80-85% de casos de cáncer de mama son de origen esporádico, mientras que el 15-20% son considerados casos de agregación familiar. De estos, el 5-10% son síndromes hereditarios o germinales debido a que presentan variantes genéticas en genes asociados a cáncer. (Fig.1) (Nagy et al., 2004).

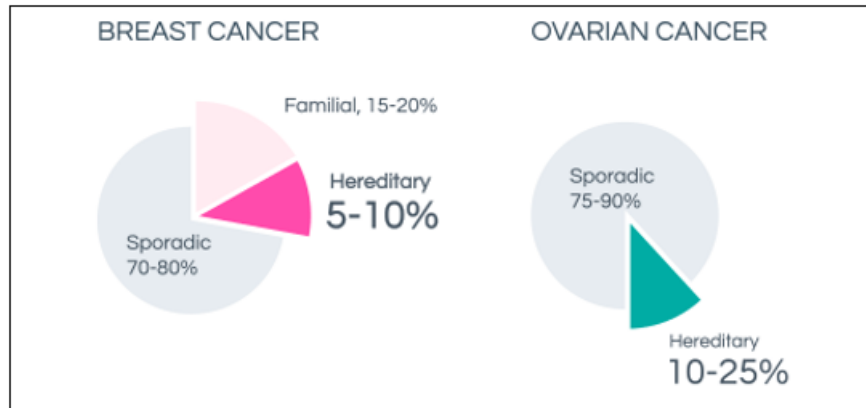


Figura 1. Distribución poblacional de los casos de cáncer. Macrogen. (n.d.). Retrieved May 12, 2022, from https://glo.macrogen.com/en/business/diagnosis_service1.php

El síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (HBOC) está asociado principalmente a la presencia de variantes patogénicas en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, que son genes de elevada penetrancia. En menor proporción, existe la presencia de variantes patogénicas en genes de moderada penetrancia como son: *ATM*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *TP53* y *STK11* (Fig.2).

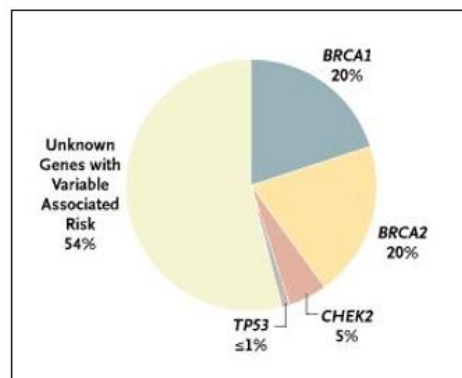


Figura 2. Genes implicados en el cáncer de mama y ovario hereditario (Gutmacher et al., 2009).

Se ha descrito que los individuos con variantes patogénicas en los genes *BRCA1* y *BRCA2* tienen un riesgo incrementado de padecer cáncer de mama, aunque en menor medida pueden padecer otros tipos de cánceres.

Tabla 2. Riesgo de malignidad en individuos con una variante patogénica de la línea germinal de *BRCA1* y *BRCA2* (Petrucci et al., 2022).

Tipo de cáncer	Riesgo de la población	Riesgo de malignidad	
	general	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>
Mama femenino	12%	46-87%	38-84%
Ovario	1-2%	39-63%	16-27%
Mama masculino	0.1%	1.2%	8.9%
Próstata	6% a partir de los 69 años	8.6%	15%
Melanoma	1.6%	---	Riesgo elevado

GENES *BRCA1* Y *BRCA2*

El gen *BRCA1* se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (17q21.31), está formado por 5592 nucleótidos distribuidos en 24 exones. Cabe destacar la longitud del exón 11 que contiene señales de localización nuclear. Este gen codifica para una proteína de 1863 aminoácidos y unos 220 kDa de masa *BRCA1* es una fosfoproteína que normalmente se encuentra en el núcleo (Fig.3). Sus dominios funcionales incluyen:

- Un dominio de dedo ANILLO cerca del N-terminal; puede facilitar las interacciones proteína-proteína (*BRCA1/BARD1*) y proteína-ADN.
- Dos señales de localización nuclear ubicadas en el exón 11.
- Un grupo "SQ" entre p.1280 y p.1524.
- Un dominio BRCT en el extremo C-terminal.

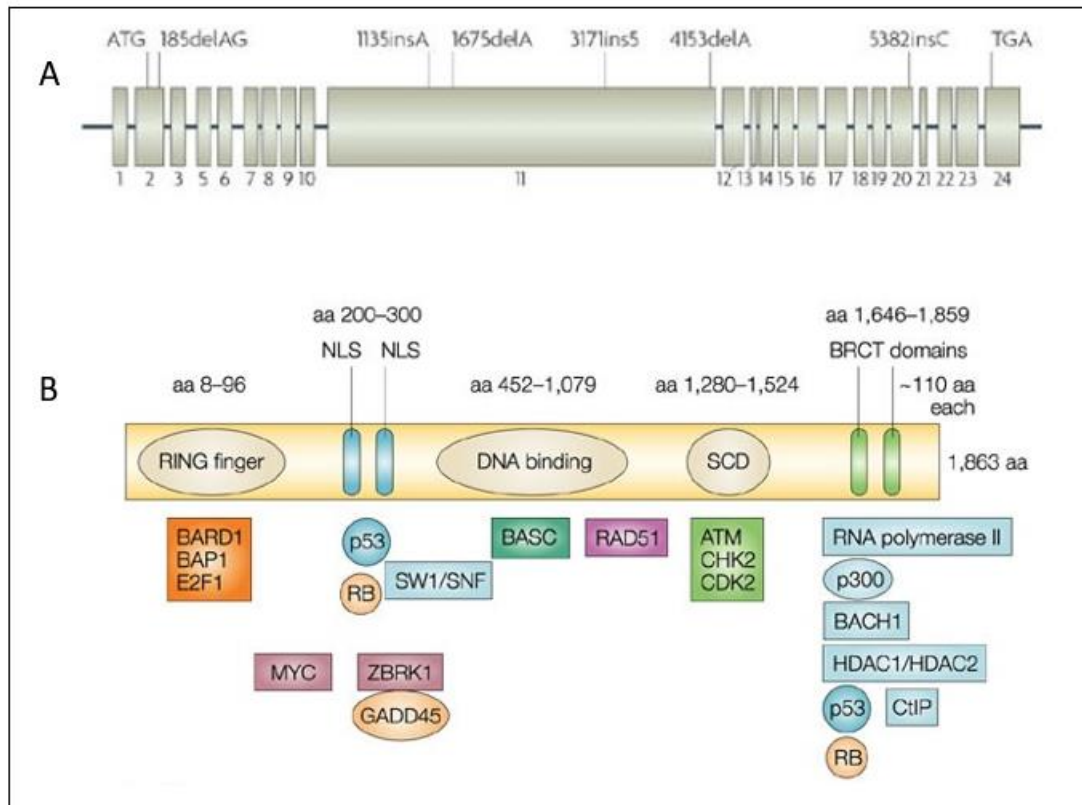


Figura 3. (A) Estructura del gen *BRCA1* (Fackenthal & Olopade, 2007). (B) Dominios del gen *BRCA1* (Narod & Foulkes, 2004).

El gen *BRCA2* se localiza en el brazo largo del cromosoma 13 (13q13.1), está formado por 11385 nucleótidos distribuidos en 27 exones de los cuales el primero no se traduce. Al igual que el gen *BRCA1*, *BRCA2* destaca la gran longitud de su exón 11, y en menor medida, la del exón 10. Este gen codifica para una proteína de 3418 aminoácidos y unos 348 kDa de masa. *BRCA2* es una fosfoproteína que normalmente se encuentra en el núcleo. La proteína *BRCA2* no tiene motivos proteicos reconocibles y no tiene una relación aparente con la proteína de susceptibilidad al cáncer de mama tipo 1 (Fig.4) (Petrucci et al., 2022).

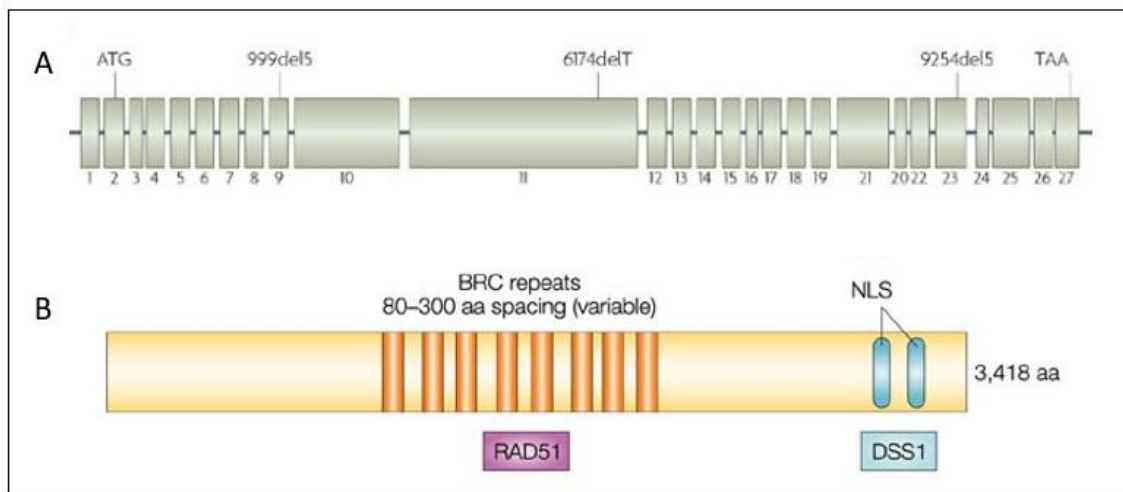


Figura 4. (A) Estructura del gen *BRCA2* (Fackenthal & Olopade, 2007). (B) Dominios del gen *BRCA2* (Narod & Foulkes, 2004).

BRCA1 y *BRCA2* son proteínas supresoras tumorales y dentro de sus funciones participan en la reparación del ADN a través de un mecanismo de recombinación homóloga (RH). Cuando se daña el ADN, ATM desencadena una cascada de reacciones que culminan en la fosforilación de *BRCA1* mediada por *CHK230*. Una vez fosforilado, *BRCA1* puede interactuar con *BARD1*, *RAD51* y *BRCA2* y participar en la recombinación homóloga. En este proceso, *RAD51* juega un papel importante en la unión a *BRCA2* a través de la repetición BRC y su dominio C-terminal. Una vez unidos, se localizan con *BRCA1* en regiones de ADN dañadas para formar un complejo de reparación de ADN.

Cuando esta vía no funciona correctamente, las brechas se reparan mediante un mecanismo propenso a errores, como la unión de extremos no homólogos (NHEJ), y los errores pueden conducir a reordenamientos cromosómicos. Como resultado, la inestabilidad cromosómica es una de las características clave de la carcinogénesis de estos genes. *BRCA1* juega un papel doble como activador de reparación recombinante homólogo e inhibidor de la reparación por unión de extremos no homólogos. Se ha observado que las células con variantes patogénicas en *BRCA1* o *BRCA2* son más sensibles a las radiaciones ionizantes y, por tanto, más propensas a sufrir errores en el proceso de reparación (Fig.5) (Wang et al., 2000).

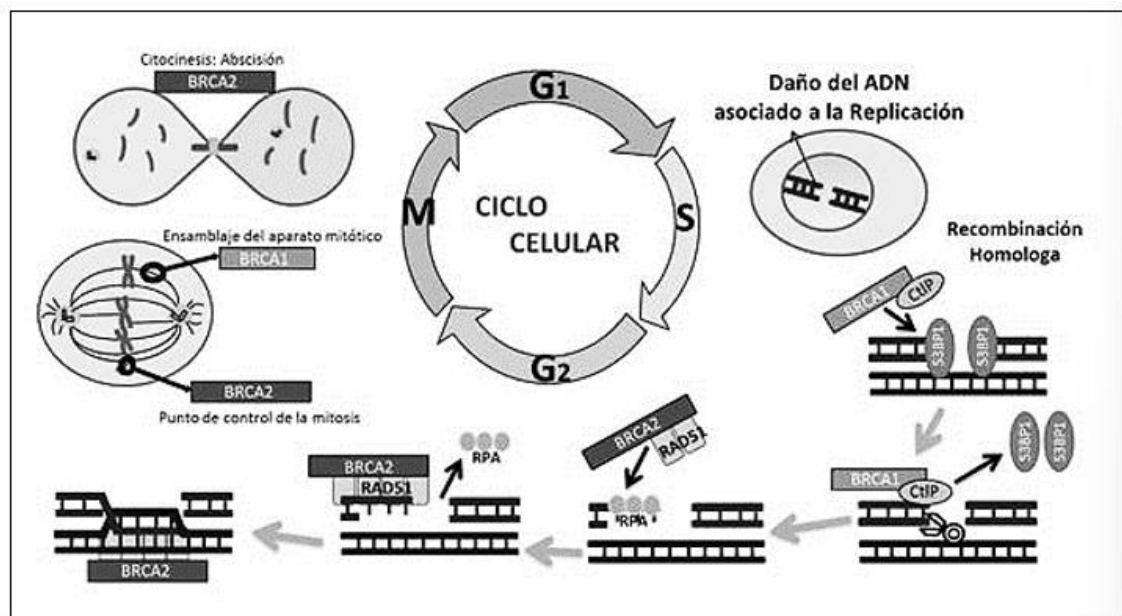


Figura 5. Funciones de los genes *BRCA1* y *BRCA2* (Orozco-Hernández et al., 2018).

En el ciclo celular existen diferentes puntos de control que verifican si hay errores en este proceso. Cuando se detecta un error, el ciclo se detiene para permitir que el dispositivo realice reparaciones. Si el error o fallo no se puede corregir, se activa el proceso de apoptosis y de muerte celular programada. En estos puntos de control, *BRCA1* interfiere a través del complejo proteico BASC. Otras proteínas forman parte de este complejo, como *NBS1* (*Síndrome de Nijmegen*), *RAD50-MRE11*, *ATM* (*Ataxia Telangiectasia*), *BLM* (*Síndrome de Bloom*), factor de replicación del ADN y complejo *MLH1-PMS1* y *MSH2* y *MSH6*. Sin embargo, si se alteran las proteínas clave del punto de control, como *p53* o *p21*, estas células experimentarán inestabilidad genómica, lo que hará que desarrollen anomalías importantes en el cariotipo (Zhang et al., 2004).

VARIANTES DE SPLICING EN LOS GENES *BRCA1* y *BRCA2*

Hasta la fecha se han descrito cientos de variantes genéticas en los genes *BRCA1* y *BRCA2* (Tabla 3). Por lo general, las alteraciones genéticas se pueden clasificar de diferentes maneras según: tamaño (*macromutaciones* o *micromutaciones*), tipos de alteración que produce en la cadena de nucleótidos (*puntuales*, *inserciones*, *deleciones*, *duplicaciones*, *inversiones*), fuente del mutágeno (*espontánea* o *inducida*) y su origen celular (*germinales* o *somáticas*).

Las alteraciones genéticas también las podemos clasificar según:

Su efecto en la proteína:

- Mutaciones *missense* → cuando se produce un cambio de aminoácido.
- Mutaciones *nonsense* → cuando se crea un codón stop.
- Mutaciones *frameshift* → cuando hay un cambio en la puerta de lectura.
- Mutaciones *in-frame* → cuando se eliminan o se inserta uno o más tripletes de codones.
- Mutaciones *silent* → cuando no se produce ningún cambio en la cadena de aminoácidos.

Su efecto en la funcionalidad de la proteína:

- *loss-of-function* → cuando hay una pérdida de función de la proteína.
- *hypomorphic* → cuando hay una reducción en la función normal de la proteína.
- *gain-of-function* → cuando se adquiere una nueva función molecular o un nuevo patrón de expresión génica.

Tabla 3. Variantes genéticas descritas de los genes *BRCA1* y *BRCA2*.

Tipo de mutación	Número de mutaciones del gen	
	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>
Missense/nonsense	813	943
Splicing	242	189
Regulatory	49	25
Small deletions	737	941
Small insertions	288	325
Small indels	44	51
Gross deletions	274	72
Gross insertions/duplications	57	22
Complex rearrangements	24	9
Repeat variations	1	0

Fuente extraída de la base de datos bioinformática HGMD (*The Human Gene Mutation Database 2022*)

Aproximadamente el 30-50% de las variantes detectadas en los genes *BRCA1* y *BRCA2* son variantes de significado incierto (VUS, del inglés *variants of unknown significance*) y tal y como su nombre indican se trata de variantes en las que se desconoce su significado biológico y clínico. Poder determinar la patogenicidad o no de estas VUS es un reto en la

actualidad. Por ello, y con el fin de poder clasificar estas variantes según su relevancia clínica, se han creado consorcios internacionales, como el consorcio *Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles* (ENIGMA).

Dentro de las VUS cabe destacar las variantes genéticas de tipo *splicing*, es decir variantes que se localizan en las zonas de unión exón-intrón y que pueden afectar la correcta transcripción del gen y consecuentemente la funcionalidad normal de la proteína.

Se han identificado algunas correlaciones genotipo-fenotipo en familias con variantes patogénicas en *BRCA1* y *BRCA2*. Los estudios en la población judía Ashkenazi han encontrado tasas más altas de cáncer de ovario en individuos con la variante patogénica c.68_69delAG, en el extremo 5' de *BRCA1*, en comparación con individuos con la variante c.5266dupC, que se encuentra en el extremo 3' del gen (Lux et al., 2006). Sin embargo, las variantes patogénicas de c.5266dupC parecen conferir un mayor riesgo de cáncer de mama, incluido el cáncer de mama bilateral y el cáncer de mama y de ovario en el mismo individuo en comparación con c.68_69delAG en *BRCA1* y c.5946delT en *BRCA2* (Satagopan et al., 2002).

Las variantes patogénicas del *BRCA2* se han asociado con el cáncer de páncreas familiar y con la anemia de Fanconi FANCD1. Además, las mutaciones en el gen *BRCA2* se asocian con un aumento del riesgo de cáncer de mama masculino y cáncer de próstata.

PROCESO DE *SPLICING*

La transcripción del ADN es el proceso por el cual se sintetiza el ARN correspondiente al ADN de un gen. Comienza cuando la ARN polimerasa se une a una secuencia llamada promotor cerca del inicio de un gen (directamente o a través de las proteínas auxiliares). La ARN polimerasa utiliza una de las cadenas de ADN (la cadena o hebra molde) como plantilla para hacer una nueva molécula de ARN complementaria. La transcripción finaliza en un proceso llamado terminación, que depende de secuencias que señalan el fin de la transcripción.

Estos transcritos de ARN pueden usarse como mensajeros para impulsar la síntesis de proteínas o participar en varios procesos celulares diferentes. Estos ARN funcionales o

no codificantes podrían ser ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosómico (ARNr) o regulación génica directa a través del ARN de interferencia (ARNi) y la formación de heterocromatina (Fig.6).

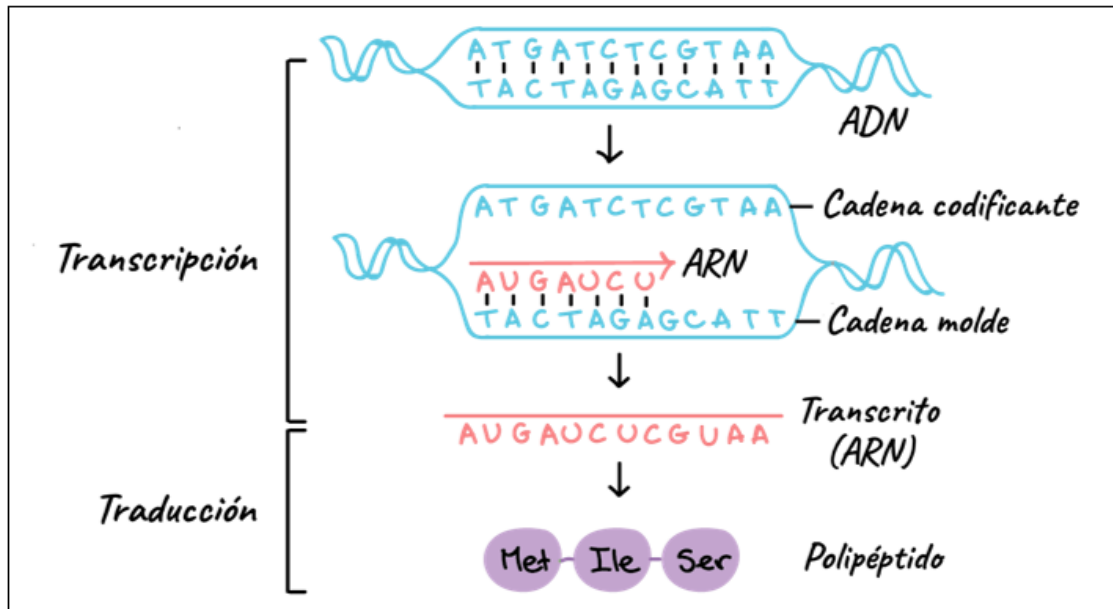


Figura 6. Esquema del proceso de transcripción. Etapas de la transcripción (artículo) | Khan Academy. (n.d.). Retrieved May 18, 2022, from <https://es.khanacademy.org/science/biology/gene-expression-central-dogma/transcription-of-dna-into-rna/a/stages-of-transcription>

El proceso de *splicing* o corte-empalme de ARN consiste en el procesamiento de un ARN mensajero precursor (ARNm) que se transforma en un ARN maduro mediante la eliminación de las secuencias no codificantes denominadas intrones. Tiene lugar durante o inmediatamente después de la transcripción dentro del núcleo en el caso de los genes codificados por el núcleo.

Concretamente, el *splicing* constitutivo es el proceso de eliminación de intrones y unión de exones en el orden que aparecen en un gen. En cambio, el *splicing* alternativo es una desviación de esta secuencia en la que se omiten ciertos exones, lo que da como resultado varias formas de ARNm maduro. Este proceso está mediado por una máquina macromolecular dinámica y flexible, el spliceosoma. Este proceso es sumamente complejo ya que existen diferentes tipos de *splicing* alternativo y en cada tipo están involucradas numerosas moléculas de manera coordinada (Fig.7).

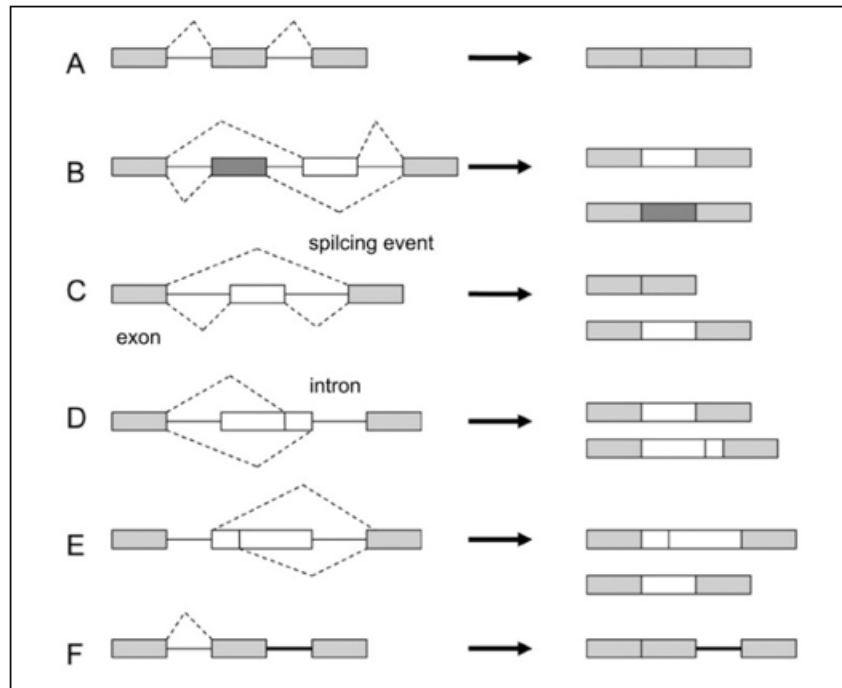


Figura 7. Se representan cinco tipos principales de eventos de splicing alternativo. (A) Empalme constitutivo; (B) exones mutuamente excluyentes; (C) casete de exón alternativo; (D) sitio de empalme 3' alternativo; (E) sitio de empalme 5' alternativo; y (F) retención de intrones (Wang, y et al 2015).

El ARNm maduro producido, está altamente definido por la interacción de diversos elementos. Los factores potenciadores ESE y ISE que actúan en cis se unen a factores positivos que actúan en trans, como las proteínas SR, mientras que los factores silenciadores ESS y los silenciadores de empalme intrónico están unidos por factores de acción negativa, como hnRNP. Por lo tanto, hay un regulación de todos estos factores, ahora bien, en diferentes experimentos, se ha encontrado que un ESE actúa como un ISE dependiendo de su ubicación en un exón o intrón. Este hecho podría causar una patología. Concretamente el cáncer es una de esas enfermedades en las que el *splicing* alternativo puede ser la base para la identificación de nuevos biomarcadores de diagnóstico y pronóstico, así como nuevas estrategias de terapia (Wang et al., 2015).

Los estudios computacionales (análisis *in silico*) son una aproximación muy utilizada para adivinar el efecto de variantes sobre el proceso de variantes de *splicing* del ARNm. También los análisis *in vitro* del ARNm permiten identificar aquellas variantes que afecta a este proceso. Dentro del grupo de técnicas para el análisis del ARNm las más estandarizadas son la secuenciación ARNm y el análisis de fragmentos generados a partir de este ARNm.

HIPÓTESIS

El análisis de fragmentos de ARNm permite determinar de manera semicuantitativa la posible patogenicidad fenotípica de variantes de *splicing* en el gen *BRCA2* de pacientes con HBOC.

OBJETIVO

Variantes genéticas localizadas en regiones intrónicas pueden afectar el proceso de *splicing* y generar transcritos aberrantes. La técnica de análisis de fragmentos es una técnica semicuantitativa complementaria que permite ayudar a determinar la posible patogenicidad de estas variantes en el individuo. El objetivo principal del trabajo es optimizar la técnica de análisis de fragmentos para ayudar a determinar el grado de patogenicidad de variantes de *splicing* identificadas en el gen *BRCA2*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se ha centrado en la optimización y el análisis semicuantitativo de dos VUS con probable efecto de *splicing* identificadas en el gen *BRCA2* de pacientes con HBOC.

1. NM_000059.3: c.8632+2T>G (p.?) localizada en el intrón 20
2. NM_000059.3: c.8755-11A>G (p.?) localizada en el intrón 21

La técnica de análisis de fragmentos es un método semi cuantitativo que consiste en diferentes etapas cada una de las cuales se ha tenido que optimizar para este estudio.

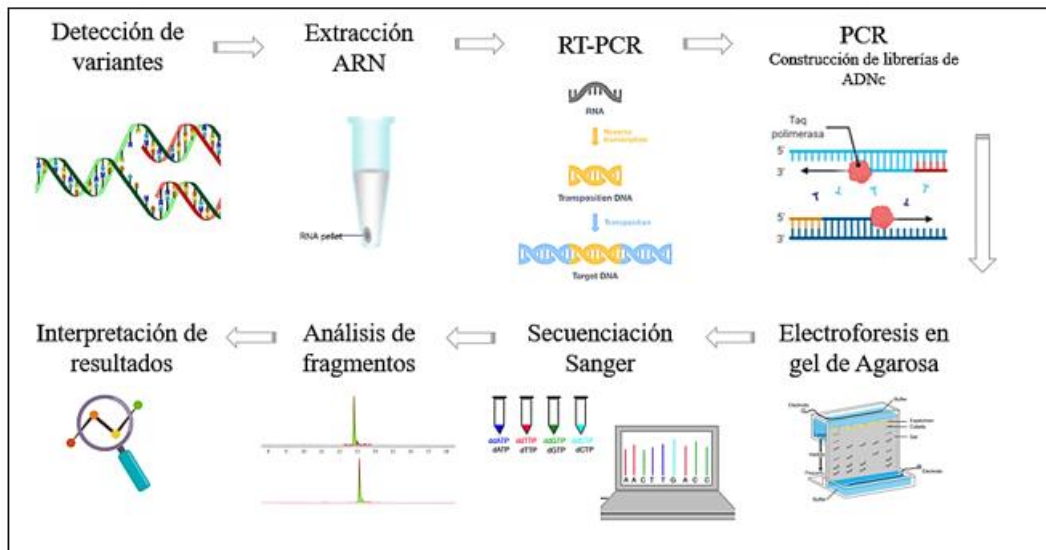


Figura 8. Diagrama de flujo sobre los materiales y métodos.

1. EXTRACCIÓN DE ARN DE SANGRE PERIFÉRICA

Se extrajo ARN total a partir de sangre periférica extraída de los dos pacientes con HBOC portadores de las variantes del presente estudio. Esta extracción se realizó con el kit PAXgene Blood RNA kit de Qiagen siguiendo las indicaciones del fabricante.

Como controles negativos de la técnica se extrajo ARN de sangre periférica de individuos no portadores de variantes patogénicas en los genes *BRCA1* y *BRCA2*.

2. CALIDAD Y CUANTIFICACIÓN DEL ARN

Se analizó la calidad y la cantidad de los ARN totales extraídos con el kit RNA QuantusTM Fluorometer de Promega siguiendo las instrucciones del fabricante. (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de la cuantificación de ARN de las muestras.

ARN	Concentración (ng/uL)
Paciente 1	381
Paciente 2	444
Control negativo 1	189
Control negativo 2	176
Control negativo 3	162

3. RT-PCR

5 ng de cada uno de los ARN extraídos se retrotranscribió a ADNc. Para este proceso se usó el kit SuperScript II RT Transcriptasa Kit de Invitrogen siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cebadores utilizados fueron Random Hexamer y la AmpliTaq Gold Enzyme de Applied Biosystems. La reacción se realizó en un termociclador SimpliAmp (Life Technologies). El ADNc obtenido se cuantificó con el kit ssDNA QuantusTM Fluorometer de Promega.

4. PCR

Se amplificaron por PCR los ADNcs de los 2 pacientes portadores de las variantes de *splicing* y 3 ADNcs controles. Para la amplificación de ADNc se utilizaron varias combinaciones de cebadores (Fig.9) y Tabla 5. Los cebadores antisense han sido marcados con un fluoróforo (FAM), con el fin de poder utilizarlos en electroforesis capilar (Anexo 3).

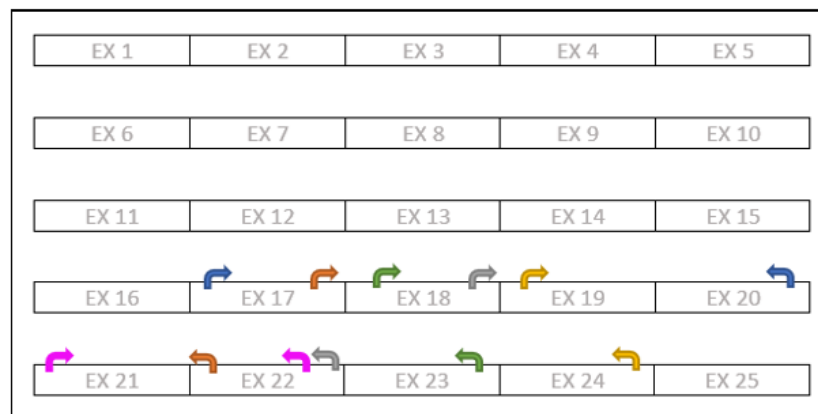


Figura 9. Esquema de las combinaciones de primers realizadas. Cada color asigna un combinación (17-20), (17.2-22), (18-23), (18-22), (19-24), (21-22).

Tabla 5. Secuencia nucleotídica de cada primer. Correlacionado con la Figura 9.

OLIGO	μM	SECUENCIA (5'-3')	T° ANNELING (°C)	Δpb
17s	45.87	GATGCCTAAGCCCAGAAAGG	59	643
20a	29.23	TTGTTGGGCCTCCACATATT	57	
17.2s	48.71	GGTGTGGATCCAAAGCTTATTT	56.5	957
22a	30.64	CTCTTAAGTCTTCACTG	57	
18s	43.27	GAAGCCCCAGAATCTCTTATG	58	748
23a	29.85	CTTTTAGATTTTGAAGTTGCAAGATG	58	

19s	38.6	CATCGCTTTTCAGTGATGGA	55	739
24a	53.37	CCGTGGCTGGTAAATCTGA	58	
18s	43.27	GAAGCCCCAGAATCTCTTATG	58	478
22a	30.64	CTCTTAACTGCTCTTCACTG	57	
21s	45.31	AGTTCGTGCTTTGCAAGATG	55.25	321
22a	30.64	CTCTTAACTGCTCTTCACTG	57	

Para este estudio, se logró optimizar la amplificación por PCR de dos amplicones diferentes formados por la combinación de *primers*: 21s-22a y 18s-22s.

Las PCRs se realizaron a partir de 2 μ L de ADNc (50ng) usando la enzima Fast Start Taq DNA polimerasa de Roche y una concentración final de cebadores de 5 pmol/ μ L. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador SimpliAmp (Life Technologies), siguiendo el siguiente el programa: una fase inicial de desnaturalización a 95°C durante 10 min, 40 ciclos de amplificación a 94°C durante 30 s, unión del cebador a 58°C durante 30 s y una extensión a 72°C durante 1 min. La fase final de extensión es de 72°C durante 5min.

Todas las amplificaciones se han comprobado con una electroforesis en gel de agarosa en una concentración del 1.5-2% (p/v).

5. ANALISIS DE FRAGMENTOS POR ELECTROFORESIS CAPILAR

Todos los productos amplificados fueron analizados por electroforesis capilar en el secuenciador automático SeqStudio de Life Technologies.

Los amplicones se cargaron en una placa de 96 pocillos con una mezcla formada por 20 μ L de formamida y 2 μ L del marcador size standard GeneScan 500 Liz (250) G5 de Life Technologies. La mezcla fue sometida a una desnaturalización previa a 86°C durante 3 min y 4°C durante 2 min con la tapa abierta. Posteriormente se cargó la placa en el secuenciador SeqStudio con un protocolo de electroforesis estándar a 60°C, inyección de 15 segundos a 1.6 kV y una carrera de 1800 segundos a 15kV.

Posteriormente los resultados obtenidos se analizaron con el programa GeneMapper 4.0, que representa los datos de forma visual en un electrofluorograma, donde las abscisas representan el tamaño de los fragmentos

en nucleótidos y las ordenadas la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias.

6. SECUENCIACIÓN SANGER

Se amplificaron los ADNcs de las muestras con *primers* no marcados y que delimitan los exones 20 y 24 del gen *BRCA2*. Los *primers* utilizados fueron:

- *BRCA2* 20F: 5' GGAAGAAAAGGAAGCAGCAA 3'
- *BRCA2* 24R: 5' CCTCAGAACAAGATGGCTGAAAG 3'

Los amplicones fueron purificados con el kit ExoSTAR Pro (Life Technologies) y secuenciados con Big Dye Terminator v3.1 (Life Technologies) en el secuenciador automático SeqStudio.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

PACIENTE CON LA VARIANTE c.8632+2T>G

Según los programas de predicción *in silico* la variante c.8632+2T>G identificada en heterocigosis tiene un posible efecto deletéreo del proceso normal de *splicing* de *BRCA2*. Al inicio del exón 20 de la secuencia de referencia se encuentra la zona de donador de *splicing* que en la secuencia mutada no está (Fig.8).

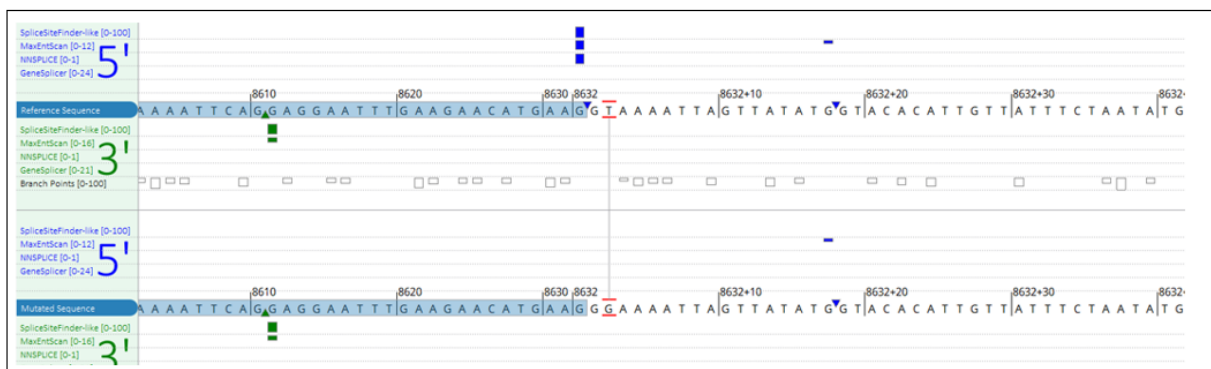


Figura 8. Predicción *in silico* de la VUS c.8632+2T>G por Alamut Visual Plus™.

Con el fin de confirmar estas predicciones bioinformáticas se secuenció el ADNc. Los resultados de la secuenciación del ADNc no muestran alteración de la secuencia, debido a que el amplicón optimizado abarca desde el exón 20 al 24. Al ser una variante en heterocigosis que se localiza en el intrón 20 no podemos descartar que el *splicing* afecte al exón 20 y que el amplicón secuenciado corresponde a la secuencia *wild type* exclusivamente (Fig.9).

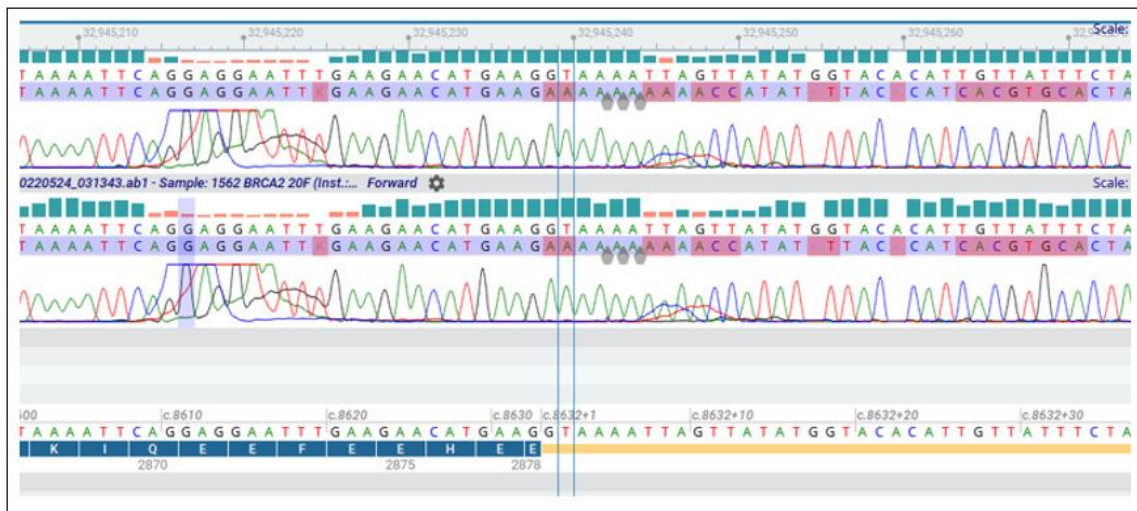


Figura 9. Secuenciación del ADNc de la VUS c.8632+2T>G por Alamut Visual Plus™.

En la Figura 10 se muestra los resultados del análisis de fragmentos del paciente 1 (A) y el control (B). Tanto en el paciente como en el control observamos un pico FL (del inglés *full length*) que corresponde a la isoforma *wild type* esperada. No obstante, en el paciente encontramos ... CONFIDENCIAL.

(Fig.10) CONFIDENCIAL

A pesar de que la secuenciación del ADNc no nos ha proporcionado la información necesaria para determinar la isoforma. Por la técnica complementaria del análisis de fragmentos hemos podido confirmar que la variante tendrá efectos patogénicos a nivel de *splicing* (Fig.11).

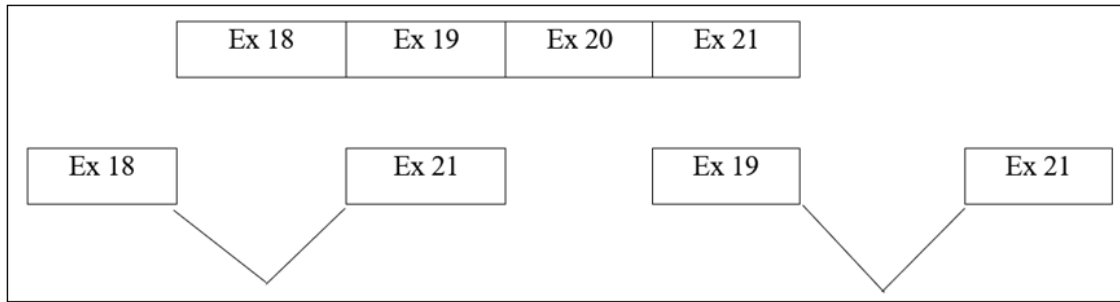


Figura 11. Isoforma de la primera variante *splicing* alternativo de BRCA2 que incluyen sitios de donador-aceptor de *splicing* críptico.

En conclusión, los resultados muestran que la variante c.8632+2T>G identificada en heterocigosis en el gen *BRCA2* corroboran su efecto patogénico en el paciente con HBOC.

PACIENTE CON LA VARIANTE c.8755-11A>G

Según los programas de predicción *in silico* la variante c.8755-11A>G identificada en heterocigosis tiene un posible efecto deletéreo del proceso normal de *splicing* de *BRCA2*. En el intrón 21 de la secuencia mutada se encuentra la zona de receptor de *splicing* que en la secuencia de referencia se encuentra *upstream* (Fig.12).

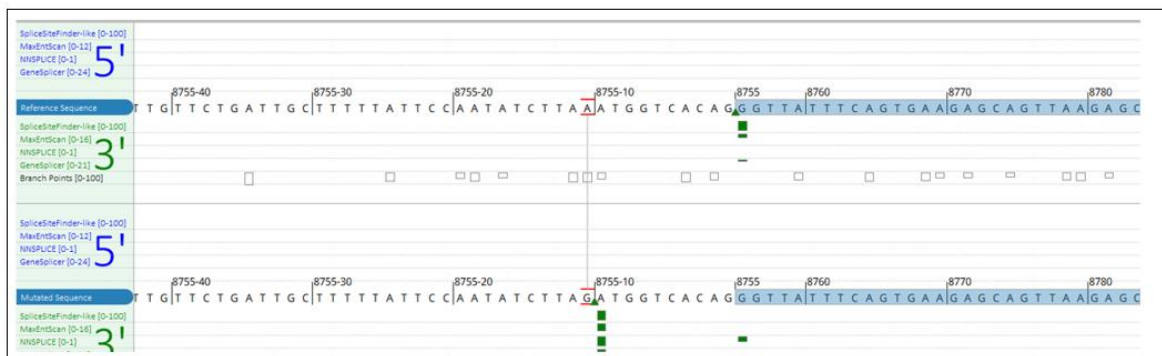


Figura 12. Predicción *in silico* de la VUS c.8755-11A>G por Alamut Visual Plus™.

Con el fin de confirmar estas predicciones bioinformáticas se secuenció el ADNc. El electroferograma muestra una doble lectura de secuencias al inicio del exón 22, justo en el recuadro rojo. Esta doble lectura confirma que la variante c.8755-11A>G identificada en heterocigosis implica una ganancia del exón 22 durante el proceso de *splicing* por secuenciación (Fig.13).



Figura 13. Secuenciación del ADNc de la VUS c.8755-11A>G por Alamut Visual Plus™.

En la Figura 14 se muestra los resultados del análisis de fragmentos del paciente 2 (A) y el control (B). Tanto en el paciente como en el control observamos un pico FL (del inglés *full length*) que corresponde a la isoforma *wild type* esperada. No obstante, en el paciente encontramos ... CONFIDENCIAL.

(Fig.14) CONFIDENCIAL

En este caso, la secuenciación del ADNc si nos ha proporcionado la información necesaria para determinar la isoforma. Aunque gracias a la técnica complementaria del análisis de fragmentos hemos podido reafirmar que la variante tendrá efectos patogénicos a nivel de *splicing* (Fig.15).

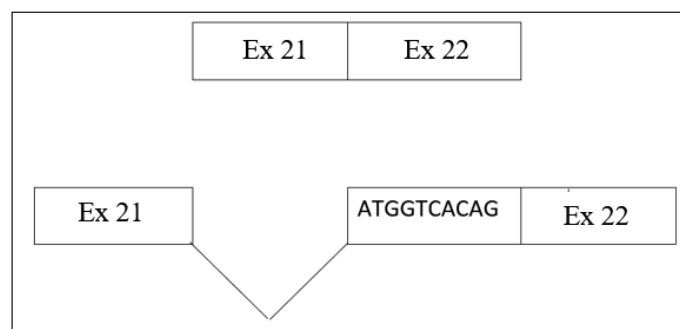


Figura 15. Isoforma de la segunda variante *splicing* alternativo de BRCA2 que incluyen sitios de donante-aceptor de *splicing* críptico.

En conclusión, los resultados muestran que la variante c.8755-11A>G identificada en heterocigosis en el gen *BRCA2* corroboran su efecto patogénico en el paciente con HBOC.

Tabla 6. Resumen de las VUS identificadas y analizadas.

VARIANTE DE SIGNIFICADO INCIERTO	NOMENCLATURA DE VARIANTES DE SECUENCIA	TAMAÑO DEL FRAGMENTO
$\Delta(E19_20)$	c.8632+2T>G (p.?)	178 pb
$\Delta(E20)$		334 pb
$\Delta(E22p10)$	c.8755-11A>G (p.?)	108 pb

CONCLUSIONES

La técnica de análisis de fragmentos es una técnica eficaz y complementaria a otras técnicas de cribado genético, como la secuenciación, para el estudio de VUS de *splicing*.

Determinar la cantidad acumulada de transcrito aberrante respecto al transcrito normal es necesario para poder clasificar el efecto patogénico de una VUS de *splicing*.

AGRADECIMIENTOS

Esta TFG es el resultado de varios meses de trabajo y aprendizaje. Quiero expresar mi agradecimiento, en primer lugar, a mi supervisora de prácticas, quien me otorgó el privilegio de poder compartir todos sus conocimientos y anécdotas conjunto a Marta Rodríguez. En segundo lugar, dar gracias a mi tutor de TFG por darme tan buenos consejos.

BIBLIOGRAFÍA

Orban, T. I., & Olah, E. (2003). Emerging roles of BRCA1 alternative splicing. *Molecular Pathology*, 56(4), 191. <https://doi.org/10.1136/MP.56.4.191>

Toss, A., Venturelli, M., Molinaro, E., Pipitone, S., Barbieri, E., Marchi, I., Tenedini, E., Artuso, L., Castellano, S., Marino, M., Tagliafico, E., Razzaboni, E., de Matteis, E., Cascinu, S., & Cortesi, L. (2019). Hereditary Pancreatic Cancer: A Retrospective Single-Center Study of 5143 Italian Families with History of BRCA-Related Malignancies. *Cancers* 2019, Vol. 11, Page 193, 11(2), 193. <https://doi.org/10.3390/CANCERS11020193>

Wang, y., Liu, j., Huang, b., Xu, y.-m., li, j., Huang, l.-f., Lin, j., Zhang, j., Min, q.-h., Yang, w.-m., & Wang, x.-z. (2015). Mechanism of alternative splicing and its regulation. *Biomedical Reports*, 3(2), 152–158. <https://doi.org/10.3892/BR.2014.407>

Orozco-Hernández, J. P., Stiven Marín-Medina, D., Martínez-Muñoz, M. A., & Martínez, J. W. (2018). Genes de predisposición al cáncer de mama Breast Cancer Predisposition Genes. *Barranquilla (Col.)*, 34(3), 766–783. www.Uniprot.org

Green, E. D., & Guyer, M. S. (2011). Charting a course for genomic medicine from base pairs to bedside. *Nature*, 470(7333), 204–213. <https://doi.org/10.1038/nature09764>

Gambino, G., Tancredi, M., Falaschi, E., Aretini, P., & Caligo, M. A. (2015). Characterization of three alternative transcripts of the BRCA1 gene in patients with breast cancer and a family history of breast and/or ovarian cancer who tested negative for pathogenic mutations. *International Journal of Molecular Medicine*, 35(4), 950. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2015.2103>

Wrona, E., Braun, M., Pastorczyk, A., Taha, J., Lejman, M., Kowalczyk, J., Fendler, W., & Młynarski, W. (2019). MLPA as a complementary tool for diagnosis of chromosome 21 aberrations in childhood BCP-ALL. *Journal of Applied Genetics*, 60(3), 347. <https://doi.org/10.1007/S13353-019-00509-8>

Md., S. S.-G., Diego-Álvarez, D., Buades, C., Romera-López, A., Pérez-Cabornero, L., Valero-Hervás, D., Cantalapiedra, D., Bioinformatics, Felipe-Ponce, V., Hernández-Poveda, G., José Roca, M., Casañas, C., Fernández-Pedrosa, V., M., C. C., C., Á. A., P.,

J. C. T., C., Ó. R., Marco, G., Gil, M., ... Ballester, A. (2015). Diagnóstico molecular de enfermedades genéticas: del diagnóstico genético al diagnóstico genómico con la secuenciación masiva. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(4), 458–469. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.07.004>

Markovic, D. (2013). Alternative mRNA splicing of g protein-coupled receptors. *Methods in Enzymology*, 520, 323–335. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391861-1.00015-0>

Zhang, J., Willers, H., Feng, Z., Ghosh, J. C., Kim, S., Weaver, D. T., Chung, J. H., Powell, S. N., & Xia, F. (2004). Chk2 Phosphorylation of BRCA1 Regulates DNA Double-Strand Break Repair. *Molecular and Cellular Biology*, 24(2), 708. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.2.708-718.2004>

Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S. J., & Qin, J. (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes & Development*, 14(8), 927. <https://doi.org/10.1101/gad.14.8.927>

Nagy, R., Sweet, K., & Eng, C. (2004). Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene* 2004 23:38, 23(38), 6445–6470. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207714>

Mesman, R. L. S., Calléja, F. M. G. R., de La Hoya, M., Devilee, P., van Asperen, C. J., Vrieling, H., & Vreeswijk, M. P. G. (n.d.). *Alternative mRNA splicing can attenuate the pathogenicity of presumed loss-of-function variants in BRCA2*. <https://doi.org/10.1038/s41436>

Llort, G., Chirivella, I, Morales, R, Serrano, R, Sanchez, A Beatriz, Teulé, A, Lastra, E, Brunet, J, Balmaña, J, & Grañ, B. (2004). Clinical guides in oncology SEOM clinical guidelines in Hereditary Breast and ovarian cancer. *Clin Transl Oncol*, 17, 956–961. <https://doi.org/10.1007/s12094-015-1435-3>

Nunes, R., George, S. H. L., Murdock, T., Turashvili, G., & Hodgson, A. (2020). *Pathology of Hereditary Breast and Ovarian Cancer*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.531790>

Hirotsu, Y., Schmidt-Edelkraut, U., Nakagomi, H., Sakamoto, I., Hartenfeller, M., Narang, R., Soldatos, T. G., Kaduthanam, S., Wang, X., Hettich, S., Brock, S., Jackson, D. B., & Omata, M. (n.d.). Consolidated BRCA1/2 Variant Interpretation by MH BRCA Correlates with Predicted PARP Inhibitor Efficacy Association by MH Guide. *International Journal of Molecular Sciences Article Int. J. Mol. Sci*, 2020, 3895. <https://doi.org/10.3390/ijms21113895>

Mudge, D. W., Johnson, D. W., Hawley, C. M., Campbell, S. B., Isbel, N. M., van Eps, C. L., & Petrie, J. J. B. (2011). Do aluminium-based phosphate binders continue to have a role in contemporary nephrology practice? *BMC Nephrology*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2369-12-20>

Fackenthal, J. D., & Olopade, O. I. (2007). Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nature Reviews Cancer* 2007 7:12, 7(12), 937–948. <https://doi.org/10.1038/nrc2054>

Narod, S. A., & Foulkes, W. D. (2004). BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature Reviews Cancer* 2004 4:9, 4(9), 665–676. <https://doi.org/10.1038/nrc1431>

Djebali, S., Davis, C. A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., Tanzer, A., Lagarde, J., Lin, W., Schlesinger, F., Xue, C., Marinov, G. K., Khatun, J., Williams, B. A., Zaleski, C., Rozowsky, J., Röder, M., Kokocinski, F., Abdelhamid, R. F., ... Gingeras, T. R. (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature*, 489(7414), 101. <https://doi.org/10.1038/NATURE11233>

Assessing Your Risk for Hereditary Breast & Ovarian Cancers | Hospital in Morehead City, NC. (n.d.). Retrieved May 5, 2022, from <https://www.carterrealth.org/about-us/mayo-clinic-care-network/mayo-health-library-resources/assessing-your-risk-for-hereditary-breast-ovaria/>

Gutmacher, A. E., Collins, F. S., Wooster, R., & Weber, B. L. (2009). Breast and Ovarian Cancer. *Http://Dx.Doı.Org/10.1056/NEJMra012284*, 348(23), 2339–2347. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA012284>

Claus, E. B., Schildkraut, J., Iversen, E. S., Berry, D., & Parmigiani, G. (1998). *Effect of BRCA1 and BRCA2 on the Association Between Breast Cancer Risk and Family History*.
<https://academic.oup.com/jnci/article/90/23/1824/2520744>

Petrucci, N., Daly, M. B., & Pal, T. (2022). BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *GeneReviews*®.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247/>

Lux, M. P., Fasching, P. A., & Beckmann, M. W. (2006). Hereditary breast and ovarian cancer: Review and future perspectives. *Journal of Molecular Medicine*, 84(1), 16–28.
<https://doi.org/10.1007/S00109-005-0696-7>

AUTOEVALUACIÓN

Después de haber realizado este trabajo puedo decir con claridad que los conocimientos adquiridos estos cuatro años de carrera han tenido su fruto. Desde que empecé el grado aprendía muchos conceptos que no les veía visión laboral, gracias a estas practicas y a poder desarrollar este trabajo he visto la importancia del saber en ciencia.

He aprendido mucho de laboratorio, pero más de analizar genéticamente que no había hecho nunca con diferentes predictores *in silico*. Incluso he aprendido el gran mundo de las variantes patogénicas que afectan a nivel de *splicing*, que son muchas.

Además, me he dado cuenta de la gran necesidad de realizar estudios genéticos a la población para prevenir y tratar a pacientes con enfermedades hereditarias.

Ha sido revelador ver como las pruebas no salían, como no obteníamos resultados y aun así todo el equipo seguía con las mismas ganas de seguir en el proyecto.

Esperaba que fuera más fácil, pero he comprendido que inconvenientes hacen que luches más por tus objetivos, en este caso la entrega de este TFG.

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

ANEXO 1: DESIGNACIÓN DE EVENTOS DE SPLICING ALTERNATIVO, ANOTACIÓN BIOLÓGICA (BIOTIPO) Y ANOTACIÓN FUNCIONAL.

Para la designación de eventos de *splicing* alternativo nos hemos guiado por trabajos previos del consorcio ENIGMA (Fackenthal & Olopade, 2007). En síntesis, se combinarán símbolos de acuerdo con las siguientes convenciones:

La pérdida de nucleótidos respecto al mensajero de referencia (pérdida parcial o completa de unos o varios exones) se denotará con Δ .

La ganancia de nucleótidos (inclusión en el mensajero maduro de secuencia intrón de referencia) se denotará con \blacktriangledown .

Las pérdidas (o ganancias) que afecten al extremo 5' de un exón (aceptor de *splicing* alternativo) se especifican con la letra "p".

Las pérdidas (o ganancias) que afecten al extremo 3' de un exón (donador de *splicing* alternativo) se especificarán con la letra "q".

El tamaño (en nucleótidos) de la alteración se indicará con un **subíndice** en el caso de una pérdida, o con un **superíndice** en el caso de que sea una inserción. A excepción de que sea un valor obvio (pérdida de exones de referencia completos).

Se utilizarán comas "." para designar dos exones adyacentes y guiones bajos " " para designar varios exones adyacentes.

La existencia de mensajeros que combinen más de un evento de *splicing* alternativo se indicará con el símbolo "+".

La anotación biológica (biotipo) y funcional de los eventos de *splicing* alternativo la hemos realizado de acuerdo con GENCODE (Mudge et al., 2011).

ANEXO 2: IT ANALISIS DE FRAGMENTOS *BRC42*

IT TFG 2022 - PAULA FERNANDEZ

PRUEBA 1 -- x/03/22 HASTA x/03/22

NÚMERO DE MUESTRAS:

EXTRACCIÓN RNA

CUANTIFICACIÓN RNA - Quantus Fluoremeter

MUESTRAS	ng/μL
0	110
0	87.3
0	102
0	216
0	

1. RNA high STD (10 μL RNA dye + 3990 μL TE 1x)
2. t. estándar (5 μL RNA STD + 200 μL working solution)
3. t. blanc (200 μL working solution)
4. t. muestra (1 μL RNA + 200 μL working solution)
5. incubar a T° ambiente durante 5 min

Añadimos
1 μL RNA

PROTEGER DE LA LUZ

RT-PCR

MUESTRAS	μL RNA (500 ng)	μL H2O
0	4.55	6.65
0	5.73	5.47
0	4.90	6.30
0	2.31	8.89
0	#DIV/0!	#DIV/0!
CONTROL -	0	11.20

limpiar todo RNAfree	
1. x μL RNA	9. Mezclar + spin
2. x μL H2O	10. Termociclador 25°C 2 min (19 μL)
3. 1 μL Ran Hex	11. 1 μL SS II RT enzyme
4. x μL Mix dNTP	12. Termociclador (20 μL)
5. Termociclador 55°C 5 min (13 μL)	23°C 10 min
6. Enfriar con hielo 1 min	42°C 50 min
7. 4 μL Buffer RT	70°C 15 min
8. 2 μL DTT	4°C inf

Añadimos

1 μL Ran Hex

0.2 μL dATP

0.2 μL dCTP

0.2 μL dGTP

0.2 μL dTTP

x μL RNA

x μL H2O

4 μL Buffer RT

1 μL SS II RT enz

2 μL DTT

Vf = 20 μL

Mix de dNTP para 6 muestras
1.2 μL de cada dATP, dCTP, dTTP, dGTP

CUANTIFICACIÓN cDNA (ssDNA)

MUESTRAS	ng/μL
0	128
0	162
0	176
0	189
CONTROL -	0.48

1. ssDNA high STD (10 μL ssDNA dye + 3990 μL TE 1x)
2. t. estándar (4 μL ssDNA STD + 200 μL working solution)
3. t. blanc (200 μL working solution)
4. t. muestra (1 μL ssDNA + 200 μL working solution)
5. incubar a T° ambiente durante 1 min

Añadimos

1 μL cDNA

PROTEGER DE LA LUZ

PCR

1. Oligonucleótidos o primers -- 2. Diluciones de todas las muestras -- 3. Mix PCR -- 4. PCR

MUESTRAS	μL cDNA (50 ng)	μL H2O
0	9.77	15.23
0	7.72	17.28
0	7.10	17.90
0	6.61	18.39
0	#DIV/0!	#DIV/0!
CONTROL -	0.00	25.00

1. 2 μL cDNA
2. 1.25 μL Primer R
3. 1.25 μL Primer F
4. 20.5 μL Mix PCR
5. Spin + Termociclador

MH	[inicial]	[final]	x1
cDNA	100 ng	50 ng	2
dNTPs	10 mM	2 mM	5
Buffer	10x	1x	2.5
Taq Pol	5 U/μL	0.04 U/μL	0.2
MgCl2	25 mM	20 mM	---
H2O	---	---	13.3
Primer F	---	5 pmol/μL	1
Primer R	---	5 pmol/μL	1
			Vf = 25 μL

Mix PCR

Muestras	Combinaciones de primers
4	2
9	muestras totales
x9	
119.7	μL H2O
22.5	μL Buffer
0	μL MgCl2
45	μL dNTPs
1.8	μL Taq Pol
189	μL vf de la mix PCR

DILUCIONES

reconstitución de primers

	[C]	μL primer	μL H2O	
sense	18	43.27	5.78	44.22
antisense F	22	30.64	8.16	41.84
sense	21	45.31	5.52	44.48
antisense F	22	30.64	8.16	41.84

1. μL H2O
2. μL primer
3. cerrar tupper + rehidratar 2 min
4. vortex 15 seg

TUBOS AZULES -- nevera

Condiciones PCR

Vf (25 μL)

94°C	10 min
94°C	30 s
58°C	30 s
72°C	30 s
72°C	10 min
4°C	inf

GEL DE AGAROSA

MUESTRAS
0
0
0
0
0

1. (dilución 1:2) 10 μL muestra + 10 μL de H2O
2. Cargar 20 μL de dilución de cada muestra en el gel de agarosa
3. Esperar 10 min con la luz apagada

ELECTROFORESIS CAPILAR

PLACA PCR + A. FRAG

	1	2	3	4
A				
B				
C				
D				
E				
F				
G				
H				

1. 2 μL PCR
2. 20 μL HIDI
3. 0.2 μL SizeStand
4. Spin + incubar 86°C 3 min
5. Incubar 4°C 2 min, tapa abierta

Análisis de fragmentos FG_

ANEXO 3: TRANSCRITO DEL GEN *BRCA2* CON LA COMBINACIÓN DE PRIMERS INCLUIDA

>NM_000059.4 BRCA2 [organism=Homo sapiens] [GeneID=675]

EXON 1

GTGGCGCGAGCTTCTGAAACTAGGCGGCAGAGGCGGAGCCGCTGTGGCACTGCTGCGCCTC
TGCTGCGCCTCGGGTGTCTTTTTCGCGCGGTGGGTGCGCCGCCGGGAGAAGCGTGAGGGGACA
GATTTGTGACCGGCGCGGTTTTTGTGACGTTACTCCGGCCAAAAAAGAAGCTGCACCTCTGGA
GCGG

EXON 2

ACTTATTTACCAAGCATTGGAGGAATATCGTAGGTAAAAATGCCTATTGGATCCAAAGAGAG
GCCAACATTTTTTGAAATTTTTAAGACACGCTGCAACAAAGCAG

EXON 3

ATTTAGGACCAATAAGTCTTAATTGGTTTGAAGAAGCTTCTTCAGAAGCTCCACCCTATAATT
CTGAACCTGCAGAAGAATCTGAACATAAAAAACAACAATTACGAACCAAACCTATTTAAAAC
TCCACAAAGGAAACCATCTTATAATCAGCTGGCTTCAACTCCAATAATATTCAAAGAGCAAG
GGCTGACTCTGCCGCTGTACCAATCTCCTGTAAAAGAATTAGATAAATTCAAATTAGACTTA
G

EXON 4

GAAGGAATGTTCCCAATAGTAGACATAAAAGTCTTCGCACAGTGAAAAGCTAAAATGGATCA
AGCAGATGATGTTTCTGTCCACTTCTAAATTCTTGTCTTAGTGAAAAG

EXON 5

TCCTGTTGTTCTACAATGTACACATGTAACACCACAAAGAGATAAGTCAG

EXON 6

TGGTATGTGGGAGTTTGTTCATACACCAAAGTTTGTGAAG

EXON 7

GGTCGTCAGACACCAAACATATTTCTGAAAGTCTAGGAGCTGAGGTGGATCCTGATATGTC
TTGGTCAAGTTCTTTAGCTACACCACCACCCTTAGTTCTACTGTGCTCATAG

EXON 8

TCAGAAATGAAGAAGCATCTGAAACTGTATTTCTCATGATACTACTGCT

EXON 9

AATGTGAAAAGCTATTTTTCCAATCATGATGAAAGTCTGAAGAAAAATGATAGATTTATCGC
TTCTGTGACAGACAGTGAAAACACAAATCAAAGAGAAGCTGCAAGTCATG

EXON 10

GATTTGGAAAAACATCAGGGAATTCATTTAAAGTAAATAGCTGCAAAGACCACATTGGAAA
GTCAATGCCAAATGTCCTAGAAGATGAAGTATATGAAACAGTTGTAGATACCTCTGAAGAA
GATAGTTTTTCATTATGTTTTTCTAAATGTAGAACAAAAATCTACAAAAAGTAAGAACTAG
CAAGACTAGGAAAAAAATTTCCATGAAGCAAACGCTGATGAATGTGAAAAATCTAAAAAC
CAAGTGAAAGAAAAATACTCATTTGTATCTGAAGTGGAACCAAATGATACTGATCCATTAGA
TTCAAATGTAGCAAATCAGAAGCCCTTTGAGAGTGGAAGTGACAAAATCTCCAAGGAAGTT
GTACCGTCTTTGGCCTGTGAATGGTCTCAACTAACCCCTTTCAGGTCTAAATGGAGCCCAGAT
GGAGAAAATACCCCTATTGCATATTTCTCATGTGACCAAATATTTTCAGAAAAAGACCTAT
TAGACACAGAGAACAAAAGAAAGAAAGATTTTCTTACTTCAGAGAATTCTTTGCCACGTATT
TCTAGCCTACCAAATCAGAGAAGCCATTAATGAGGAAACAGTGGTAAATAAGAGAGATG

AAGAGCAGCATCTTGAATCTCATAACAGACTGCATTCTTGCAGTAAAGCAGGCAATATCTGGA
ACTTCTCCAGTGGCTTCTTCATTTCAAGGTATCAAAAAGTCTATATTCAGAATAAGAGAATC
ACCTAAAGAGACTTTCAATGCAAGTTTTTCAGGTCATATGACTGATCCAAACTTTAAAAAAG
AAACTGAAGCCTCTGAAAGTGGACTGGAAATACATACTGTTTGCTCACAGAAGGAGGACTC
CTTATGTCCAAATTTAATTGATAATGGAAGCTGGCCAGCCACCACCACACAGAATTCTGTAG
CTTTGAAGAATGCAGGTTTAATATCCACTTTGAAAAAGAAAACAAATAAGTTTATTTATGCT
ATACATGATGAAACATCTTATAAAGGAAAAAAAATACCGAAAGACCAAAAATCAGAACTAA
TTAACTGTTGAGCCAGTTTGAAGCAAATGCTTTTGAAGCACCCTTACATTTGCAAATGCTG
ATTCAG

EXON 11

GTTTATTGCATTCTTCTGTGAAAAGAAGCTGTTTCACAGAATGATTCTGAAGAACCAACTTTGT
CCTTAACTAGCTCTTTTGGGACAATTCTGAGGAAATGTTCTAGAAATGAAACATGTTCTAAT
AATACAGTAATCTCTCAGGATCTTGATTATAAAGAAGCAAAAATGTAATAAGGAAAAACTAC
AGTTATTTATTACCCAGAAAGCTGATTCTCTGTGCATGCCTGCAGGAAGGACAGTGTGAAAAT
GATCCAAAAAGCAAAAAAGTTTCAGATATAAAGAAGAGGTCTTGGCTGCAGCATGTCACC
CAGTACAACATTTCAAAAGTGAATACAGTGATACTGACTTTCAATCCAGAAAAGTCTTTTA
TATGATCATGAAAATGCCAGCACTCTTATTTTAACTCCTACTTCCAAGGATGTTCTGTCAAAC
CTAGTCATGATTTCTAGAGGCAAAGAATCATAAAAATGTCAGACAAGCTCAAAGGTAACA
ATTATGAATCTGATGTTGAATTAACCAAAAATATTCCCATGGAAAAGAATCAAGATGTATGT
GCTTTAAATGAAAATTATAAAAACGTTGAGCTGTTGCCACCTGAAAAATACATGAGAGTAGC
ATCACCTTCAAGAAAGGTACAATTCACCAAAAACAAAATCTAAGAGTAATCCAAAAAAT
CAAGAAGAACTACTTCAATTTCAAAAATAACTGTCAATCCAGACTCTGAAGAACTTTTCTC
AGACAATGAGAATAATTTTGTCTTCCAAGTAGCTAATGAAAGGAATAATCTTGCTTTAGGAA
ATACTAAGGAACTTCATGAAACAGACTTGACTTGTGTAAACGAACCCATTTTCAAGAACTCT
ACCATGGTTTTATATGGAGACACAGGTGATAAACAAGCAACCCAAAGTGTCAATTAAAAAAG
ATTTGGTTTTATGTTCTTGCAGAGGAGAACAAAAATAGTGTAAGCAGCATATAAAAAATGACT
CTAGGTCAAGATTTAAAATCGGACATCTCCTTGAATATAGATAAAAATACCAGAAAAAATA
ATGATTACATGAACAAATGGGCAGGACTCTTAGGTCCAATTTCAAATCACAGTTTTGGAGGT
AGCTTCAGAACAGCTTCAAATAAGGAAAATCAAGCTCTCTGAACATAACATTAAGAAGAGCA
AAATGTTCTTCAAAGATATTGAAGAACAATATCCTACTAGTTTAGCTTGTGTTGAAATTGTA
AATACCTTGGCATTAGATAATCAAAAGAACTGAGCAAGCCTCAGTCAATTAATACTGTATC
TGCACATTTACAGAGTAGTGTAGTTGTTTCTGATTGTAAAAATAGTCATATAACCCCTCAGAT
GTTATTTTCCAAGCAGGATTTAATTCAAACCATAATTTAACACCTAGCCAAAAGGCAGAAA
TTACAGAACTTTCTACTATATTAGAAGAATCAGGAAGTCAGTTTGAATTTACTCAGTTTGA
AAACCAAGCTACATATTGCAGAAGAGTACATTTGAAGTGCCTGAAAACCAGATGACTATCTT
AAAGACCCTTCTGAGGAATGCAGAGATGCTGATCTTCATGTCATAATGAATGCCCCATCGA
TTGGTCAGGTAGACAGCAGCAAGCAATTTGAAGGTACAGTTGAAATTAACCGGAAGTTTGC
TGGCCTGTTGAAAATGACTGTAACAAAAGTGCTTCTGGTTATTTAACAGATGAAAATGAAG
TGGGGTTTAGGGGCTTTTATTCTGCTCATGGCACAAAAGTGAATGTTTCTACTGAAGCTCTGC
AAAAAGCTGTGAAACTGTTTAGTGATATTGAGAATATTAGTGAGGAACTTCTGCAGAGGTA
CATCCAATAAGTTTATCTTCAAGTAAATGTCATGATTCTGTTGTTTCAATGTTTAAGATAGAA
AATCATAATGATAAACTGTAAGTGAAAAAATAATAAATGCCAACTGATATTACAAAATA
ATATTGAAATGACTACTGGCACTTTTGTGGAAGAAATTAAGTAAAATTACAAGAGAAATACT
GAAAATGAAGATAACAAATATACTGCTGCCAGTAGAAATTTCTCATAACTTAGAATTTGATGG
CAGTGATTCAAGTAAAAATGATACTGTTTGTATTTCATAAAGATGAAACGGACTTGCTATTTA
CTGATCAGCACAACATATGTCTTAAATTATCTGGCCAGTTTATGAAGGAGGGAAACACTCAG
ATTAAGAAGATTTGTCAGATTTAACTTTTTTGGAAAGTTGCGAAAGCTCAAGAAGCATGTCA
TGGTAATACTTCAAATAAAGAACAGTTAACTGCTACTAAAACGGAGCAAAAATATAAAGAT
TTTGAGACTTCTGATACATTTTTTTCAGACTGCAAGTGGGAAAAATATTAGTGTGCGCCAAAGA
GTCATTTAATAAAATTGTAAATTTCTTTGATCAGAAACCAGAAGAATTGCATAACTTTTCTCT
AAATTCTGAATTACATTTCTGACATAAGAAAGAACAAAATGGACATTTCTAAGTTATGAGGAA
ACAGACATAGTTAAACACAAAATACTGAAAGAAAGTGTCCCAGTTGGTACTGGAAATCAAC
TAGTGACCTTCCAGGGACAACCCGAACGTGATGAAAAGATCAAAGAACCTACTCTATTGGG
TTTTCATAACAGCTAGCGGAAAAAAGTTAAAATTGCAAAGGAATCTTTGGACAAAGTGAAA
AACCTTTTTGATGAAAAGAGCAAGGTACTAGTGAATCACCAGTTTTAGCCATCAATGGGC
AAAGACCCTAAAGTACAGAGAGGCCTGTAAAGACCTTGAATTAGCATGTGAGACCATTGAG
ATCACAGCTGCCCAAAGTGTAAGAAATGCAGAATTTCTCAATAATGATAAAAACCTTGT
TTCTATTGAGACTGTGGTGCCACCTAAGCTCTTAAAGTGATAATTTATGTAGACAACTGAAA
ATCTCAAAACATCAAAAAGTATCTTTTTGAAAGTTAAAGTACATGAAAATGTAGAAAAAGA

AACAGCAAAAAGTCCTGCAACTTGTTACACAAATCAGTCCCCTTATTCAGTCATTGAAAATT
CAGCCTTAGCTTTTTACACAAGTTGTAGTAGAAAACTTCTGTGAGTCAGACTTCATTACTTG
AAGCAAAAAAATGGCTTAGAGAAGGAATATTTGATGGTCAACCAGAAAGAATAAATACTGC
AGATTATGTAGGAAATTATTTGTATGAAAATAATTCAAACAGTACTATAGCTGAAAATGACA
AAAATCATCTCTCCGAAAAACAAGATACTTATTTAAGTAACAGTAGCATGTCTAACAGCTAT
TCCTACCATTCTGATGAGGTATATAATGATTCAGGATATCTCTCAAAAAATAAACTTGATTCT
GGTATTGAGCCAGTATTGAAGAATGTTGAAGATCAAAAAACACTAGTTTTTCCAAAGTAAT
ATCCAATGTAAAAGATGCAAAATGCATACCCACAAACTGTAAATGAAGATATTTGCGTTGAG
GAACTTGTGACTAGCTCTTCACCCTGCAAAAAATAAAAATGCAGCCATTAAATTGTCCATATC
TAATAGTAATAATTTTGAGGTAGGGCCACCTGCATTTAGGATAGCCAGTGGTAAAATCGTTT
GTGTTTCACATGAAACAATTA AAAAAGTGAAGACATATTTACAGACAGTTTCAGTAAAGTA
ATTAAGGAAAACAACGAGAATAAAAATCAAAAATTTGCCAAACGAAAATTATGGCAGGTTGTT
ACGAGGCATTGGATGATTCAGAGGATATTTCTCATAACTCTCTAGATAATGATGAATGTAGC
ACGCATTCACATAAGGTTTTTTGCTGACATTCAGAGTGAAGAAAATTTACAACATAACCAAAA
TATGTCTGGATTGGAGAAAGTTTTCTAAAATATCACCTTGATGTTAGTTTGGAACTTCAG
ATATATGTAATGTAGTATAGGGAAGCTTCATAAGTCAGTCTCATCTGCAAATACTTGTTGG
ATTTTTAGCACAGCAAGTGGAAAATCTGTCCAGGTATCAGATGCTTCATTACAAAACGCAAG
ACAAGTGTCTTCTGAAATAGAAGATAGTACCAAGCAAGTCTTTTCCAAAGTATTGTTTAAAA
GTAACGAACATTCAGACCAGCTCACAAGAGAAGAAAATACTGCTATACGTACTCCAGAACA
TTTAATATCCCAAAAAGGCTTTTCATATAATGTGGTAAATTCATCTGCTTTCTCTGGATTTAG
TACAGCAAGTGGAAAGCAAGTTTCCATTTTAGAAAGTTCCTTACACAAAGTTAAGGGAGTGT
TAGAGGAATTTGATTTAATCAGA ACTGAGCATAGTCTTCACTATTCACCTACGTCTAGACAA
AATGTATCAAAAATACTTCCTCGTGTGATAAGAGAAACCCAGAGCACTGTGTA AACTCAGA
AATGGAAAAACCTGCAGTAAAGAATTTAAATATCAAATAACTTAAATGTTGAAGGTGGTT
CTTCAGAAAATAATCACTCTATTAAGTTTTCTCCATATCTCTCTCAATTTCAACAAGACAAAC
AACAGTTGGTATTAGGAACCAAGTGC ACTTGTTGAGAACATTCATGTTTTGGGAAAAGAA
CAGGCTTCACCTAAAACGTA AAAAATGGAAATGGTAAA ACTGAACTTTTTCTGATGTTCC
TGTGAAAACAAATATAGAAGTTTGTCTACTTACTCCAAAGATTCAGAAA ACTACTTTGAAA
CAGAAGCAGTAGAAATTGCTAAAGCTTTTATGGAAGATGATGAACTGACAGATTCTAAACT
GCCAAGTCATGCCACATTTCTTTTTACATGTCCCGAAAATGAGGAAATGGTTTTGTCAA
ATCAAGAATTGGAAAAAGAAGAGGAGCCCTTATCTTAGTGG

EXON 12

GAGAACCCCTCAATCAAAAAGAACTTATTAATGAATTTGACAGGATAATAGAAAATCAAGA
AAAATCCTTAAAGGCTTCAAAAAGCACTCCAGATG

EXON 13

GCACAATAAAAGATCGAAGATTGTTTATGCATCATGTTTCTTTAGAGCCGATTACCTGTGTA
CCCTTTCG

EXON 14

CACA ACTAAGGAACGTCAAGAGATACAGAATCCAAATTTTACCGCACCTGGTCAAGAATTTCT
TGTCTAAATCTCATTGTATGAACATCTGACTTTGGAAAAATCTTCAAGCAATTTAGCAGTTT
CAGGACATCCATTTTATCAAGTTTCTGCTACAAGAAATGAAAAAATGAGACACTTGATTACT
ACAGGCAGACCAACCAAGTCTTTGTTCCACCTTTTAAA ACTAAATCACATTTTCACAGAGT
TGAACAGTGTGTTAGGAATATTA ACTTGGAGGAAAACAGACAAAAGCAAACATTGATGGA
CATGGCTCTGATGATAGTAAAAATAAGATTAATGACAATGAGATTATCAGTTTAAACAAAA
CAACTCCAATCAAGCAGTAGCTGTA ACTTTACAAAAGTGTGAAGAAGAACCTTTAG

EXON 15

ATTTAATTACAAGTCTTCAGAATGCCAGAGATATACAGGATATGCGAATTAAGAAGAAACA
AAGGCAACGCGTCTTTCCACAGCCAGGCAGTCTGTATCTTGCAAAAACATCCACTCTGCCTC
GAATCTCTTGAAAGCAGCAGTAGGAGGCCAAGTTCCTCTGCGTGTTCATAAACAG

EXON 16

CTGTATACGTATGGCGTTTCTAAACATTGCATAAAAATTAACAGCAAAAATGCAGAGTCTTT
TCAGTTTCACACTGAAGATTATTTTGGTAAGGAAAGTTTATGGACTGGAAAAGGAATACAGT
TGGCTGATGGTGGATGGCTCATACCCTCCAATGATGGAAAGGCTGGAAAAGAAGAATTTTAT
AG

EXON 17

GGCTCTGTGTGACACTCCAGGTGTGGATCCAAAGCTTATTTCTAGAATTTGGGTTTATAATCA
CTATAGATGGATCATATGGAAACTGGCAGCTATGGAATGTGCCTTTCCTAAGGAATTTGCTA
ATA**GATGCCTAAGCCCAGAAAGG**GTGCTTCTTCAACTAAAATACAG

EXON 18

ATATGATACGGAAATTGATAGAAGCAGAAGATCGGCTATAAAAAAGATAATGGAAAGGGAT
GACACAGCTGCAAAAACACTTGTCTCTGTGTTTCTGACATAATTTTATTGAGCGCAAATAT
ATCTGAACTTCTAGCAATAAACTAGTAGTGCAGATACCCAAAAAGTGGCCATTATTGAAC
TTACAGATGGGTGGTATGCTGTAAAGGCCAGTTAGATCCTCCCCTCTTAGCTGTCTTAAAGA
ATGGCAGACTGACAGTTGGTCAGAAGATTATTCTTCATGGAGCAGAACTGGTGGGCTCTCT
GATGCCTGTACACCTCTT**GAAGCCCCAGAATCTCTTATG**TAAAG

EXON 19

ATTTCTGCTAACAGTACTCGGCCTGCTCGCTGGTATACCAAACCTTGGATTCTTTCCTGACCCT
AGACCTTTTCTCTGCCCCTTAT**CATCGCTTTTCAGTGATGGA**GGAAATGTTGGTTGTGTGAT
GTAATTATTCAAAGAGCATACCCTATACAG

EXON 20

TGGATGGAGAAGACATCATCTGGATTATACATATTTTCGCAATGAAAGAGAGGAAGAAAAGG
AAGCAGCAA**AATATGTGGAGGCCCAACA**AAGAGACTAGAAGCCTTATTCACTAAAATTCAG
GAGGAATTTGAAGAACATGAAG

EXON 21

AAAACACAACAAAACCATATTTACCATCACGTGCACTAACAAGACAGCAAGTTCGTGCTTTG
CAAGATGGTGCAGAGCTTTATGAAGCAGTGAAGAATGCAGCAGACCCAGCTTACCTTGAG

EXON 22

GGTATTT**CAGTGAAGAGCAGTTAAGAG**CCTTGAATAATCACAGGCAAATGTTGAATGATAA
GAAACAAGCTCAGATCCAGTTGGAAATTAGGAAGGCCATGGAATCTGCTGAACAAAAGGAA
CAAGGTTTATCAAGGGATGTCACAACCGTGTGGAAGTTGCGTATTGTAAGCTATTCAAAAAA
AGAAAAAGATTTCAG

EXON 23

TTATACTGAGTATTTGGCGTCCATCATCAGATTTATATTCTCTGTTAACAGAAGGAAAGAGA
TACAGAATTTAT**CATCTTGCAACTTCAAATCTAAAAG**TAAATCTGAAAGAGCTAACATACA
GTTAGCAGCGACAAAAAAACTCAGTATCAACAACCTACCG

EXON 24

GTTTCAGATGAAATTTTATT**TCAGATTTACCAGCCACGG**GAGCCCCTTCACTTCAGCAAATTT
TTAGATCCAGACTTTCAGCCATCTTGTCTGAGGTGGACCTAATAGGATTTGTCGTTTCTGTT
GTGAAAAAACAG

EXON 25

GACTTGCCCCCTTTCGTCTATTTGTGACAGCAATGTTACAATTTACTGGCAATAAAGTTTGGAA
TAGACCTTAATGAGGACATTATTAAGCCTCATATGTTAATTGCTGCAAGCAACCTCCAGTGG
CGACCAGAAATCAAATCAGGCCTTCTTACTTTATTTGCTGGAGATTTTCTGTGTTTTCTGCT
AGTCCAAAAGAGGGCCACTTCAAGAGACATTCAACAAAATGAAAATACTGTTGAG

EXON 26

AATATTGACATACTTTGCAATGAAGCAGAAAACAAGCTTATGCATATACTGCATGCAAATGA
TCCCAAGTGGTCCACCCCAACTAAAGACTGTACTTCAGGGCCGTACACTGCTCAAATCATTC
CTGGTACAGGAAACAAGCTTCTG

EXON 27

ATGTCTTCTCCTAATTGTGAGATATATTATCAAAGTCCTTTATCACTTTGTATGGCCAAAAGG
AAGTCTGTTTCCACACCTGTCTCAGCCAGATGACTTCAAAGTCTTGTAAGGGGAGAAAGA
GATTGATGACCAAAGAAGTGCAAAAGAGAAGAGCCTTGGATTTCTTGAGTAGACTGCCT
TTACCTCCACCTGTTAGTCCCATTTGTACATTTGTTTCTCCGGCTGCACAGAAGGCATTTAG
CCACCAAGGAGTTGTGGCACCAAATACGAAACACCCATAAAGAAAAAAGAAGTGAATTCTC
CTCAGATGACTCCATTTAAAAAATCAATGAAATTTCTCTTTTGGAAAGTAATTCAATAGCTG
ACGAAGAAGTGCATTGATAAAATACCCAAGCTCTTTTGTCTGGTTCAACAGGAGAAAAACAA
TTTATATCTGTCACTGAATCCACTAGGACTGCTCCACAGTTCAGAAGATTATCTCAGACTG
AAACGACGTTGTACTACTCTCTGTATCAAAGAACAGGAGAGTTCAGGAGGAGTTCAGGAGG
AATGTGAGAAAAATAAGCAGGACACAATTACAATAAAAAATATATCTAAGCATTTGCAA
GGCGACAATAAATTATTGACGCTTAACTTTCCAGTTTATAAGACTGGAATATAATTTCAA
CCACACATTAGTACTTATGTTGCACAATGAGAAAAGAAATTAGTTTCAAATTTACCTCAGCG
TTTGTGTATCGGGCAAAAATCGTTTTGCCCGATTCCGTATTGGTATACTTTTGTCTCAGTTGC
ATATCTTAAACTAAATGTAATTTATTAATAATCAAGAAAAACATCTTTGGCTGAGCTCGG
TGGCTCATGCCTGTAATCCCAACACTTTGAGAAGCTGAGGTGGGAGGAGTGCTTGAGGCCAG
GAGTTCAAGACCAGCCTGGGCAACATAGGGAGACCCCATCTTTACAAAGAAAAAAG
GGGAAAAGAAAATCTTTAAATCTTTGGATTTGATCACTACAAGTATTATTTTACAAGTGAA
ATAAACATACCATTTTCTTTTAGATTGTGTCATTAATGGAATGAGGTCTCTTAGTACAGTTA
TTTTGATGCAGATAATTCCTTTTAGTTTAGCTACTATTTTAGGGGATTTTTTTTAGAGGTA
CACTATGAAATAGTTCTCCTTAATGCAAATATGTTGGTCTGCTATAGTTCATCCTGTTCAA
AAGTCAGGATGAATATGAAGAGTGGTGTTCCTTTTGGAGCAATTCCTCATCCTAAGTCAGC
ATGATTATAAGAAAATAGAACCCTCAGTGTAACCTCTAATTCCTTTTACTATTCCAGTGTGA
TCTCTGAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
AATTTATTTTTTTTTTCAACAAAATGGTCATCCAACTCAAATTTGAGAAAATATCTTGCTTT
CAAATTTGGCACTGATTCTGCCTGCTTTATTTTTAGCGCTATCACAGGACCCAGAGCCTATGCC
CTTTTAACTTACCACAAAAGCAGAAGATTAATTAATTTAAGATGATACTCTCATTTGTTAC
GTCCTTTTTTTTTTTTTTTGGAGATGGAGTCTTGTCTTGTCTCGCCATGCTGGAGTGCAGTGGCA
TGATCCTGGCTCACTGCAGCCTCCACTTCCCGGGTTCACGTAATTCCTCCACCTCAAGCCTCC
CTAGTAGCTGGGATTACAGGGACGCACCACCATGCCAGCTAATTTTTGCATTTTTAGTAGA
GACTGGGTTTTACCATGTTGGCCAAGCTGGTCTCAAACCTCCTGATGTCAGGTGATCCATCTGC
CTCAGCCTCCAAAGTGTGGGATTATAGGCGTGAGCCACTGTGCCCGCCAATATTTGTTA
CTTTCTTAGGTTAATAGAGAAAAGGGATAAAACATTTCTAACTGGGAGTTAATTGCATGGA
GAAGGTCTTAAATCAGATGTTTTAATGCCTTAAATGTCTGTATAATATCATGTTTTCAAATCT
AATTATAAATACGTTTAAAGCCAAGAATAAATCTTTTAAAAAATTGA

El color gris hace referencia a la secuencia subrayada.

El color rosa hace referencia a la secuencia en cursiva.