



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

De la genética a la función: Análisis del efecto funcional de
variantes genéticas con potencial efecto patológico en
enfermedades neurodegenerativas.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Miravet Martí, Marc

Tutor/a: Niñoles Rodenes, Regina

Director/a Experimental: PEREZ TUR, JORDI

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica
i del Medi Natural

Universitat Politècnica de València (UPV)

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica y del Medi Natural
(ETSEAMN)

Grado en Biotecnología

Trabajo de Final de Grado

*De la genética a la función: análisis del
efecto funcional de variantes genéticas con
potencial efecto patológico en
enfermedades neurodegenerativas*

Marc Miravet Martí

Curso 2022/2023

Tutor experimental: Jordi Pérez Tur

Tutor académico: Regina Niñoles Rodenes



De la genética a la función: análisis del efecto funcional de variantes genéticas con potencial efecto patológico en enfermedades neurodegenerativas.

Resumen

Una de las aproximaciones más exitosas a la hora de determinar los mecanismos moleculares implicados en la aparición de enfermedades humanas se encuentra en la genética molecular. La identificación de variantes con efectos patogénicos relacionadas con esas enfermedades suele servir como punto de partida para desgranar los mecanismos moleculares que entran en juego. Eventualmente, el conocimiento generado a partir de estos hallazgos genéticos puede dar lugar a aproximaciones terapéuticas con ciertas probabilidades de éxito. Sin embargo, el salto entre genotipo y fenotipo resulta muchas veces difícil de realizar. La mera identificación de variantes no implica comprender cómo juegan un papel, muchas veces determinante, en la aparición de los fenotipos de interés. El trabajo pretendió comenzar a explicar cómo ciertas variantes sospechosas de dar lugar a diversas enfermedades neurodegenerativas alteran la función de las proteínas en las que aparecen o de los genes a los que afectan. Se estudiaron dos enfermedades concretas, la primera: atrofia óptica 5 asociada a ataxia y retraso en el desarrollo, con variantes identificadas en *DNM1L* (Dynamin 1 Like), y en *ACAD9* (Acyl-CoA Dehydrogenase Family Member 9). En segundo lugar, formas familiares de esclerosis lateral amiotrófica (ELA), relacionadas con variantes en *KIF5A* (Kinesin Family Member 5A), y *SETX* (Senataxin).

En cuanto a la metodología, en OPA5, el análisis del efecto funcional se realizó utilizando fibroblastos obtenidos de los miembros de la familia, tanto de los pacientes de la enfermedad, portadores de variantes, y de sus padres, cada uno de los cuales es portador de una variante en cada uno de los genes. Como etapas iniciales del estudio, analizamos la expresión de estos genes mediante extracción de mRNA y RT-qPCR. Además, dado el papel de estos en la dinámica mitocondrial, mediante inmunocitoquímica y microscopía de fluorescencia, se intentó observarla. Por otro lado, se estudiaron las variantes observadas en *KIF5A* y en *SETX*, mediante la cuantificación de la expresión del mRNA a través de RT-qPCR y de la proteína del plasma sanguíneo de los individuos afectados y sanos, a través de *Western blotting*. Los resultados sugieren que existe una incorrecta oligomerización de DRP1 debido a su variante, que no se obtienen unos datos coherentes del estudio de la variante en *ACAD9* y que la inmunocitoquímica de las estas proteínas tiene que ser mejorada. Sin embargo, todo apunta a que puede haber una sinergia clara que produzca la atrofia óptica. Mientras que las variantes en *KIF5A*, la intrónica es probablemente patogénica mientras que la *missense* sería benigna, y en *SETX*, la variante nonsense afecta en gran medida a la expresión y cantidad de proteína. Este trabajo se relaciona con el siguiente Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030: Salud y bienestar.

Palabras clave: análisis funcional, ataxia, esclerosis lateral amiotrófica, OPA5, variantes genéticas.

Autor: Marc Miravet Martí

Tutor experimental: Jordi Pérez i Tur

Tutor académico: Regina Niñoles Rodenes

Valencia, Julio 2023

From genetics to function: analysis of the functional effect of genetic variants with potential pathological effects in neurodegenerative diseases.

Abstract

One of the most successful approaches to determining the molecular mechanisms involved in the development of human diseases lies in molecular genetics. The identification of variants with pathogenic effects related to these diseases often serves as a starting point for unraveling the molecular mechanisms at play. Eventually, the knowledge generated from these genetic findings can lead to therapeutic approaches with certain probabilities of success. However, bridging the gap between genotype and phenotype is often challenging to accomplish. The mere identification of variants does not imply understanding how they play a, often decisive, role in the occurrence of the phenotypes of interest. The work aimed to begin explaining how certain variants suspected of causing various neurodegenerative diseases alter the function of the proteins in which they appear or the genes they affect. Two specific diseases were studied: optic atrophy 5 associated with ataxia and developmental delay, with variants identified in *DNM1L* (Dynamin 1 Like) and *ACAD9* (Acyl-CoA Dehydrogenase Family Member 9). Secondly, familial forms of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) related to variants in *KIF5A* (Kinesin Family Member 5A) and *SETX* (Senataxin).

Regarding the methodology, in OPA5, the analysis of functional effects was performed using fibroblasts obtained from family members, including disease patients carrying variants and their parents, each of whom is a carrier of a variant in each of the genes. As initial stages of the study, we analyzed the expression of these genes through mRNA extraction and RT-qPCR. Additionally, given their role in mitochondrial dynamics, attempts were made to observe it through immunocytochemistry and fluorescence microscopy. On the other hand, the observed variants in *KIF5A* and *SETX* were studied by quantifying mRNA expression through RT-qPCR and the plasma protein of affected and healthy individuals through Western blotting. The results suggest that there is incorrect oligomerization of DRP1 due to its variant. Coherent data from the study of the variant in *ACAD9* and the immunocytochemistry of these proteins need to be improved. However, everything points to a clear synergy that produces optic atrophy. Regarding the variants in *KIF5A*, the intronic variant is likely pathogenic, while the missense variant would be benign. In *SETX*, the nonsense variant greatly affects protein expression and quantity. This work relates to the following Sustainable Development Goal (SDG) of the 2030 Agenda: Good health and well-being.

Key words: amyotrophic lateral sclerosis, ataxia, functional analysis, genetic variants, OPA5.

Autor: Marc Miravet Martí

Tutor experimental: Jordi Pérez i Tur

Tutor académico: Regina Niñoles Rodenes

Valencia, Julio 2023

Índice

1.- Introducción	1
1.1.- Estudio de variantes de una enfermedad rara caracterizada por atrofia óptica y ataxia.....	1
1.1.1.- Detección de las variantes potenciales.....	3
1.1.2.- Genotipo familiar.....	5
1.1.3.- Hipótesis principal	6
1.2.- Variantes relacionadas con Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)	6
1.2.1.- Variantes descritas.....	8
2.- Objetivos	9
3.- Materiales y métodos.	10
3.1.- Estudio de las variantes en <i>DNM1L</i> y <i>ACAD9</i>	10
3.1.1.-Material biológico.....	10
3.1.2.- Cultivo de fibroblastos.....	10
3.1.3.- Extracción de proteína.....	12
3.2.3.- Cuantificación de proteínas por el método Bradford	13
3.1.4.- Extracción de RNA	13
3.1.5.- Western Blot de las proteínas.....	14
3.1.5.- Inmunocitoquímica.....	15
3.2.- Estudio de las variantes en <i>KIF5A</i> y <i>SETX</i>	17
3.2.1.- Análisis bioinformáticos de las variantes.....	17
3.2.2.- Materiales biológicos.....	17
3.2.3.- Cromatografía de afinidad de las proteínas mayoritarias plasma sanguíneo	19
3.2.4.- <i>Western blotting</i>	19
3.2.5.- Diseño de primers.....	19
3.2.6.- RT-qPCR.....	20
4.- Resultados y discusión	21
4.2.- Variantes en <i>ACAD9</i> y <i>DNM1L</i>	21
4.2.1.- Puesta a punto de la inmunocitoquímica	21
4.2.1.- Cuantificación de la expresión génica y <i>western blotting</i>	23
4.2.- Variantes en <i>KIF5A</i>	26
4.3.- Variante en <i>SETX</i>	29
5.- Conclusión	32
6.- Bibliografía	33

Índice de tablas

Tabla 1. Atrofias ópticas cuyas bases moleculares han sido definidas, junto con su loci, tipo de herencia, referencia OMIM y gen causante del fenotipo.....	3
Tabla 2. Genotipo de la familia que contiene las variantes en <i>DNM1L</i> y <i>ACAD9</i>	5
Tabla 3. Los genes que más se ven involucrados en la ELA, junto con las proteínas que codifican y las funciones celulares que estas cumplen en situaciones normales.....	7
Tabla 4. Anticuerpos utilizados en <i>western blotting</i> para observar la presencia de las proteínas ACAD9 y DRP1 en los fibroblastos.....	15
Tabla 5. Anticuerpos utilizados en inmunocitoquímica para observar la presencia y posición de las proteínas ACAD9 y DRP1 en los fibroblastos.....	17
Tabla 6. Anticuerpos utilizados en <i>western blotting</i> para observar la presencia de las proteínas KIF5A y SETX.....	19
Tabla 7. Cebadores utilizados para medir la expresión génica de <i>KIF5A</i> y <i>SETX</i> en las muestras de los pacientes.....	20
Tabla AI-1. Grado de relación con los Objetivos de Desarrollo Sostenible.....	ANEXO I

Índice de figuras

Figura 1. Representación de los dominios estructurales de DRP1 y localización de la variante encontrada en esta proteína.....	4
Figura 2. Representación de los dominios estructurales de ACAD9 y localización de la variante encontrada en esta proteína	5
Figura 3. Representación de los dominios estructurales de KIF5A y localización de las dos variantes descritas	8
Figura 4. Representación de los dominios estructurales de SETX y localización de la variante <i>non-sense</i> descrita en esta proteína.....	9
Figura 5. Pedigrís de la familia en la cual se van a estudiar las variantes en DNMT1L y ACAD9, junto con la leyenda general de los pedigrís del estudio	10
Figura 6. Flujo del cultivo de fibroblastos control y de pacientes	12
Figura 7. Curva patrón de BSA para la cuantificación de proteína mediante el método Bradford	13
Figura 8. Pedigrís de las familias dónde fueron encontradas las dos variantes de KIF5A. Se proporciona toda la información que consta de las enfermedades que padecieron los individuos, con o sin relación con ELA.....	18
Figura 9. Pruebas de inmunocitoquímica para la detección del posicionamiento de DRP1 y ACAD9. Imágenes captadas en los microscopios de fluorescencia (Confocal, en distintas pruebas y a diferentes aumentos.....	22
Figura 10. Expresión génica de <i>DNMT1L</i> en los miembros de la familia cuyos hijos padecen atrofia óptica 5.....	23
Figura 11. Expresión génica de <i>ACAD9</i> en los miembros de la familia cuyos hijos padecen atrofia óptica 5.....	24
Figura 12. <i>Western blotting</i> del plasma de los familiares de la variante situada en DRP1	25
Figura 13. <i>Western blotting</i> del plasma de los familiares de la variante situada en ACAD9.....	25
Figura 14. Posible efecto en el splicing alternativo del pre-mRNA de <i>KIF5A</i> , predicho por el software de análisis <i>Human Splicing Finder</i>	27
Figura 15. Expresión génica de <i>KIF5A</i> los miembros de la familia con la variante c.2993-9T>G	27
Figura 16. <i>Western blotting</i> del plasma de los familiares de la variante c.2993-9T>G, y la variante c.566C>T, ambas en <i>KIF5A</i>	28
Figura 17. Posibles vías de splicing alternativo en las mutaciones en las regiones consenso intrónica colindantes al exón 27	28
Figura 18. Expresión génica de <i>SETX</i> en los miembros de la familia con la variante p.R111*	29
Figura 19. <i>Western blotting</i> de las proteínas del plasma sanguíneo de los familiares relacionados con la variante p.R111* en <i>SETX</i>	31

Abreviaturas

% GC: Porcentaje de guanina y citosina.

A: Adenina.

Aa/aa: aminoácido.

ACAD9/ACAD9: *Acil-CoA Deshidrogenase 9*.

ATP: Adenosín-5'-trifosfato

C: Citosina.

cDNA: ácido desoxiribonucleico complementario (*complementary Desoxiribonucleic Acid*).

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DNM1L: Dynamin 1-Like.

DRP1: *Dynamin Related Protein 1.*

ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica (*ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis*).

fs: cambio de pauta de lectura (*frame shift*).

FTD: Demencia frontotemporal (*Frontotemporal Dementia*).

G: Guanina.

GTP: Guanosín-5'-trifosfato.

ICC: Inmunocitoquímica.

KIF5A/KIF5A: Kinesina 5A (Kinesin Family Member 5A)

LMN/UMNs: neuronas motoras inferiores/superiores (*Lower/Upper Motor Neurons*).

MC: Medio de congelación.

MCCF: Medio completo de cultivo de fibroblastos.

MCIA: Complejo de ensamblaje del Complejo I mitocondrial (*Mitochondrial Complex I Assembly Complex*).

mRNA: ácido ribonucleico mensajero (*messenger Ribonucleic Acid*).

NMD: *Nonsense-Mediated mRNA Decay.*

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man.

OPA: Atrofia óptica (*Optic Atrophy*).

pb: Pares de bases.

PFA: Paraformaldehído.

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (quantitative Polymerase Chain Reaction).

RGs: Células ganglionares de la retina (*Retinal Ganglion Cells*).

RT: Retrotranscripción.

SETX/SETX: Senataxina.

SNP: Single Nucleotide Polimorfism.

SPG10: Paraplegia espástica 10 (*Spastic Paraplegia 10*).

T: Timina.

T_m : Temperatura de fusión (*melting temperature*).

1.- Introducción

Un amplio número de patologías humanas se relaciona directamente con la constitución genética presente en el individuo afectado. Los descubrimientos genéticos de las últimas décadas han ayudado a entender los mecanismos moleculares defectuosos que entran en juego en muchas enfermedades. Las afecciones cuyas raíces son alteraciones en el código genético humano representan un entorno al 80 % de las enfermedades raras descritas, afectando actualmente al 5 % de los recién nacidos en la población europea, y estando relacionadas en cerca del 70 % de las interrupciones de embarazo a nivel global. Dependiendo de los cambios genéticos y de la región genómica dónde se encuentren, pueden acarrear un efecto mayor o menor en cierta enfermedad, y pueden aparecer tanto en el genoma nuclear, como en el mitocondrial y en el metagenoma microbiano (Claussnitzer et al.; 2020; Roth & Marson, 2021).

Las modificaciones que dan lugar a las bases genéticas de la enfermedad son muy variadas, y entre las cuales se pueden encontrar: errores en el número y estructura de los cromosomas, variaciones epigenéticas, cambios en un solo gen o en familias génicas, entre otros. (Claussnitzer et al.; 2020; Jackson et al.; 2018). Para el estudio del efecto de estos cambios se emplea la genética molecular, una rama exitosa y descendiente de la biología molecular que se encarga principalmente de dilucidar la variabilidad del material genético, así como su expresión y regulación tanto en procesos celulares como sistémicos. Nuestra investigación trata de obtener una conexión directa entre la genética y la función de los genes.

Las herramientas que proporciona la genética molecular están ayudando cada vez más a definir los mecanismos moleculares involucrados en diversas patologías que aún no habían sido caracterizadas previamente, e incluso pueden esclarecer nuevos métodos de tratamiento. Algunas de estas aplicaciones son las tecnologías de *Next-Generation Sequencing (NGS)* y el genotipado masivo, que han servido para recopilar mucha información sobre el genoma humano (Cheng & Geschwind, 2022). La genética molecular se lleva usando durante muchos años, por ejemplo, en la enfermedad neurodegenerativa de Huntington's Disease (HD) (OMIM#143100), para obtener una explicación de la patogénesis y la identificación de genes relacionados (Gusella et al.; 1983)

El eje central de este estudio es el análisis funcional de diversas variantes encontradas con efectos potencialmente patológicos y que se relacionan directamente con la aparición de enfermedades. Concretamente, estos que estudiamos en este trabajo son de tipo neurodegenerativo, caracterizándose por una pérdida progresiva del funcionamiento de ciertos tipos celulares neurales que debilita la mecánica del sistema nervioso. Generalmente, tienen un amplio espectro sintomático clínico, y, aunque muchas veces se asocian a un acúmulo de proteínas, muchas de estas neurodegeneraciones se deben a deficiencias funcionales en los procesos básicos celulares que en algunos casos llevan a la célula neuronal a la muerte. Por ello, muchas de estas enfermedades no son sólo deficiencias en un gen, sino que comprenden un gran espectro de *locis* los cuales tienen importancia en la patogénesis (Checkoway et al.; 2011; Kovacs, 2019; Lill & Bertram, 2011)

1.1.- Estudio de variantes de una enfermedad rara caracterizada por atrofia óptica y ataxia.

Hay una familia formada por dos padres sanos, y los dos hijos. Los descendientes presentan ambos un cuadro sintomatológico complejo asociado a un trastorno neurológico. El cuadro clínico de los pacientes se presentaba desde edades muy tempranas, y los síntomas que acompañaban la

enfermedad eran varios: ausencia de reflejos, una actividad cerebral leve diagnosticada por un encefalograma lento, dificultades motoras para hablar correctamente (disartria), epilepsia, deterioro cognitivo leve asociado a un retraso mental, paresia de la mirada conjugada por la dificultad del movimiento ocular y disimetría en la prueba dedo-nariz debido a una baja sensibilidad posicional de los miembros inferiores y algo más leve en los superiores. Sin embargo, los síntomas más destacables fueron los siguientes tres.

El primero, el retraso en la capacidad motora, observable ya que hasta los 3 años de vida no empezaron a andar. El segundo, la ataxia progresiva, que se caracteriza por un mal funcionamiento del circuito nervioso en el cerebelo, los ganglios basales y el córtex cerebral, que desencadena una descoordinación y un desbalance muscular en las extremidades y ojos (Akbar & Ashizawa, 2015). Debido a esto, primeramente, fueron diagnosticados con Ataxia de Friederich (FRDA) [(Online Mendelian Inheritance in Man) OMIM# 229300] una enfermedad rara de herencia autosómica recesiva (Bürk, 2017; Pavone et al.; 2017). Pero los análisis genéticos del gen de la Frataxina (*FRDA1*) dieron negativo en la expansión de trinucleótido GAA como etiología de la enfermedad, por lo que se descartó esta posibilidad.

Y, por último, una atrofia óptica bilateral. Esta es una afección neuro-oftálmica caracterizada por una pérdida de la visión por degeneración de los nervios oculares, con defectos centrales y paracentrales y una disminución de la percepción de los colores, que aparece en los primeros años de vida. En esta familia, un hermano desarrolló ceguera total y el otro una importante reducción de la visión. Pero, esta atrofia óptica resulta de gran relevancia ya que los síntomas previos multi-sistémicos están relacionados con este tipo de atrofas. Epidemiológicamente, la prevalencia de la enfermedad ronda en torno a 1/30000, por lo que es considerada una enfermedad rara (Lenaers et al.; 2012).

Más concretamente, la atrofia óptica se caracteriza por ser una neuropatía que afecta al nervio óptico, principalmente a las células ganglionares de la superficie interna de la retina (RGCs). Estas células, pertenecientes al sistema nervioso central, no tienen la capacidad de regeneración, y forman los 1,2 millones de fibras nerviosas del nervio óptico con sus axones altamente mielinizados. Oligodendrocitos y astrocitos reactivos, además de mielinizar los axones, también emiten señales inhibitorias de regeneración. En cuanto a la patofisiología, al haber una gliosis o degeneración en las RGCs, también habrá un menor drenaje de sangre por los capilares neurovasculares progresivamente reducidos (Amore et al.; 2021; Lenaers et al.; 2021; Toffoli et al.; n.d.). Todo ello, contribuye a una palidez del disco óptico y una pérdida de la visión, producida por falta de sinapsis retinogénica.

No obstante, las atrofas ópticas son un grupo muy heterogéneo que puede tener una etiología muy variada, como, por ejemplo: pueden ser neuropatías ópticas congénitas (sindrómicas o no sindrómicas); pueden surgir por una compresión extrínseca tumoral, o bien por tumores intrínsecos del nervio óptico, deficiencias metabólicas, alteraciones vasculares, o por algún traumatismo en la zona. No obstante, el grado de la enfermedad no depende de la etiología (Ahmad & Kanukollu, 2023).

En el caso que se va a estudiar, la causa de la enfermedad es de origen genético por lo que se trata de una atrofia óptica congénita aislada. Dentro de esta clasificación encontramos las siguientes enfermedades: atrofia óptica dominante o recesiva, neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON, OMIM #535000) y la atrofia óptica hereditaria de Behr (OMIM #210000). La segunda de ellas se caracteriza por tener variantes patológicas en el ADN mitocondrial, y se presenta con una pérdida de vista dolorosa a la segunda o tercera década de vida (Shemesh et al.; 2023). En contraste, el síndrome de Behr presenta una pérdida de visión muy temprana con degeneración espinocerebral cuyos efectos suelen ser sistémicos y terminar en ataxias y retrasos en el desarrollo (Bonneau et al.; 2014).

La atrofia óptica (OPA) hereditaria puede estar producida por variantes patogénicas en distintos genes (Tabla 1), aunque el que mayormente se encuentra mutado es el OPA1, en el 75 % de los casos (Lenaers et al.; 2021). En el síndrome de Behr, también se encuentran mutaciones en este gen, pero estas son homocigotas o heterocigotas compuestas, resultado en un fenotipo más severo (Bonneau et al.; 2014).

Tabla 1. Atrofias ópticas cuyas bases moleculares han sido definidas. Se puede obtener más información en la base de datos OMIM junto con el número y símbolo correspondiente. Las atrofias ópticas con el símbolo # antes de los dígitos, son aquellas cuyos fenotipos están definidos y se conoce su base molecular. En cuanto a la herencia las siglas son referentes a: autosómica dominante (AD), autosómica recesiva (AR) o ligada al cromosoma X (XL). La tabla es una adaptación de Toffoli et al. (n.d.).

Subtipo	OMIM	Herencia	Gen mutado	Localización cromosómica
OPA1	#165500	AD	<i>OPA1</i>	3q29
OPA3 con cataratas	#165300	AD/AR	<i>OPA3</i>	19q13.32
OPA5	#610708	AD	<i>DNM1L</i>	12p11.21
OPA7	#612989	AR	<i>TMEM126 A</i>	11q14.1
OPA9	#616289	AR/AD	<i>ACO2</i>	22q13.2
OPA10 con o sin ataxia, retraso mental y convulsiones	#616732	AR	<i>RTN4IP1</i>	6q21
OPA11	#617302	AR	<i>YME111</i>	10p12.1

Como se observa en la Tabla 1, este tipo de atrofias ópticas son variadas, pero destaca sobre todo las implicaciones mitocondriales que hay en las proteínas involucradas en las OPAs cuyas bases moleculares son conocidas. Por ejemplo, la OPA1 es una GTPasa mitocondrial de tipo dinamina codificada por el genoma nuclear y que se dispone en la membrana interna, regulando la estabilidad, el drenaje energético y la fusión mitocondrial (Frezza et al.; 2006). Por su parte, OPA3 es una proteína que se sitúa en la membrana externa mitocondrial y participa en el proceso de fragmentación de la mitocondria controlando la longitud del propio orgánulo (Ryu et al.; 2010). También, en el subtipo OPA9 encontramos mutada la *ACO2*, la *aconitasa mitocondrial 2*, la cual participa en el ciclo de Krebs utilizando el citrato y el piruvato como sustratos (Charif et al.; 2021).

En la Tabla 1 no aparecen aquellas atrofias ópticas cuyas bases moleculares no han sido descritas todavía aunque sí se puede conocer el locus en el que se encuentre el defecto genético. Estas atrofias ópticas son: OPA2 [OMIM %311050], OPA4 [OMIM %605293], OPA6 [OMIM %258500] y OPA8 [OMIM %616648]. En este caso el símbolo % en la base de datos OMIM, significa que las bases moleculares de estas enfermedades no están definidas, pero sí el fenotipo.

1.1.1.- Detección de las variantes potenciales

Con tal de esclarecer las bases de la enfermedad que padecían los hijos de la familia, previamente se llevó a cabo un estudio genético de *Whole Exome Sequencing* (WES) de la familia. Esta es una estrategia eficiente para el estudio de enfermedades raras ya que parte de una hipótesis *a priori*, en la que se asume que la variante se encuentra en una zona del exoma, por lo que se analizó el exoma de los

individuos (Brown & Meloche, 2016). En este caso, se utilizó la tecnología *Illumina*, mientras que para la secuenciación del genoma mitocondrial se utilizó *Nanopore sequencing* de *Oxford Nanopore Technologies*. Además, se realizó una confirmación de las variantes por Sanger, necesaria en este tipo de estudios por su tasa de error. Tras un proceso de filtrado por herencia, una priorización de variantes, y análisis bioinformáticos de modelización proteica *in silico* y del posible impacto de las variantes en *splicing* alternativo, regulación, transcripción, etc. Con este abordaje se pudieron obtener las variantes más posiblemente relacionadas con la enfermedad y que daban forma a la hipótesis principal que podría explicar el fenotipo.

Variante en DNM1L

Primeramente, se detectó una variante potencialmente patogénica en el gen *DNM1L* (*Mitochondrial Dynamin 1 – Like*), involucrado en la OPA5 (cómo puede verse en la Tabla 1). Este gen codifica para la proteína DRP1 (Dynamin Related Protein 1) la cual es una GTPasa de estructura homodimérica y con capacidad de unión a microtúbulos. La DRP1 cumple su función en la regulación de la fusión y fisión mitocondrial y peroxisomal, además de encontrarse involucrada en procesos de apoptosis y necrosis (Kraus et al.; 2021; Smirnova et al.; 2001).

La variante consiste en un cambio de citosina (C) a timina (T) en la posición 305 de la secuencia nucleotídica codificante (c.305C>T) y referenciada a la isoforma NM_005690.5. Se encuentra en el exón 5, que codifica para el dominio de unión y catálisis de GTP (GTPasa) cómo puede observarse en la Figura 1. La variante conlleva un efecto *missense*, no sinónimo y no conservativo produciendo un cambio aminoacídico de treonina a metionina en la posición 115 de la secuencia aminoacídica (p.Thr115Met). Esta localización corresponde al dominio GTPasa de la proteína como puede observarse en la Figura 1. Cabe destacar que este SNP (*Single Nucleotide Polimorfism*), fue previamente descrito por Hogarth et al. (2018) siendo su referencia: rs201929226 (ClinVar). Esta variante se ha visto asociada a retrasos en el crecimiento y problemas neurológicos. Además, ha sido predicha cómo deletérea por los predictores PMut y SIFT. Por otra parte, deficiencias en *DNM1L* por otras mutaciones se han visto involucradas en enfermedades como encefalopatías letales (Pan et al.; 2021; Yoon et al.; 2016), y otras afecciones neurológicas (Vanstone et al.; 2016).



Figura 1. Representación de los dominios estructurales de DRP1, dónde *GTPase Head* es el dominio GTPasa (*IPR001401*), *Middle* es el dominio medio (*IPR000375*), *VD* es el dominio variable y *GED* es el dominio GTPasa efector (*IPR003130*). La variante se encuentra en el dominio *GTPase Head* en el aa 115. Creado en BioRender.com.

Variante en ACAD9

Por otra parte, había una segunda variante de interés situada en el gen *ACAD9*. Este gen codifica para la proteína *Acyl-CoA Dehydrogenase Family Member 9*, la cual se localiza en la membrana interna mitocondrial y cataliza un paso limitante en la beta-oxidación de Acyl-CoA. Además, está formando parte del complejo MCIA (*Mitochondrial Complex I Assembly Complex*) implicándose en la formación del complejo I (Ensenauer et al.; 2005; Nouws et al.; 2010).

La variante es una delección del nucleótido timina (T) en la posición 359 de la secuencia nucleotídica codificante (c.359delT), referenciada a NM_014049.5 (Figura 2). Concretamente, en el aminoácido

número 120 se produce un cambio de pauta de lectura (*frame shift*, p.Phe120fs) pudiendo desestructurar la secuencia correcta de la proteína, o bien, estableciendo un codón de parada prematuro que fuera procesado por el *Nonsense-Mediated mRNA Decay* (NMD) (mecanismo celular que impide la expresión de proteínas truncadas o erróneas), entre otros posibles efectos. De hecho, el predictor SIFT como Mutation Taster coinciden en su efecto patológico, ambos señalando que causa NMD.

Previamente se había encontrado una variante similar cuyo cambio en la secuencia nucleotídica era c.358delT, que provocaba el mismo *frame shift*. En este estudio se observó un fenotipo de cardiomiopatía hipertrófica, con deficiencias en el funcionamiento del complejo I y en su mismo ensamblaje (Fragaki et al.; 2017). Estas últimas también se han encontrado relacionadas con problemas neurodegenerativos (Giachin et al.; 2016). También se han reportado otros casos de mutaciones en *ACAD9* que producen deficiencias en la respiración oxidativa, llegando en algunos casos a provocar la letalidad (Leslie et al.; 2016).

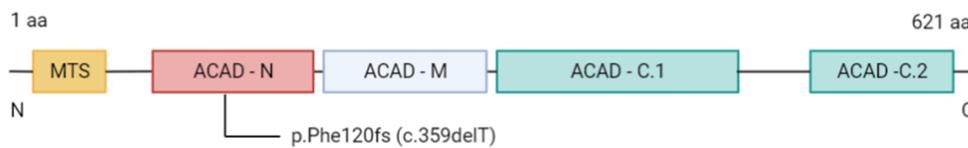


Figura 2. Dominios estructurales de *ACAD9* y localización de la mutación p.Phe120fs. *Mitochondrial Signal Peptide (MTS)* es un señalizador intracelular de localización de la proteína, y los dominios *ACAD* son dominio deshidrogenasas/oxidasas: N (N-terminal, *IPR013786*), M (Middle, *IPR006091*) y el C (C-terminal, dividido en C.1 y C.2, *IPR009075*). Creado en BioRender.com.

1.1.2.- Genotipo familiar

Tras la secuenciación del exoma de los familiares, fueron descritas las variantes previas que se distinguieron como potencialmente patológicas ambas conjuntamente por lo que se consideraron las dos para este estudio. El genotipo del padre (código de muestra: 157SF), el de la madre (158SF), y el de los hijos (159SF y 160SF), fue validado para las dos variantes del apartado 1.1.1. En la Tabla 2, la siguiente, puede observarse el genotipo de cada uno de ellos y cuales presentan la enfermedad.

Tabla 2. Genotipo de la familia. Cuando aparecen las variantes se encuentran en heterocigosis en los individuos, menos en los que no se encuentra la variante.

Individuo	Código de muestra	Variante en DNM1L (c.305C>T)	Variante en ACAD9 (c.359delT)	Fenotipo
Padre	157SF	Heterocigosis	---	Sano
Madre	158SF	---	Heterocigosis	Sano
Hijo 1	159SF	Heterocigosis	Heterocigosis	Enfermo
Hijo 2	160SF	Heterocigosis	Heterocigosis	Enfermo

1.1.3.- Hipótesis principal

La principal idea que se barajaba era una sinergia en estrés oxidativo por parte de las dos variantes, ya que cuando están las dos a la vez en heterocigosis es cuando se presenta la enfermedad. Esto se debe a que en estudios previos dónde la variante en DNMT1L fue definida, las mitocondrias tenían una arquitectura y crecimiento alterados, al igual que una alta producción de ROS (especies reactivas del oxígeno). También, se observaron altos niveles de γ -H2AX (marcador de ruptura de ADN) y potencial de membrana reducido, que son ambos marcadores representativos de estrés y disfunción mitocondrial (Hogarth et al.; 2018). Por otra parte, la variante presente en ACAD9 es un cambio de pauta de lectura el cual posiblemente cambie la estructura de la proteína, cree algún codon de parada temprano o afecte directamente a la expresión génica, disminuyendo la cantidad de ACAD9. Deficiencias en esta proteína han sido asociadas a una actividad deficiente en el complejo I mitocondrial, que se traduciría en una producción deficiente de ATP y un aumento de la producción de superóxido, probablemente al escapar prematuramente los electrones del complejo ante la deficiencia de ACAD9 (Leipnitz et al.; 2018). Estos mecanismos moleculares alterados se han visto previamente involucrados en atrofas ópticas y otras enfermedades neurodegenerativas en las cuales el funcionamiento mitocondrial se vería mermado hasta dificultar la viabilidad de ciertas neuronas (Maresca et al.; 2013).

1.2.- Variantes relacionadas con la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)

El laboratorio fue contactado para realizar el análisis funcional de diversas variantes encontradas en familias con algún componente que padecía esclerosis lateral amiotrófica (ELA, [OMIM #105400]). La enfermedad consta de una lenta y progresiva neurodegeneración de las neuronas motoras con una supervivencia de 2 a 4 años tras su manifestación, conllevando la muerte del paciente. La ELA es una enfermedad prototípica dentro del extenso grupo de las causadas por fallos en las neuronas motoras. El cuadro clínico general de esta conlleva una debilidad muscular, atrofia generalizada progresiva y degeneración en las columnas laterales del tracto corticoespinal (Verma, 2021). La epidemiología de la enfermedad describe una prevalencia que ronda entre 4,1 y 8,4 personas por cada 100000, generalmente, pero suele variar entre continentes y países. (Longinetti & Fang, 2019).

La neuropatogénesis de la enfermedad viene dada por la pérdida de las neuronas motoras inferiores (LMN, del inglés *lower motor neurons*) también conocidas como las células de Betz de la lámina V del área 4 de Brodmann, y las neuronas motoras superiores (UMN, del inglés *upper motor neurons*) que són las neuronas alpha motoras en el núcleo motor del torncio encefálico y de las astas anteriores de la médula espinal. Esta degeneración axonal puede ser observada, por ejemplo, en el corpus callosum o en el pedúnculo cerebral en el caso de las UMN, mientras que en caso de LMN, en los nervios periféricos, produciendo una denervación de los músculos. También, es característica una gliosis, es decir, una mayor producción de células gliales y una proliferación inadecuada de las microglías (Grad et al.; 2017; Lyon et al.; 2019). Además, en algunos casos se observan también elevado número de inclusiones citoplasmáticas y algunos agregados proteicos, que relacionan esta enfermedad con otras cómo las enfermedades de párkinson [OMIM #168601] y alzhéimer [OMIM #104300] (Jackson et al.; 1996).

Dependiendo del grado de degeneración en las LMNs y/o UMN, existen diversos subtipos de ELA. El tipo clásico (*Classical Amyotrophic Lateral Sclerosis*) involucra los fallos de ambas clases celulares neuronales. Otra categoría sería la atrofia muscular progresiva (*Progressive Muscular Atrophy*) donde sólo se verían involucradas las LMNs y que suele ser más frecuente en hombres, diferenciándose de la clásica por la apenas existencia de reflexos musculares y el indetectable daño corticoespinal. Por otra

parte, el subtipo bulbar (*Progressive bulbar palsy*) se caracteriza por signos predominantes de debilidad muscular en la zona bulbar (cara, garganta, etc.) causado por degeneración de LMNs. Y, por último, la primaria (*Primary Lateral Sclerosis*), presentándose entorno al 2-4 % de los casos, dónde solo se observa daño en el tracto corticoespinal. Estas clases de ELA son de necesaria diferenciación por la prognosis especial de cada tipo, siendo la clásica la más severa (Verma, 2021).

La etiología de la enfermedad es bastante compleja, ya que todavía no se han definido las bases moleculares concretas debido al gran número de genes que pueden estar implicados en la patogénesis. Por ello, hay gran variedad de procesos y mecanismos celulares que se han relacionado con la ELA, como el procesado del RNA, el tráfico interno proteico, formación del citoesqueleto y las dinámicas del axón y la mitocondria (Tabla 3). Esto hace que estudiar la enfermedad sea un reto de comprensión ya que el grado de complicación genotípico y fenotípico es elevado. De entre los más de 50 genes cuyas variantes patológicas han formado parte de genotipos de pacientes enfermos por ELA, destacan *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* y *C9ORF72*, los mecanismos específicos en los cuales están involucrados se pueden ver en la Tabla 3 (Mejzini et al.; 2019).

Así mismo, tampoco existe una herencia clara de la enfermedad sólo contando con un 10 % de casos de ELA familiares (fALS), es decir, en los que existe algún otro familiar que la padezca o tenga un fenotipo vinculado. En estos casos, los genes afectados suelen ser más recurrentes, es decir, aparecen en mayor porcentaje de enfermos. El resto (90-95 %) son esporádicos, en los que no se encuentra ninguna aparición previa de la enfermedad en la familia (sALS), y en el 92,6 % de los casos aparecen genes involucrados cuyas funciones no habían sido vinculadas previamente a la enfermedad, o bien, no son conocidas (Mejzini et al.; 2019).

Tabla 3. Los genes que más se ven involucrados en la ELA, junto con las proteínas que codifican y las funciones celulares que estas cumplen en situaciones normales. Además, se presentan los diferentes porcentajes de las apariciones de mutaciones en estos genes en pacientes de fALS (familiar) y sALS (esporádica) en Europa. También, el porcentaje de aparición de mutaciones en genes no tan recurrentes (otros) o desconocidos. Adaptada de la información descrita por Mejzini y sus colaboradores en 2019.

Gen	Proteína (en inglés)	Funciones	% fALS*	% sALS*
<i>TARDBP</i>	TAR DNA-Binding Protein, 43kd (TDP43)	Regulación del splicing alternativo, transporte de RNA, biogénesis de miRNA	4,2	0,8
<i>FUS</i>	Fused in sarcoma	Regulación del splicing alternativo, transporte de RNA, mantenimiento de la integridad del genoma	2,8	0,3
<i>C9ORF72</i>	Guanine nucleotide exchange C9orf72	Regulación de la transcripción y splicing, movimiento endosomal, autofagia	33,7	5,1
<i>SOD1</i>	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Antioxidante citosólico	14,8	1,2
Otros/Desconocidos			44,5	92,6

*Estos porcentajes sólo son representantes del continente europeo.

En la Tabla 3, dentro de los genes Otros/Desconocidos, se encuentra un amplio repertorio de funciones y nuevas variantes identificadas como patogénicas pero que todavía no se ha realizado el análisis funcional profundo sobre estas, aportando un grado más de complejidad al estudio etiológico de la

enfermedad. En este trabajo, se contemplan tres familias en las cuales se han descrito variantes posiblemente patogénicas y que tienen algún miembro afectado por la esclerosis lateral amiotrófica. Por ello, se abordará el análisis funcional de cada una de las variantes descritas.

1.2.1.- Variantes descritas

Variantes en KIF5A

En las familias 70 y 42, presentes en la Figura 8, se encontraron variantes en el gen *KIF5A*. Este codifica para la proteína *KIF5A* (*Kinesin Family Member 5A*) la cual está involucrada en el transporte intracelular de orgánulos a través de los microtúbulos con hidrólisis de ATP (adenin-trifosfato). Cabe destacar que mutaciones en *KIF5A* también se han asociado previamente con la parapareia espástica autosómica dominante 10 (SPG10) [OMIM# 604187] (Carosi et al.; 2015) y con la mioclonía neonatal intratable (NEIMY) [OMIM # 617235] (Duis et al.; 2016).

La primera variante, localizada en la familia 70, consiste en un cambio de T a C en una región intrónica del gen (c.2993-9T>G, Figura 3), 9 pares de bases antes que el inicio del exón, y referenciada para la isoforma NM_004984.4. Concretamente en el intrón 27 del gen, presente en todas las isoformas del mRNA, y que tras un estudio informático se identificó como posiblemente patogénica ya que afecta a una secuencia consenso de *splicing* alternativo. Una variante parecida fue descrita por (Saez-Atienzar et al.; 2020), el cambio c.2993-14T>G, presente en heterocigosis, alteraba un sitio consenso de *splicing* y evitando la traducción del exón 27 perteneciente a la cola C-terminal de la proteína. En este caso, la variante era claramente patogénica y estaba asociada a ALS y FTD, ya que varios miembros de la familia estudiada contaban presentaban estos fenotipos.

La segunda variante, fue localizada en la familia 42, y consiste en un cambio de C a T en la posición 566 del cDNA (c.566C>T) [NC_000012.12:57567189:C:T, rs140144799], referenciada para la isoforma NM_004984. Este produce un cambio no sinónimo (*missense*) y no conservativo en la posición 189 de la secuencia aminoacídica sustituyendo serina por leucina: p.S189L (Figura 3). Pero, precisamente, esta variante no es predecida de ser patogénica, según la información proporcionada por *Varsome* (<https://varsome.com/variant/hg38/rs140144799>). La localización del cambio es en el dominio motor de *KIF5A*, han sido previamente asociadas con ELA, SPG10 y Charcot-Marie-Tooth de tipo 2 (CMT2) [OMIM # 118210] (Crimella et al.; 2012).

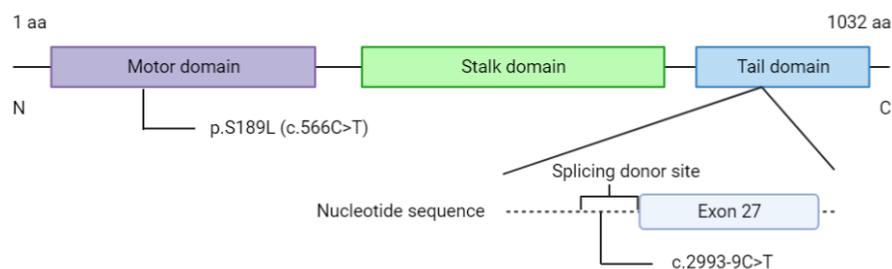


Figura 3. Dominios estructurales de *KIF5A* y localización de las variantes descritas. El *Motor domain*, que es el motivo catalizador que contiene la ATPasa (*IPR001752*), el *Stalk domain* sirve para la dimerización de las kinesinas, y el *Tail domain*, es el dominio C-terminal donde se carga lo que se va a transportar. Creado en BioRender.com.

Variante en SETX

Otra variante encontrada en una paciente con ELA atípica con evolución lenta, en otra familia diferente, se detectó en el gen *SETX*. Este gen codifica para la senataxina, la cual contiene un dominio helicasa DNA/RNA en su extremo C-terminal, lo que sugiere que puede estar implicada en el procesamiento de

DNA y RNA. Previamente, se ha asociado deficiencias en esta proteína con la esclerosis lateral amiotrófica de tipo 4, juvenil y autosómica dominante [OMIM #602433] (Kannan et al.; 2022); y con una ataxia espinocerebral autosómica recesiva con neuropatía axonal [OMIM #606002] (Duquette et al.; 2005).

La variante que se describió fue un cambio nucleotídico de C a T en la secuencia codificante (c.331C>T) y referenciada a la isoforma NM_001351527.2. La variante encontrada es sin sentido (*nonsense*) y produciría un codón de parada prematuro. Posiblemente, la proteína no se traduciría entera, dejando de ser funcional, o bien, se induciría el mecanismo de control de calidad *RNA non-sense mediated decay*. Este codón de stop reemplazaría una arginina (R) y en la posición 111 proteica ya no se añadirían más aminoácidos: p.R111* (Figura 4). Normalmente, los sistemas de predicción bioinformáticos conciben estos cambios como patogénicos, pero aun así deben ser estudiados.

No se tiene árbol de la familia, debido a que sólo se posee la información de que la persona afectada es una mujer de 45 años y de su hermana que no. De aquí procede la atipicidad de esta ELA, debido a que mutaciones en SETX que produzcan este fenotipo hacen que la enfermedad se presente antes, normalmente, de los 25 años.



Figura 4. Dominios estructurales de SETX y localización de la mutación p.Arg111*. NLS es el *Nuclear Location Signal*, mientras que *Helicase domain*, es el dominio de tipo: *DNA2/NAM7-like helicase* (IPR045055). El dominio N-terminal es solamente de unión a otras proteínas.
Creado en BioRender.com.

2.- Objetivos

Las variantes descritas previamente han sido detectadas, pero no se ha estudiado si su presencia puede tener incumbencia en las enfermedades con las que han sido asociadas. El trabajo pretende esclarecer el efecto funcional de estas variantes, predichas como potencialmente patológicas, sobre las familias afectadas, corroborando al Objetivo de Desarrollo Sostenible: Salud y bienestar, de la Agenda 2030.

En primer lugar, se estudiará la atrofia óptica 5 asociada a ataxia y retraso del desarrollo, a través de los fibroblastos proporcionados por la familia afectada. La intención es ver el efecto funcional y patológico de estas variantes sobre las células, ya que, como se ha comentado anteriormente, cuando actúan en sinergia se presenta el fenotipo de la enfermedad. Este estudio se realizará mediante técnicas de RT-qPCR, para el análisis de la expresión génica, e inmunocitoquímica, con tal de visualizar si hay algún defecto en la dinámica mitocondrial del paciente.

En segundo lugar, se estudiarán las variantes relacionadas con la ELA, se pretende averiguar si tienen algún efecto patológico a través de las muestras de plasma sanguíneo y RNA. El abordaje del estudio en los tres casos será el mismo, a través de RT-qPCR para observar la expresión de mRNA, y *western blotting* para semi-quantificar la expresión proteica.

3.- Materiales y métodos.

3.1.- Estudio de las variantes en DNM1L y ACAD9

3.1.1.-Material biológico.

En el estudio de estas variantes se trabajó con cinco líneas celulares de fibroblastos, estas son un tipo celular que contribuye principalmente a la formación y mantenimiento del tejido conectivo. Estas células no están involucradas directamente en la OPA5, dado que, esta enfermedad se basa en una degeneración neuronal. Sin embargo, y a pesar de no ser células neurales, expresan las dos proteínas y sus variantes, por lo que igualmente podrá analizarse el efecto que estas tendrán en la dinámica mitocondrial, como ya se ha hecho en estudios previos de estas dos proteínas (Nouws et al.; 2014; Schmitt et al.; 2018). A los cuatro familiares se les realizaron las biopsias de piel, junto con un procesamiento de estas, un establecimiento de los cultivos de fibroblastos y la conservación de los crioviales, de 1mL con $5 \cdot 10^5$ células, se realizó en el CIBERER Biobank (Banco de Muestras Biológicas de Enfermedades Raras en Valencia, perteneciente al Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras). Estos fibroblastos siguen el árbol genético presente en la Figura 5, los hijos padecen la enfermedad ya que tienen ambas variantes en heterocigosis, mientras que los padres solamente siendo portadores de una de las dos variantes no padecen la enfermedad.

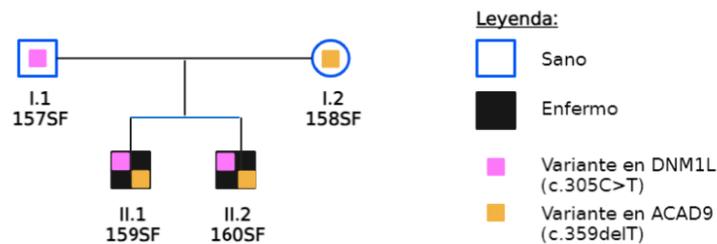


Figura 5. Árbol de la familia en la cual se van a estudiar las variantes en DNM1L y ACAD9, ya que los hijos tienen posesión de ambas y padecen los dos la enfermedad.

La última línea celular, es un control con fibroblastos normales (C1) que no poseen estas dos variantes y que no se ven afectados por ninguna otra mutación patológica. Estos son pertenecientes a una mujer de 24 años, y fueron extraídos de una zona de tejido muscular, sin concretarse ubicación exacta. La extracción, conservación y adaptación al cultivo primario de estos, se realizó en el Servicio de Medicina Genética del Institut de Recerca Pediàtrica al Hospital San Joan de Deu (Barcelona).

3.1.2.- Cultivo de fibroblastos.

El cultivo de los fibroblastos C1 se realizó en un laboratorio de cultivos de Bioseguridad 1, ya que se encontraban testados negativamente en ciertos patógenos. Por el contrario, los fibroblastos de las muestras de la familia tuvieron que ser cultivadas en un laboratorio de cultivos de Bioseguridad 2, ya que solamente se encontraban testadas negativamente para Micoplasma (según el protocolo del Ciberer Biobank: CBK-PE_012), por lo que las condiciones asépticas y los protocolos de manipulación de las muestras fueron más estrictos. Sin embargo, por lo general, el cultivo de las células no se diferenció en ninguna de las líneas siguiéndose las mismas pautas en los dos laboratorios. Se trabajaba en condiciones pulcras para evitar la contaminación de las muestras y de los aparatos y herramientas de uso. Así pues, se utilizaba siempre la campana de gases para estar en un ambiente con aire no

contaminado, se realizaban constantes desinfecciones con Etanol al 70 %, y se efectuaban protocolos de esterilización con luz ultravioleta (UV) previos y posteriores al uso de las cabinas.

El medio de cultivo completo de fibroblastos (MCCF) está formulado por DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco), al 10 % en FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco), 1 % en antibiótico (Gibco Penicilina-estreptomicina), 1 % en L-glutamina (Gibco) y 1 % de piruvato sódico (Gibco). Dependiendo de las necesidades del medio de cultivo se realizaban las cantidades necesarias en el momento y en caso de que sobrara MCCF se guardaba en la nevera a 4°C para un uso posterior del mismo.

Los crioviales contienen un medio diferente del MCCF, ya que para la conservación de las células se utiliza un conservante denominado DMSO (dimetilsulfóxido). El medio de congelación (MC) estaría formado por DMEM al 10 % de FBS y 30 % de DMSO, este último es una pieza fundamental en el MC debido a que evita la formación de cristales de hielo durante el proceso de congelación. En el caso de que se diera esta situación, las células se destruirían perdiéndose así gran parte de la muestra. Sin embargo, el DMSO es tóxico para las células por lo que se ha de eliminar con la máxima brevedad posible tras la descongelación del criovial. Para ello, se diluía la muestra en más MCCF y se centrifugaba con tal de conseguir un pellet lleno de células. Con una bomba de vacío se elimina el medio presente, en el que estará el DMSO, y las células se resuspenden en MCCF (Figura 6).

Debido al considerable tamaño y ratio de crecimiento de los fibroblastos se decidieron cultivar en frascos Roux de 75cm² de área de tapón con filtro, además de ser adecuado para el cultivo de células adherentes. Para ello las células previas se diluían en un total de 30 mL de MCCF y se dejaban crecer en el incubador a 37°C y 5 % CO₂. El primer cambio de medio se realizaba a las 24h, por si todavía había presencia de DMSO (aunque estaría tan diluido que sería raro que afectara a las células). Posteriormente, se realizaban cambio de medio cada 48h y se dejaba crecer. El estado de crecimiento de las células se observaba con su confluencia, la cual es el porcentaje del área cubierta por estas células adherentes. Cuando las células llegaban entorno a un 80-90 % de confluencia estaban listas para un nuevo pase, o bien para ser usadas experimentalmente, o bien para guardar alícuotas congeladas. Por el contrario, si se dejaban crecer más, muchas de ellas no podrían crecer eficientemente por impedimentos de espacio y además entrarían en juego mecanismos de apoptosis y otras rutas de señalización que pueden afectar a lo que se quiere observar.

Cuando se adquiría la confluencia necesaria para avanzar a un siguiente estadio del experimento, se efectuaba la tripsinización de la muestra con tal de desanclar los fibroblastos adheridos al frasco. La tripsina es una enzima proteolítica que sirve de herramienta para la disociación de contactos intercelulares y la escisión de adhesiones a la superficie del recipiente. En este paso se efectuaba un tratamiento con tripsina-EDTA 0,05 % comercial (Gibco) precalentada a 37°C. Para un frasco Roux de T75, se eliminó el MCCF y se depositó la tripsina, dejándola actuar durante 1 minuto. Acto seguido, se deshechó el medio de tripsinización y se incubó 5 min a 37°C y 5 % CO₂ (Figura 6). Se resuspendieron las células en el volumen que fue conveniente de MCCF, dependiendo del uso posterior de ellas. Siguiendo el protocolo, se centrifugó la muestra, se eliminó el MCCF con tal de evitar los resquicios de tripsina en el medio, y se volvió a resuspender en el volumen conveniente.

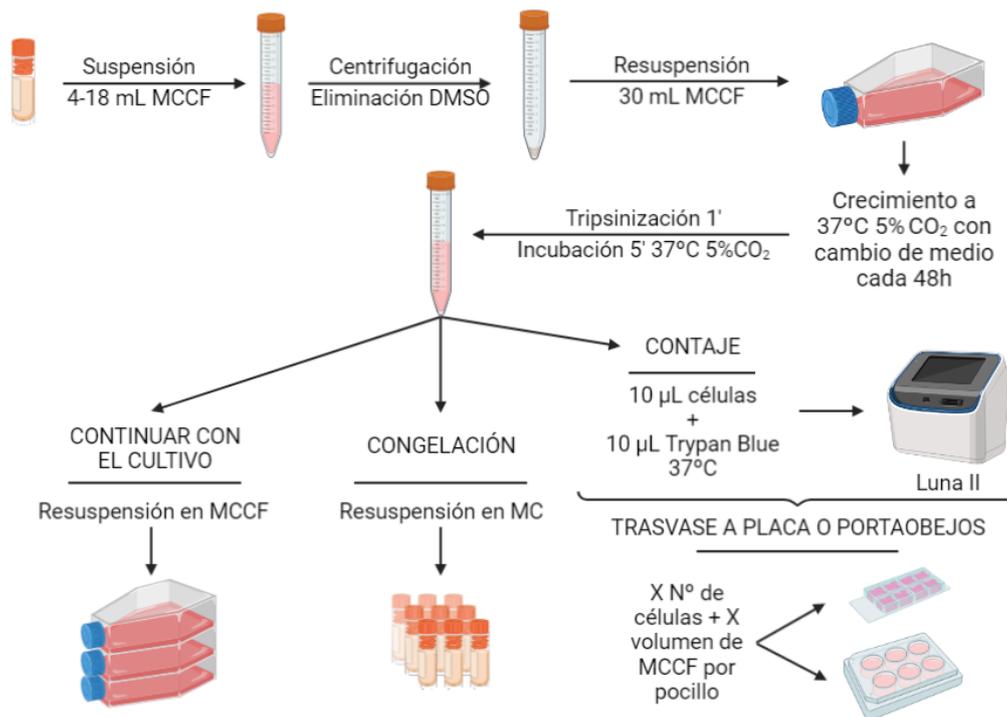


Figura 6. Flujo del cultivo de fibroblastos control y de pacientes. Se partía de un stock congelado y tras su crecimiento había tres vías, continuar con el cultivo, congelar las células y obtener más stock, o contar y plaquear las células para posteriores experimentos. La tripsinización se realizaba cuando el frasco Roux llegaba a una confluencia de 80-90 %. Creado en Biorender.com.

En el caso de continuar el crecimiento en frascos Roux, se debía realizar el pasaje de células a otro frasco en una dilución mayor. Por lo tanto, según los frascos que se quieran sembrar de fibroblastos y el tiempo que se necesite de cultivo, la dilución de resuspensión será una u otra. Otra opción sería sembrar en placas, para así tener un número más controlado de fibroblastos en cada pocillo de la placa para un proceso experimental posterior. A tal efecto, y tras la resuspensión de fibroblastos se procedió a un conteo celular haciendo uso del contador de células automático Luna II. Este contiene un portaobjetos reutilizable donde se añaden las células junto con Trypan Blue a 37°.

En el caso de no seguir trabajando con las células, se pueden desechar y matar con la bomba de vacío ya que el bidón de recolecta contiene Virkon, o bien se puede obtener un stock de congelación. Con este fin, tras la tripsinización, se resuspenderían las células en MC y se introduciría en los crioviales de 1 mL necesarios, dependiendo de la concentración a la cual se quieran guardar. Estos crioviales es conveniente que pasen por una congelación no tan drástica, por esto, la primera noche se depositan en ultracongeladores que llegan a -80°C, y al día siguiente se pueden guardar indefinidamente en tanques de nitrógeno líquido (-196°C).

3.1.3.- Extracción de proteína

De la placa de 6 pocillos, tres de ellos se utilizaron para la extracción de proteína de los fibroblastos. Para ello se siguió el protocolo de extracción típico del laboratorio en el cual se lavan los pocillos dos veces con PBS 1X (dilución obtenida a partir de PBS 10X de Gibco, marca de ThermoFisher). Se aplica una disolución de 100 µL al 98 % del tampón de lisis RIPA (50 mM TRIS-HCl, pH 7,4, con 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1,2 % Triton X-100, 0,5 % ácido desoxicólico, y 0,1 % SDS) y al 2 % de Inhibidor de Proteasas (Roche cOmplete™ Cóctel). Tras una incubación de 5 minutos en hielo, con raspadores de superficie se trata de recoger todos los fibroblastos posibles. Las muestras se sonicán durante 45

minutos y, posteriormente, se centrifugan para recolectar el sobrenadante dónde estarán las proteínas solubles de la muestra y se guarda a -60°C .

3.2.3.- Cuantificación de proteínas por el método Bradford

La cuantificación de proteína se llevó a cabo por el método Bradford. A través del kit comercial Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (ThermoFisher), se midió la cantidad de proteína extraída en las muestras.

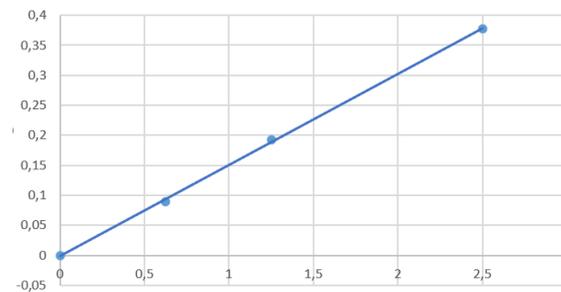


Figura 7. Curva patrón de BSA para la cuantificación de proteína mediante el método Bradford.

El kit lleva también unas muestras estándar de albúmina (BSA) para realizar una curva patrón dónde interpolar los datos en la línea de tendencia, de ecuación: $y = 0,1516x - 0,0008$ (Figura 7). Así se pudo determinar más aproximadamente la cantidad de proteína de las muestras proteicas de los fibroblastos.

3.1.4.- Extracción de RNA

Los tres pocillos restantes se utilizaron para la extracción de RNA transcriptómico de los fibroblastos. A tal efecto, se utilizó el kit de extracción *mirVana*TM miRNA Isolation Kit (proveniente de AmbionTM, de ThermoFisher). Este protocolo se basa principalmente en una separación por fenol-cloroformo y retención por columna del RNA total. Como pasos preeliminarios, se limpió la bancada y herramientas con RNase-ExitusPlusTM (producto de PanReac AppliChem – ITW Reagents), para mantener una zona limpia y evitar la contaminación por RNAsas, ya que destruiría el RNA presente en la muestra debido a su gran sensibilidad a la degradación. Con este fin, también se trabajó constantemente en condiciones de baja temperatura (en hielo).

Primeramente, se lavaron las muestras dos veces con PBS 1X, eliminando el MCCF con la bomba de vacío. Seguidamente, se desechó el PBS y se añadió Lysis/Binding Solution al pocillo, solución que estabiliza el RNA e inactiva las RNAsas presentes. Tras la espera de unos minutos, con un raspador se recogieron las células y se recolectaron en tubos Eppendorf. Estos tubos se sometieron a un vortex vigoroso con tal de que se produjera una lisis completa y la muestra estuviera lo más homogeneizada posible. Tras conseguir este mix, se trató cada muestra con ácido fenol-cloroformo con tal de separar los lípidos y proteínas de los ácidos nucleicos. Esto se debe a que el ácido fenol-cloroformo es más denso que el agua o disolución acuosa, y, al ser hidrofóbico, será inmisible con esta y atraerá a los lípidos de la muestra. Mientras que las proteínas se mantendrán en la interfase de las dos partes y los ácidos nucleicos permanecerán en la fase acuosa.

La recolección de la fase acuosa procurando no recoger parte de las otras fases asegura la posesión de los ácidos nucleicos totales. El paso de purificación final se realizó, siguiendo el protocolo comercial del kit, se procedió a los pasos de filtración en columna con tal de que el RNA se quedara enlazado o formando interacciones con el Filter Cartridge, que está formado por fibras de vidrio. Posteriormente,

se procedió a los pasos de lavados con las soluciones correspondientes proporcionadas por el kit. Finalmente, el paso de elución del RNA comprendía la adición de agua libre de RNAsas (Promega Corporation) que arrastrara los ácidos adheridos al filtro. Guardado a -60°C en ultracongeladores.

3.1.5.- Western Blot de las proteínas.

El análisis de las proteínas extraídas anteriormente se realizó por Western Blot, técnica ampliamente utilizada en los laboratorios de biología molecular para el estudio de la presencia, ausencia, peso molecular y/o semi-cuantificación de proteínas. En este caso se estudió la presencia de las proteínas que contenían las variantes patológicas: ACAD9 y DNM1L.

El proceso empezó con una SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis). A tal efecto, se formó el gel de poliacrilamida al 10 % con la ayuda de los materiales de la marca comercial Bio Rad. Este gel contiene SDS el cual es un detergente cargado negativamente que desnaturaliza la proteína uniéndose a las zonas hidrofóbicas de esta y haciendo que pierda su conformación nativa a la vez que estabiliza las cargas de esta. Asimismo, proporciona una ratio de carga-masa igual para todas las proteínas, por lo que estas solo migraran gracias a su tamaño. Las muestras se cargaron tras la adición del tampón de carga (*loading buffer*, 250mM Tris-HCl pH6,8; 40 % glicerol, 4 % SDS, 0,05 % azul de bromofenol y 5 % β -mercaptoetanol) y una desnaturalización a 95°C. Se dejó correr la electroforesis durante dos horas a 100 V. El marcador molecular usado es el peqGOLD Marker V (Avantor).

El paso siguiente fue la transferencia húmeda a una membrana de nitrocelulosa, mediante los utensilios apropiados y siguiendo el protocolo de Bio Rad. La cubeta se llenó con el tampón de transferencia 1X y se dejó correr durante dos horas a 80 V en una cámara fría debido a que se calienta mucho el tampón. Tras comprobarse que la transferencia se había completado, se tiñó la membrana con la disolución de Ponceau (Sigma) para la comprobación de que la proteína estaba presente en la membrana y no había ocurrido ningún error en el proceso. Tras los lavados correspondientes con TBS 1X - Tween 20, la membrana se cortó en dos partes para el estudio de ambas proteínas, procurando que quedará un poco de marcador en cada una de las partes.

En el bloqueo de la membrana se optó por la aplicación de una disolución al 1 % de leche en polvo en TBST, la cual servirá para bloquear las partes de la membrana que no han sido cubiertas u ocupados tras la transferencia, para así evitar luego la unión inespecífica de los anticuerpos. Tras este y los siguientes pasos del proceso se efectuaron lavados de las membranas con TBST.

A continuación, se realizó la detección de la proteína por marcaje indirecto, en el cual los anticuerpos primarios (Tabla 4) se aplicaron junto con la disolución de bloqueo previa a la disolución recomendada por el fabricante. Con tal de no consumir más anticuerpo del necesario, debido a que sus precios son bastante elevados, se hace uso de una prensa térmica para producir una bolsa pequeña dónde se introduce la membrana junto con 1 mL de disolución, dejándose *overnight* en movimiento y en cámara fría. Después de este paso, se aplicó el anticuerpo secundario (Tabla 4) en las mismas condiciones que le anterior, pero una hora solamente. Este se une a las fracciones constantes de los anticuerpos primarios y lleva enlazada la HRP (peroxidasa de rábano, en inglés: *horseradish peroxidase*), la cual con la adición del reactivo ECL Select Western Blot Reagent (Amersham) sobre la membrana y la catálisis de la reacción, produce luz. Esta quimioluminiscencia se detectó en el equipo Fujifilm LAS 3000 Imager, dónde se captararon las imágenes. Posteriormente, se analizaron las bandas por densitometría con la aplicación ImageJ, comparándolas con detecciones de actina como marcador.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en *western blotting* para observar la presencia de las proteínas ACAD9 y DRP1 en los fibroblastos. Los primarios son específicos de la proteína en cuestión, mientras que los secundarios van dirigidos a la fracción constante (Fc) de los anticuerpos primarios.

Nº	Tipo	Anticuerpo	Dilución	Inmunógeno	Marca comercial	Referencia
1	Primario	Rabbit polyclonal anti-ACAD9 antibody	1/1000	aa 50-150 de ACAD9 humana	Abcam	ab220386
2	Primario	Mouse monoclonal anti-DRP1 antibody [3B5]	1/1000	aa 1-710 de DRP1 humana	Abcam	ab56788
3	Primario	Anti-Actin antibody [S12-I]	1/1000	Extremo C-terminal de la Actina humana	Abcam	ab136905
4	Secundario	Mouse anti-rabbit IgG-HRP	1/5000	IgG de conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-2357
5	Secundario	m-IgGk BP-HRP	1/5000	Fragmento kappa de ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-516102

3.1.5.- Inmunocitoquímica.

Con tal de observar la dinámica mitocondrial y los cambios internos en la disposición de las proteínas se acudió a estudios de inmunocitoquímica (ICC) sobre los fibroblastos cultivados dirigidos a las proteínas de interés ACAD9 y DRP1. La ICC se realizó sobre todas las muestras: los fibroblastos control, y los de la familia. Se siguió el protocolo estándar proporcionado por la empresa Abcam, ya que los anticuerpos a utilizar en este proceso son procedentes de esta marca.

Preparación de la muestra

En un portaobjetos adaptado con doce pocillos delimitados por paredes de silicona se cultivaron fibroblastos hasta obtener una confluencia del 60 % en cada uno de los pocillos. En ICC no es muy recomendable que la confluencia sea alta debido a que, en este caso, las células estarían muy juntas y puede ser que afectara en la detección de la señal o la interpretación de las imágenes.

Preparación de reactivos

En primer lugar, y antes de empezar, se prepararon los reactivos necesarios para que el protocolo fuera fluido, sin ningún tipo de parón irregular. Con este fin, se preparó una dilución de PBS 1X desde un stock comercial de PBS 10X (Gibco). Se prosiguió con la preparación de PBS 1X al 4 % de Paraformaldehído (PFA, Scharlau) el cual estaba en estado sólido y requirió de un aumento del pH base con NaOH (hidróxido sódico) para que se diluyera completamente, además de la cabina de gases ya que es un reactivo tóxico. Continuadamente, se obtuvo el tampón de exposición del antígeno (Antigen Retrieval Buffer, ARB) el cual es una disolución 100 mM de Tris (sólido, Avantor), 5 % [peso/volumen] de urea (Scharlau) y a un pH estable de 9,5 regulado con la adición de HCl (ácido clorhídrico). También se realizó una disolución de PBS 1X al 0,2 % de Triton X-100 (Panreac), de la cual se obtuvieron dos disoluciones más: la primera de PBST al 1 % de Bovine Serum Albumin (BSA, ThermoFisher) y 22,52mg/ml de glicina (Scharlau), y la segunda, solamente al 1 % de BSA.

Fijación

La finalidad de este paso es parar por completo el metabolismo celular preservando intactos la morfología y estructura las células. Con tal fin, portaobjetos se trató 10 minutos con PBS 1X al 4 % PFA

a temperatura ambiente. La fijación con PFA es uno de los métodos más empleados debido a que tiene la habilidad de polimerizar y entrelazarse con subunidades y proteínas celulares adquiriendo en el citoplasma una conformación de red entramada que conserva y estabiliza eficientemente la morfología y la dinámica celulares del momento. Además, esta polimerización bloquea la actividad enzimática de la célula impidiendo así su viabilidad. A pesar de ser ampliamente utilizado en estos métodos, la toxicidad del PFA hace que los pasos en los que se está en contacto con el agente deban de realizarse en la cámara de gases o en un ambiente controlado (Burry, 2010; Cytochemistry et al.; 1985)

Recuperación del antígeno

En el proceso de fijación se establecen muchas interacciones que acaban en cambios moleculares a nivel de estructura proteica, lipídica, en ácidos nucleicos y en carbohidratos. Por lo que la capacidad antigénica de muchas de estas moléculas se pierde. La recuperación del antígeno se ha convertido en un método esencial para ICC ya que, con la rotura de las conexiones formadas por el PFA, el establecimiento de nuevos huecos, y la estabilización, renaturación y rehidratación de las proteínas se repararían los epítomos perdidos. Se ha demostrado que con este método se aumenta la sensibilidad y especificidad en técnicas de inmunofluorescencia (Dabbs, 2008; D'Amico et al.; 2009; Krenacs et al.; 2010). Por ello, se utilizó Heat-Induced Antigen Retrieval, método por el cual el ARB se calentó a 95-100°C con el microondas en una cubeta, introduciendo el portaobjetos dentro y manteniendo la temperatura durante 10 minutos.

Permeabilización

Al ser las dos proteínas intracelulares, es imprescindible la permeabilización de la membrana con tal de mejorar la penetración del anticuerpo en la célula. En este caso, se utilizó una disolución de PBS 1X al 0,2 % de Triton-X100, el cual es un detergente no iónico que disuelve los lípidos de las membranas, disminuyendo la integridad de estas, pero facilitando la entrada de los anticuerpos (Jamur & Oliver, 2010).

Bloqueo e inmunotinción

El bloqueo se realizó con PBST al 1 % de BSA y 22,52mg/ml de glicina, dejando actuar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se introdujo el anticuerpo primario (Tabla 5) en su disolución correspondiente: PBST al 1 % BSA, y se mantuvo en cámara húmeda *overnight*. Al día siguiente, se trató el portaobjetos con el anticuerpo secundario (Tabla 5) en la misma disolución que la anterior, durante una hora a temperatura ambiente, pero en condiciones de oscuridad, para no dañar los fluoróforos.

Tinción DAPI

Con tal de tener una referencia para ubicar las células en el microscopio, se usó DAPI (ThermoFisher) para la tinción de los núcleos celulares. Éste se diluyó a una concentración de 1/5000 en PBS 1X y se incubó durante 15 minutos, en la cámara de gases, debido a su toxicidad.

Tinción mitocondrial

Al ser proteínas que ejercen su función en la mitocondria, se quiso aplicar un marcador fluorescente que tiñiese las mitocondrias para ubicarlas en la imagen y contrastar el posicionamiento proteico. A tal efecto, se decidió usar MitoTracker™ Orange CMTMRos (ThermoFisherç).

Montaje del portaobjetos y observación al microscopio

Para conservar la muestra y colocar el cubroobjetos, se hizo uso del líquido de montaje ProLong™ Glass Antifade Mountant (ThermoFisher) el cual se incubó durante 24h en condiciones de sequedad hasta

que se solidificara. Una vez estava listo ya se pudo observar al microscopio, en este caso se utilizó un microscopio confocal LSM 980 Airyscan 2 de la marca Zeiss.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en inmunocitoquímica para observar la presencia y posición de las proteínas ACAD9 y DRP1.

No	Tipo	Anticuerpo	Dilución	Inmunógeno	Marca comercial	Referencia
1	Primario	Rabbit polyclonal anti-ACAD9 antibody	1/1000	aa 50-150 de ACAD9 humana	Abcam	ab220386
2	Primario	Mouse monoclonal anti-DRP1 antibody [3B5]	1/1000	aa 1-710 de DRP1 humana	Abcam	ab56788
3	Secundario	Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1/1000	Inmunoglobulina gamma de ratón	Invitrogen	A10037
4	Secundario	Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG	1/1000	Fc de IgG de conejo	Jackson ImmunoResearch	111545046

3.2.- Estudio de las variantes en *KIF5A* y *SETX*

3.2.1.- Análisis bioinformáticos de las variantes

Con tal de predecir las posibles consecuencias moleculares y fisiológicas de las variantes encontradas en *KIF5A* y *SETX*, se llevaron a cabo diversos análisis bioinformáticos. Los softwares que se utilizaron y el motivo de su uso son los siguientes:

- *Human Splicing Finder* (HSF, <https://hsf.genomnis.com>): este software estudia el *splicing* del pre-mRNA y evalúa los potenciales sitios o motivos de *splicing* alternativo ante variaciones genómicas.
- *Mutation Taster* (<https://www.mutationtaster.org>): analiza la secuencia de los transcritos del gen en cuestión presentes en base de datos Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) y predice los posibles efectos adversos de la variante de estudio. Proporciona un *score* sobre los posibles cambios patológicos en la proteína.
- *PolyPhen2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/>): estudia variaciones *missense* en proteínas y predice la probabilidad de afección y patogenicidad con un *score*.

3.2.2.- Materiales biológicos

Las dos variantes de *KIF5A* y la de *SETX* fueron estudiadas de la misma manera, por ello se va a explicar conjuntamente el proceso. Las muestras de las diferentes familias fueron proporcionadas por el biobanco presente en el Hospital Universitario La Fe (Valencia).

En la familia 70, como se observa en la Figura 8, se conoce que el individuo I1 falleció por parálisis a la edad de 35 años, el individuo II2 falleció con 76 años diagnosticada de ELA tardía, el individuo II4 padeció algo parecido a II2 sin ser diagnosticado clínicamente, y el individuo IV.1 presenta la enfermedad a los 33 años. Las muestras de la familia 70, hay un total de 3 muestras de miembros de la familia, pero por problemas de privacidad no se pudo saber cuál de ellas pertenecía a cada miembro

(NeuroELA_879, NeuroELA_880 y NeuroELA_391). Y en la tercera familia, la afectada por la variante en *SETX*, las muestras pertenecen a un padre que padece la enfermedad (NeuroELA_1066) y a dos hijos, que no la padecen (NeuroELA_1098 y NeuroELA_1100).

En la familia 42 (Figura 8), solamente en la generación III se encuentran individuos con problemas previamente relacionados con defectos en *KIF5A*, como son la III3 que padece demencia frontotemporal (FTD) y tiene 79 años, y su hermana III1, de 71 años, que padece ELA en su subtipo *progressive bulbar palsy*. Se sabe que sus padre y madre, fallecieron a los 58 y 70 años, por un ataque al corazón y cáncer de mama, respectivamente. Además, su abuela, por parte de madre, padecía problemas mentales. Ninguno de estos fenotipos está directamente relacionado con la ELA, pero puede ser que fallecieron antes de que se presentaran los síntomas y signos correspondientes. las muestras de la familia 42 corresponden a dos hermanas, la primera de ellas es la que padeció ELA (NeuroELA_872), mientras que la hermana padece demencia frontotemporal, enfermedad altamente correlacionada con la ELA (NeuroELA_873).

De todas ellas, se recibieron muestras tanto de RNA cómo de plasma sanguíneo, a excepción de NeuroELA_391, en la cual, la extracción de RNA no funcionó y sólo se pudo obtener muestras del plasma. Cabe destacar que el genotipo de las muestras y de los familiares no se nos fue proporcionado por lo que solamente se trabajó con la idea de presencia o ausencia de enfermedad. Se intentó conseguir muestras de ADN genómico de los pacientes, para realizar el genotipado por secuenciación de ellos, pero tampoco fue posible debido a circunstancias temporales.

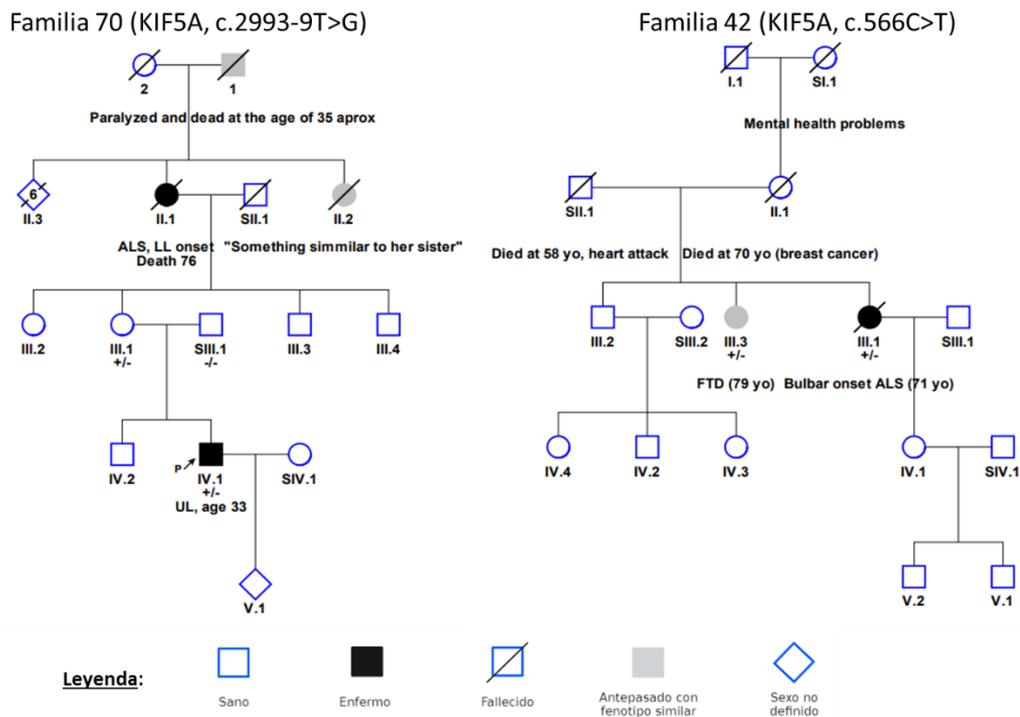


Figura 8. Pedigríes de las familias dónde fueron encontradas las dos variantes de *KIF5A*. Se proporciona toda la información que consta de las enfermedades que padecieron los individuos, con o sin relación con ELA.

En el caso de la familia con variante en *SETX*, no se tiene un árbol genético detallado de la familia. Solamente, se sabe que las muestras de RNA y de plasma sanguíneo son de un padre que padece ELA (NeuroELA_1066), y de sus dos hijos, todavía sin presentar síntomas en caso de tener la variante (NeuroELA_1098 y NeuroELA_1100).

Sin embargo, en ningunas de las familias se conoce el genotipo de los miembros muestrales ya que no se recibió esa información en ningún momento. Pero, muchas de las variantes involucradas en ELA se presentan en heterocigosis por lo que, es probable, que estas también estén en heterocigosis.

3.2.3.- Cromatografía de afinidad de las proteínas mayoritarias plasma sanguíneo

Las muestras proteicas pertenecían al plasma sanguíneo y este contiene ciertas proteínas que son altamente abundantes, de cerca del 95 %. La presencia de estas en ciertos experimentos, como el inmunoblotting, puede afectar a los resultados. Por ello y con tal de eliminar ese exceso, se usó el kit de eliminación de estas por cromatografía de afinidad a una resina: High-Select™ Top14 Abundant Protein Depletion Mini Spin Columns (ThermoFisher).

3.2.4.- Western blotting

Se realizó un western blot de protocolo estándar, cómo el explicado brevemente en el apartado 3.1.5.; pero esta vez, para la detección de las proteínas KIF5A y SETX se utilizaron los anticuerpos presentes en la Tabla 6. Las bandas se contrastaron por densitometría con la confirmación de la presencia de actina en el caso de KIF5A, mientras que se comparó por densitometría con la tinción de Ponceau en SETX. Los anticuerpos primarios provienen todos de conejo.

Tabla 6. Anticuerpos utilizados en western blotting para observar la presencia y intensidad de las bandas de las proteínas KIF5A y SETX.

Nº	Tipo	Anticuerpo	Dilución	Inmunógeno	Marca comercial	Referencia
1	Primario	Anti-Senataxin antibody [EPR24137-74]	1/1000	Un fragmento recombinante de SETX (no especificado)	Abcam	ab300439
2	Primario	Anti-KIF5A antibody	1/1000	Aa 508-800 de KIF5A humana	Abcam	ab154378
3	Primario	Anti-Actin antibody [S12-I]	1/1000	Extremo C-terminal de la Actina humana	Abcam	ab136905
4	Secundario	Mouse anti-rabbit IgG-HRP	1/5000	IgG de conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-2357

3.2.5.- Diseño de primers

Con tal de medir la expresión de ambos genes, a través de una RT-qPCR, se necesitaba del diseño de *primers* (cebadores) para la reacción. La intención era amplificar parte del cDNA correspondiente a los genes, con tal de encontrar señal validable, pero sin importar el tipo de mutación o variante presente. Gracias a la base de datos *UCSC Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu/>) proporcionada por la University of California Santa Cruz, se consiguieron las secuencias *RefSeq* (altamente curadas) de los genes e isoformas codificantes de los mismos, para analizarlas y obtener los *primers*. También, se contó con la ayuda de la herramienta de diseño *Primer-BLAST* que ofrece gratuitamente el *NCBI (National Center for Biotechnology Information)* Se siguieron los criterios de diseño recomendados por Rodríguez et al.; 2015:

- Con los *primers* se debía amplificar una zona constante en todas las isoformas de la proteína y del mRNA.
- La región entre los dos *primers* y presente en el mRNA debía contener intrones grandes con tal de poder, a posterior, diferenciar si había contaminación por DNA genómico, ya que, en este casual, se verían alterados los resultados.
- Tamaño del amplicón entre 150 y 400 pares de bases (pb) para una buena eficiencia.
- Porcentaje de guanina y citosina (% GC) mayor que 20 y menor que 80. Aunque el rango óptimo es entre 45 y 65 % GC.
- La temperatura de *melting* (T_m , temperatura a la que el 50 % del *primer* y su región complementaria están hibridando) entre los 50 y 65 °C.
- Tamaño del *primer* entre 15 y 30 pb.
- Que contuvieran una G o C en el extremo 3' para asegurar el enlace estable con la su región correspondiente.
- Los primers, tanto el forward (F) como el reverse (R) no formaran *hairpins* consigo mismos, o dímeros, comprobándose esta característica con la aplicación bioinformática *GeneRunner*.

Dado que en estudios previos del propio laboratorio ya se había tratado con el gen KIF5A, ya existían *primers* guardados en congelación comprados a la empresa IDT (*Integrated DNA Technologies*) (Tabla 7). Fueron cotejados para la viabilidad del proceso y un par coincidieron con los requisitos por lo que fueron aceptados. Mientras que los otros dos necesarios para el estudio de SETX fueron diseñados *de novo* y comprados a la misma empresa (Tabla 7).

Tabla 7. Cebadores utilizados para medir la expresión génica de KIF5A y SETX en las muestras de los enfermos y familiares.

Gen a amplificar	Amplicón (pb)	Nombre del <i>primer</i>	Secuencia (5'-3')	T_m (°C)	% GC
KIF5A	293	he_KIF5A_X5-F	CCTGGACAAAATTCGTGACCTTCT	70	45,8
		he_KIF5A_x8-R	CACTCCCTGCCAGGTCCACC	68	70
SETX	290	he_SETX_x12x13-R	GAAACAGTGGCACAAGAATGG	62	47,6
		He_SETX_x10x11-F	CCATTACGCATGACTGACG	58	52,6

3.2.6.- RT-qPCR

Del RNA que se tenía de los pacientes se utilizó, para obtener buena señal en la qPCR, un mínimo de 1 µg. Por lo que este se trató con DNAsa I (Roche), el buffer que proporciona el mismo kit (DNase I recombinant RNase-free, Roche), y un inhibidor de RNAsa, RiboLock (ThermoFisher). El motivo de este paso previo es la eliminación de la posible contaminación de la muestra por DNA genómico, minimizando así las posibilidades de señal de amplificación de este en la qPCR. Para la retrotranscripción, se hizo uso del *NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit* (NZYTech). Por ello, se siguió el protocolo del comerciante para obtener el cDNA y, posteriormente, degradar el RNA presente. En este caso se utilizó el mix de SYBR®Green (Aligent Technologies) para la PCR y se llevó a cabo en el aparato QuantStudio5 de ThermoFisher. Los datos obtenidos se analizaron a través del método $\Delta\Delta C_t$, por comparación a un control sano, y observar si la expresión variaba significativamente o no.

4.- Resultados y discusión

4.2.- Variantes en *ACAD9* y *DNM1L*

4.2.1.- Puesta a punto de la inmunocitoquímica

En el primer experimento de inmunocitoquímica se trató de detectar y localizar en la célula las dos proteínas en cuestión, *ACAD9* y *DRP1*. En la Figura 9.A se pueden observar las imágenes captadas por el THUNDER Imager Tissue (Leica) con el objetivo de 20X. Las imágenes fueron sometidas a una eliminación del ruido de fondo, para un mayor contraste con el fondo negro de la imagen. Sin embargo, las células se observaban lejanamente sin distinguirse bien en entramado mitocondrial y con este mismo microscopio, el aumento de 40X, no conseguía una resolución adecuada. Con las imágenes conseguidas se pudo valorar que, en el caso de la detección de *DRP1*, la inmunocitoquímica resultó ser inespecífica, ya que no se distinguía bien la localización mitocondrial y la señal obtenida provenía de gran parte de la superficie celular. En el caso de la detección de *ACAD9*, ocurrió algo semejante, aunque en esta no era tanta inespecificidad. Por ejemplo, se observaba que la señal fluorescente disminuía cuánto más se alejaba del núcleo, posiciones en las que se suelen ubicar las mitocondrias normalmente, en una zona intermedia del citoplasma.

Con tal de ajustar la especificidad del inmunoensayo en *DRP1*, se probó a variar la concentración de anticuerpo primario en distintas muestras y ver cuál era la más apropiada. En el mismo ensayo se probó el MitoTracker Orange (Aparece en un falso color en la Figura 9.B) para contrastar la posición del anticuerpo con la localización de las mitocondrias. También, se hizo uso del microscopio confocal con tal de mejorar la imagen y poder proporcionar un aumento mayor de hasta 63X. Los resultados no fueron los esperados, por lo que algún punto del proceso falló. Primeramente, la señal del MitoTracker se propaga por toda la célula uniformemente, por lo que se puede suponer que la tinción es inespecífica. La tinción fue igual en todas las muestras, por lo que, no se debió a una muestra en concreto. Probablemente no se aplicó en la concentración adecuada, o bien, el tiempo de incubación protocolario fue corto.

En la detección de *DRP1*, vuelve a observarse una tinción de la célula, en lugar de las mitocondrias, que es su localización habitual cómo ya se había comentado previamente. Por ello, se observa una señal inespecífica proveniente de la célula entera, incluso del propio núcleo. Tampoco se observa diferencia entre la variación de la concentración del anticuerpo primario, lo que sugiere que puede haber un problema en la eficacia del anticuerpo secundario, o bien, una errónea distribución del anticuerpo primario por unión a otros epítopos que no corresponden a los de la proteína en cuestión. Cabe la posibilidad de que las concentraciones de los anticuerpos primario y secundario no estén bien emparejadas, con la probabilidad de que uno se vea más descompensado y conlleve una deficiente especificidad general. Además, el color del MitoTracker no fue el mejor posible ya que su espectro de emisión solapaba con el del Alexa Fluor 568, por lo que pudo haber incrementos en la señal captada por ambas.

Hay múltiples factores que han podido afectar a la eficiencia de la inmunocitoquímica, y con ellos, múltiples soluciones a las que acudir según (Ward & Rehg, 2014). Por ejemplo, testar la calidad de los anticuerpos en ensayos extremadamente pulcros o variar ciertos pasos del protocolo de ICC que sean sospechosos de inadecuar la tinción, cómo la temperatura del paso *antigen retrieval*, o el método de fijación. Otra solución sería probar otros anticuerpos cuyas propiedades sean distintas, es decir, que

sea diferente el inmunógeno, la especie en la que está producido, su procesado de fabricación, sus características estructurales, entre otros aspectos.

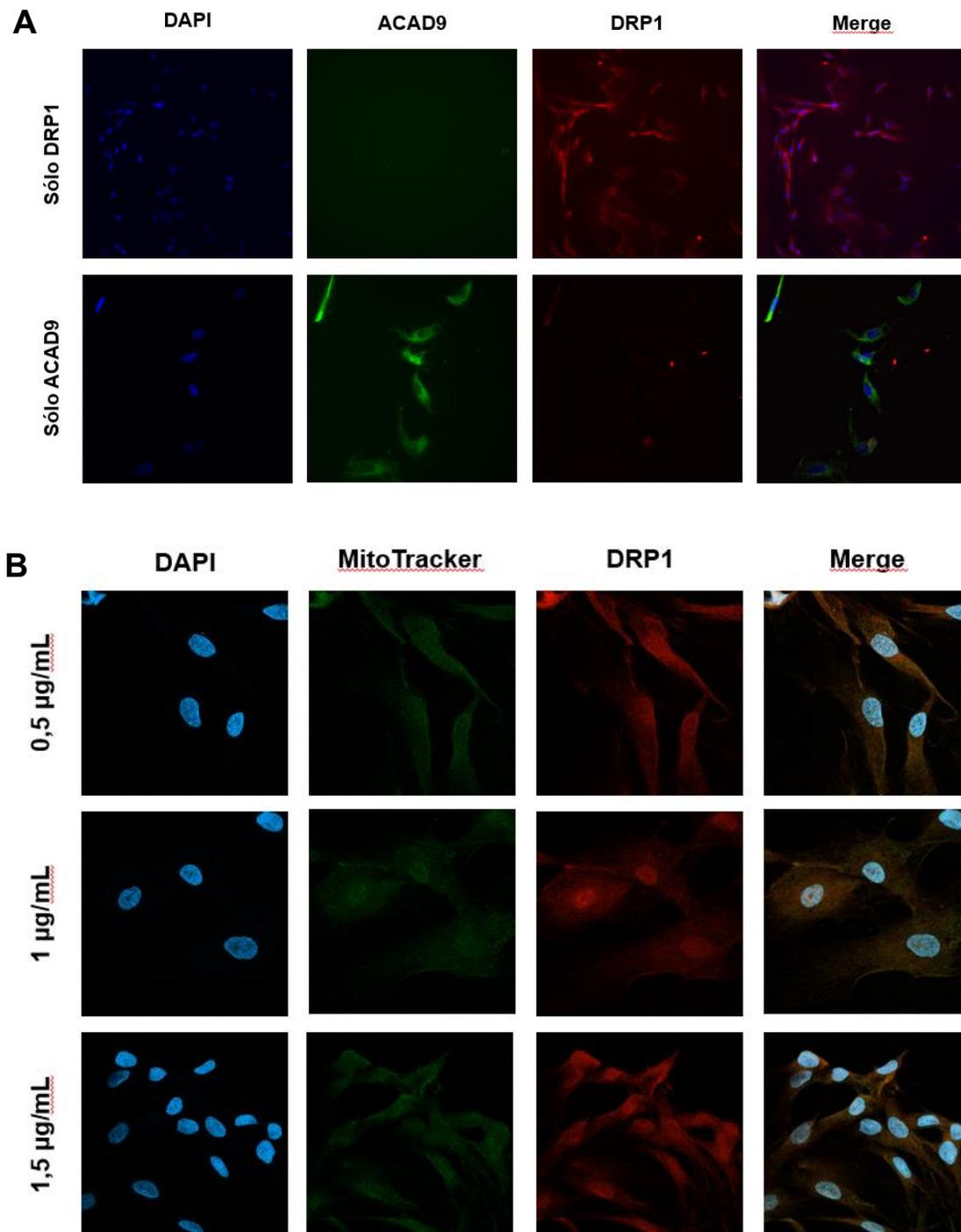


Figura 9. Pruebas de inmunocitoquímica para la detección del posicionamiento de DRP1 y ACAD9. (A) Imágenes de la detección de las proteínas DRP1 (20X) y ACAD9 (40X), con los anticuerpos de la Tabla 5. Los anticuerpos primarios se aplicaron a unas concentraciones de 2 $\mu\text{g/mL}$, al igual que los secundarios. El DAPI comercial se diluyó a 1/5000 desde el *stock*. (B) Imágenes al 63X de la detección de DRP1 variando las concentraciones de anticuerpo primario. El DAPI comercial se diluyó a 1/5000 desde el *stock*, mientras que el MitoTracker se utilizó a 300 nM. El color del MitoTracker es un verde falso, ya que se buscaba obtener mayor contraste en el Merge.

Se ha visto en otros casos que los propios fibroblastos emiten autofluorescencia fácilmente detectable por los microscopios, pudiendo alterar la detección de los antígenos y a la captación y procesamiento de la señal (Aubin, 1979; Çelik-Uzuner & O'Neill, 2021). Y existen métodos aplicables al protocolo de ICC que se emplean para reducir esta autofluorescencia, como, por ejemplo, el tratamiento con *quenchers*. Entre los más usados por ser coste-efectivos se encuentran el trypan blue, una disolución de amonio con etanol y el Sudan Black B (SBB). Se decantó por la utilización del Sudan Black B, ya que estudios previos habían comprobado su eficacia de reducción de la autofluorescencia y mejora en la resolución en tejidos humanos (Oliveira et al.; 2010).

En este caso, el siguiente paso sería realizar ensayos inmunocitoquímicos para definir cuál es la concentración en la que se puede conseguir la máxima eficiencia del MitoTracker en los fibroblastos y en el protocolo que se está siguiendo. Seguidamente, se comprobaría la actividad del Sudan Black B como agente limitante de la autofluorescencia, y se establecería el método de uso. Y se realizarían pruebas de especificidad de anticuerpo secundario, tratando la muestra sólo con el mismo, para ver su unión inespecífica en la célula y contrastar si es válido para seguir trabajando con él.

4.2.1.- Cuantificación de la expresión génica y *western blotting*

La cuantificación de la expresión génica de *DNM1L* se realizó en las muestras de la familia: 157F (Padre), 158F (Madre), 159F (Hijo 1) y 160F (Hijo 2). Los datos obtenidos se normalizaron con la expresión de los fibroblastos control por el método $\Delta\Delta C_t$. Los resultados de la Figura 10 sugieren que las expresiones relativas de los fibroblastos familiares están entorno a los datos del fibroblasto control. Además, la estadística de la prueba T pareada sostiene que las variaciones no son significativas para una $P > 0,05$, por lo que se podría asumir que la cantidad expresada es prácticamente igual en todas las muestras.

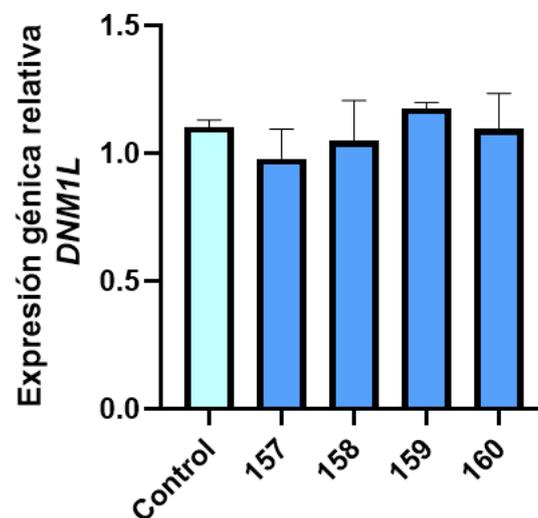


Figura 10. Expresión génica de *DNM1L* en los miembros de la familia cuyos hijos padecen atrofia óptica 5. No se observa variación significativa en la expresión de *DNM1L* entre las muestras familiares y control, para $P < 0,05$. Los datos de la qPCR se normalizaron con *GADPH*. El control es un individuo sano. La barra de error corresponde a la desviación estándar por los triplicados.

La otra variante está situada en el gen *ACAD9*, por ello, se cuantificó la expresión génica de la misma manera que la anterior variante. Los datos obtenidos también se normalizaron con los fibroblastos sanos, usados como control. En este caso, el resultado es muy semejante al anterior ya que no se

observa apenas diferencias en los datos, teniendo todas las muestras una expresión del gen parecida (Figura 11). La prueba T pareada afirmó que no hay variaciones significativas pudiendo considerar que la expresión es semejante en todas las muestras, es decir, expresan toda la misma cantidad. Sin embargo, las predicciones bioinformáticas resultaban en que participaba el NMD en el control de calidad por la transcripción de una secuencia genómica aberrante y esto no se observa en la qPCR por lo que no son resultados concluyentes.

Se estudió por *western blotting* la presencia y semi-cuantificación de proteína en las muestras. En DRP1, se puede observar en la Figura 12 cómo no hay apenas variación en la cantidad de proteína monomérica entre la muestra control y los fibroblastos de los pacientes, sin embargo sí que se puede observar cierta disminución en cuanto a las bandas de DRP1 homotetramérica. Los portadores de la variante en *DNM1L* tienen menor cantidad del homocomplejo formado por DRP1. El hijo 160, tiene un cociente igual al del control, ya que la detección de la actina en su carril fue deficiente, pero no dio tiempo a repetir el *western blot* de la actina. En el caso de *ACAD9*, se observa algo diferente. Los padres tienen algo de proteína mientras que los hijos no se observa presencia de proteína en los fibroblastos (Figura 13). Sin embargo, el cociente densitométrico del control es bastante más elevado que el de los padres. De esta manera, no se puede confiar realmente en los datos ya que el padre no tiene la variante en *ACAD9* por lo que debería expresar la misma proteína que en el control. Además, los hijos al ser heterocigotos en esta variante también deberían expresar al menos la mitad de proteína que el padre, en el caso de verse afectada por el cambio nucleotídico. Estos resultados distan de ser concluyentes, por lo que debería repetirse el *western blotting* de *ACAD9*.

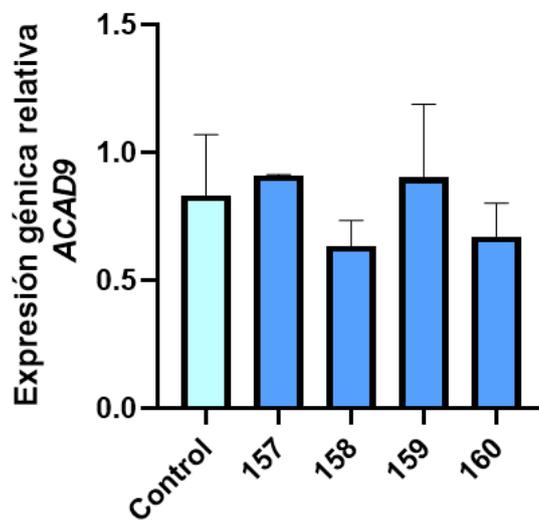


Figura 11. Expresión génica de *ACAD9* en los miembros de la familia cuyos hijos padecen atrofia óptica 5. No se observa variación significativa en la expresión de *ACAD9* entre las muestras familiares y control, para $P < 0,05$. Los datos de la qPCR se normalizaron con *GADPH*. El control es un individuo sano. La barra de error corresponde a la desviación estándar por los triplicados.

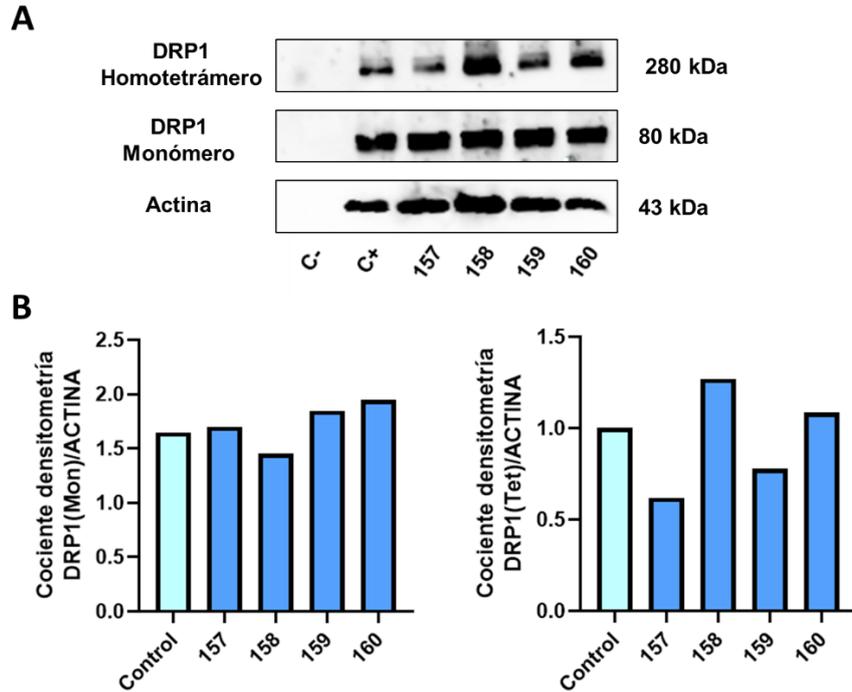


Figura 12. *Western blotting* del plasma de los familiares de la variante situada en DRP1. El control es un individuo sano. (A) Detección de DRP1 y actina en proteínas de los fibroblastos de los familiares. (B) Coeficiente densitométrico entre ambas proteínas, usando la actina como marcador interno. No se observa apenas diferencia entre los cocientes densitométricos.

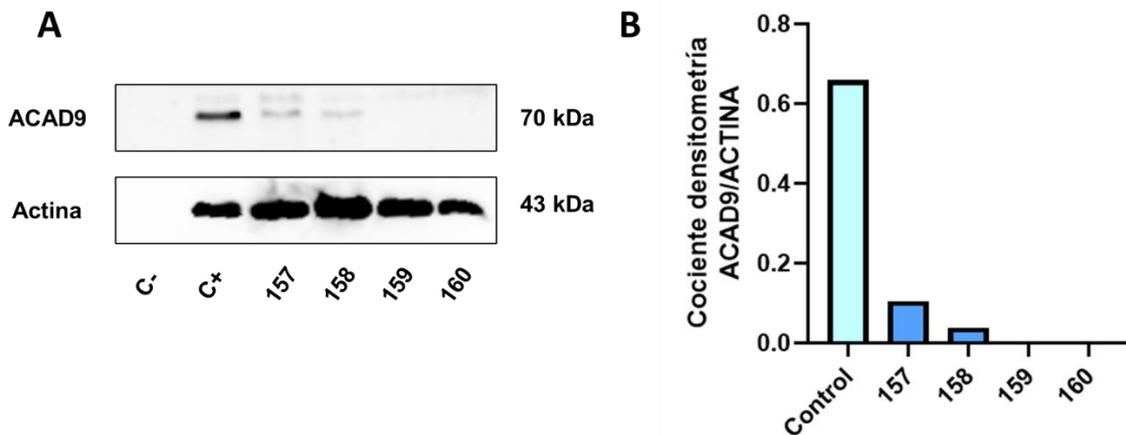


Figura 13. *Western blotting* del plasma de los familiares de la variante situada en ACAD9. El control es un individuo sano. (A) Detección de DRP1 y actina en proteínas de los fibroblastos de los familiares. (B) Coeficiente densitométrico entre ambas proteínas, usando la actina como marcador interno. No se observa apenas diferencia entre los cocientes densitométricos.

Los resultados generales del estudio sugieren *a priori*, que la variante en *DNM1L* no se ve afectada en la expresión génica ni en la traducción. Sin embargo, sí que se observa cierta variación en la cantidad del complejo formado por DRP1. Esta misma variante se ha visto que en homocigosis, pierde casi por completo la presencia de los homotetrámeros, lo que sugiere que el cambio aminoacídico afectaría en la zona de unión entre las proteínas y en su consiguiente oligomerización, a través del dominio GTPasa (Hogarth et al.; 2018). Este mismo estudio probó que con deficiencias en la función de DRP1 disminuían

la ratio de consumo de oxígeno, el contenido mitocondrial citoplasmático, el potencial de membrana, y aumentan, los niveles de ROS y el daño en el DNA. Esto concuerda con la hipótesis principal del estudio.

En el caso de ACAD9, su defecto se ha relacionado con cardiomiopatías severas y con ausencia del complejo I mitocondrial, necesario para la respiración oxidativa correcta. (Fragaki et al.; 2017) describieron una variante con la que se cambiaba el marco de lectura al mismo que en la variante que se baraja en este estudio y la detección del complejo I se veía mermada, ya que ACAD9 está involucrada en su ensamblaje. Cuando ACAD9 está afectado en homocigosis, surgen las cardiomiopatías hipertróficas, pero en este caso al estar en heterocigosis, se puede suponer que aún cumplen su función, pero deficientemente. Por ello, al combinarse con defectos en la función de DRP1, ambas conjuntas significarían demasiado daño mitocondrial y manifestándose el fenotipo de atrofia óptica con mayores síntomas. Esto tiene sentido ya que DNM1L afectado en heterocigosis es capaz de llevar la función correctamente ya que el padre no tiene un fenotipo patológico.

Ambas variantes reducirían los niveles de producción de ATP y un normal ejercicio de la mitocondria. También produciría altos niveles de ROS, la estructura mitocondrial aberrante podría afectar a un metabolismo lento, y se aumentaría el daño en el DNA. Todo esto conjuntamente sugiere que las neuronas no consiguen generar y mantener el potencial de acción necesario para ser funcionales, por lo que muchas de ellas no podrán transmitir el impulso eléctrico, entrando en un proceso de neurodegeneración (Desler et al.; 2012).

El estudio continuaría con modelizaciones proteicas *in silico* de DRP1 y ACAD9 para visualizar el efecto de las variantes en la estructura terciaria y cuaternaria. También, para la valoración de la actividad y daño mitocondrial se analizarían los niveles de ROS celulares, la dinámica mitocondrial en la inmunocitoquímica, los niveles de ATP producidos por los fibroblastos, y estudios de viabilidad celular. Más allá, podría plantearse la idea de utilizar ratones o *C. elegans knockout* para comprobar los efectos generales de la ausencia de estas proteínas en los tejidos neuronales.

4.2.- Variantes en KIF5A

Se analizaron mediante bioinformática las dos variantes presentes en KIF5A. La primera, situada en una región intrónica, conlleva la formación de un nuevo sitio aceptor de *splicing* según el análisis en HSF (Figura 14). Esta nueva región polimórfica, con un *score* de predicción de 69,36, podría implicar un salto del exón 27 de KIF5A, cómo ya se ha visto en otros casos similares. El software *Mutation Taster* predijo que la variante podía tener efectos en el *splicing* alternativo y posiblemente en la estructura proteica, la cual afectaría a la región globular del extremo C-terminal (*Tail Domain*).

En el caso de la variante c.566C>T, *Mutation Transfer* predijo que probablemente fuese patológica por un cambio *missense* en la proteína (p.S189L), la cual podría verse afectada en estructura y función. Con un *score* de sustitución aminoacídica de 145, la variante había sido previamente definida siempre en heterocigosis y sin ser descrita previamente cómo patológica. En cambio, al igual que la base de datos *Varsome*, el análisis de la variación en la proteína a través de *PolyPhen2* predice que es benigna con un *score* de 0,051. Por lo que no queda claro si esta variante resulta patológica o no.

La cuantificación de la expresión génica sólo se pudo realizar de la familia de los miembros 872 y 873, debido a que las concentraciones de RNA de las muestras de 879 y 880 eran demasiado bajas por lo que imposibilitaron su estudio. Como se ha comentado previamente, la variante perteneciente a esta familia es la c.2993-9T>G, una variante intrónica que podría estar afectando al *splicing* alternativo, y con ello, a la pauta de lectura correcta del gen.

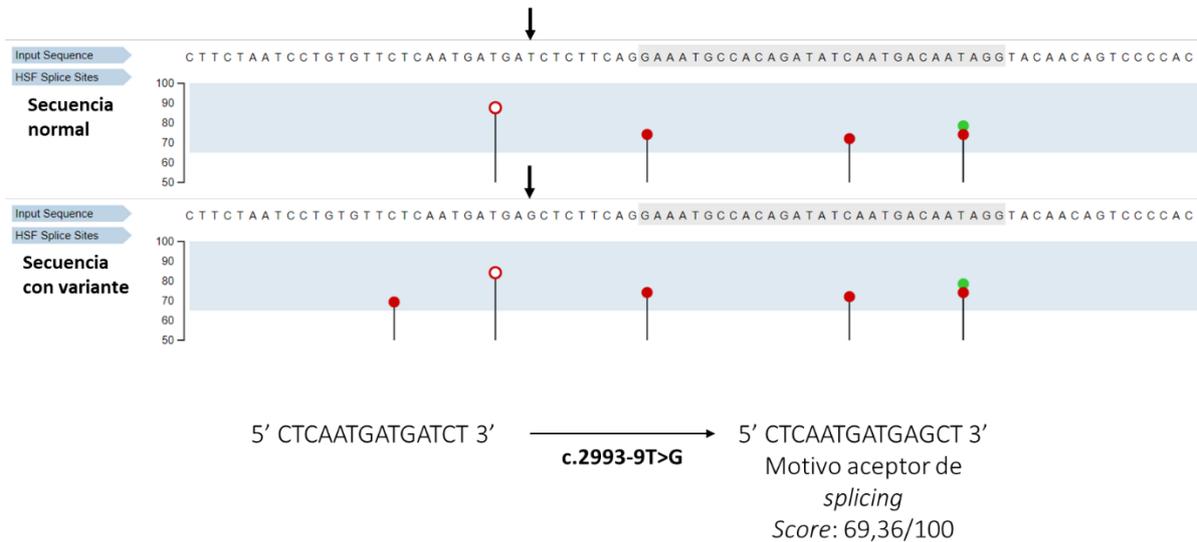


Figura 14. Posible efecto en el splicing alternativo del pre-mRNA de *KIF5A*, predicho por el software de análisis *Human Splicing Finder*. Las imágenes proceden del resultado de su examen de la variante c.2993-9T>G.

El análisis de la expresión por $\Delta\Delta C_t$ sugirió que apenas hay variación entre la muestra control y la muestra de los enfermos por lo que el gen no difiere en su expresión incluso con la variante descrita. La prueba T pareada confirmó que no son significativas las diferencias por lo que se puede asumir que los niveles de expresión son parecidos o iguales en los tres casos por lo que la variante no afecta a la expresión (Figura 15, $P < 0,05$).

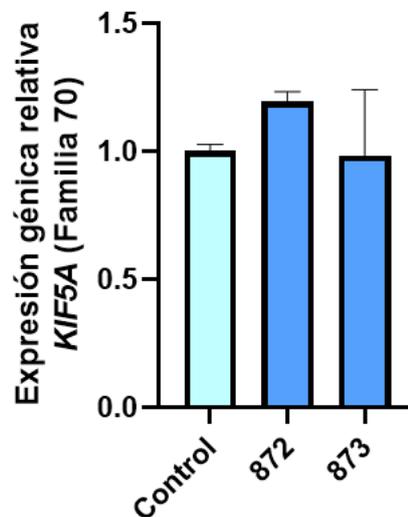


Figura 15. Expresión génica de *KIF5A* los miembros de la familia con la variante c.2993-9T>G. No se observa variación significativa en la expresión de *KIF5A* entre las muestras, para $P < 0,05$. Los datos de la qPCR se normalizaron con GADPH. El control es un individuo sano. La barra de error corresponde a la desviación estándar por los triplicados.

En la Figura 16, está representado el *western blotting* que se realizó con las proteínas provenientes de muestras de plasma sanguíneo de los pacientes. En el caso de los miembros de la familia con la variante c.2993-9T>G, se observa una banda muy clara en la imagen de la membrana. Con el cálculo del cociente de densitometría se observan diferencias significativas en la cantidad de proteína detectada en comparación con el control sano. Por lo tanto, hay una disminución en la cantidad de proteína

generada. Mientras que, en la segunda familia, relacionada con la variante c.566C>T, a pesar de que se observa cierta disminución en los cálculos densitométricos, no se consideró que hubiese una gran diferencia, ya que esas bajas variaciones pueden deberse a errores técnicos.

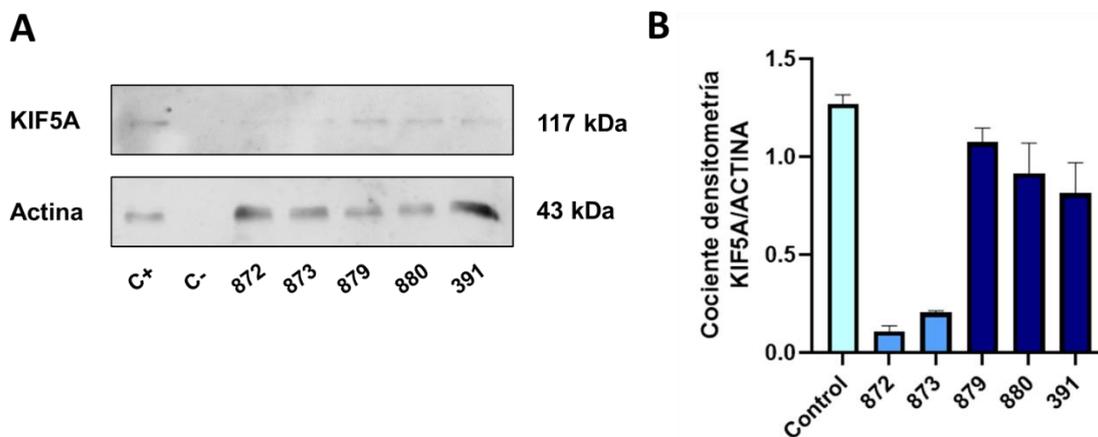


Figura 16. *Western blotting* del plasma de los familiares de la variante c.2993-9T>G (872 y 873), y la variante c.566C>T (879, 880 y 391), ambas en *KIF5A*. El control es un individuo sano. (A) Detección de KIF5A y actina en el plasma de los familiares. (B) Coeficiente densitométrico entre ambas proteínas, usando la actina como marcador interno.

En el caso de la variante c.2993-9T>G (familia 70) se ha visto que se produce menos proteína pero que la expresión génica no varía. Parece que hay un defecto en la traducción de esta proteína, o bien, no hay un correcto procesamiento post-traduccional que hace que la proteína sea degradada. Si que se observa, que hay cierta cantidad de proteína, lo que significaría que la variante es heterocigota en estos individuos, como es usual en muchas variantes de ELA. Probablemente, el alelo afectado produciría una proteína con un Tail Domain aberrante, y posiblemente, no funcional. De ahí que los sistemas involucrados en revisión de la calidad proteica, cómo la proteasoma, activasen la destrucción y eliminación de la proteína.

Esta región intrónica de *KIF5A* (previa al exón 27) donde está situada la variante ya había sido definida cómo un *hot-spot* mutable ya que estudios genómicos han dado que en un rango pequeño colindante al exón 27 existen mutaciones altamente patológicas en estado de heterocigosis. Estas mutaciones afectarían al splicing alternativo del propio exón (Figura 17), y se verían involucradas en una pérdida de función de la proteína, al afectar en el dominio C-terminal. (Nicolas et al.; 2018).

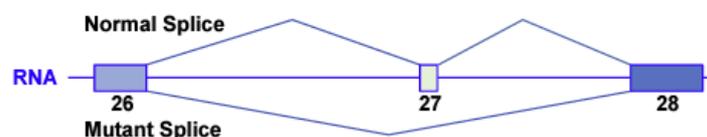


Figura 17. Posibles vías de splicing alternativo en las mutaciones en las regiones consenso intrónica colindantes al exón 27. En el caso de la variante c.2993-9T>G, podría estar sucediendo lo mismo y por ello podría verse afectada la función de *KIF5A*. Adaptación de Nicolas et al.; 2018.

La *KIF5A* es una kinesina que participa en el transporte axonal y dendrítico de orgánulos mediante la unión a en los neurofilamentos y el citoesqueleto neural. Defectos de unión al cargamento producen un déficit de movimiento y una distribución de los orgánulos errónea que contribuye a la aparición de ELA y otras enfermedades neurodegenerativas (Chevalier-Larsen & Holzbaur, 2006). Además, defectos en la expresión de *KIF5A*, y por consiguiente, menor unión y transporte organular, también han sido

asociados a hiperfosforilaciones de los neurofilamentos y las proteínas precursoras amieloides en los cuerpos neuronales, causantes de neurodegeneraciones, cómo la esclerosis múltiple (Hares et al.; 2017). Sin embargo, existen otros estudios más actuales en los cuales se vió que la pérdida de este exón conllevaba una oligomerización de la proteína formando agregados. Estos tenían una ganancia de actividad que inducía un mayor movimiento axonal y desorganización organular (Nakano et al.; 2022).

En el caso de la variante c.566C>T (familia 42), se observa presencia de proteína sin estar en cantidades bajas en comparación con el control sano. En este caso la variante está en el dominio motor, tal vez afectando a la unión a los neurofilamentos o haya algún cambio de conformación que reduzca la funcionalidad de KIF5A por deficiencias en la actividad catalítica ATPasa. Mutaciones en esta región se asocian más a fenotipos de SPG10 y CMT2. Esta variante no había sido definida antes, pero los efectos patológicos que puede acarrear no tenderán a ser muy diferentes a los observados en SPG10 y CMT2. En estos casos se observan pérdidas de función en la proteína desencadenando anomalías axonales y en organización citoplasmática (Crimella et al.; 2012).

El estudio de las dos variantes continuaría con la modelización de la estructura tridimensional de KIF5A *in silico*, además de la confirmación del *splicing* alternativo erróneo con una RT-PCR que amplificase la zona del exón 27 (en c.2993-9T>G) y la qPCR que no fue posible realizar por falta de RNA (en c.566C>T). Estos aspectos se estudiarían en profundidad a partir de la obtención de iPS (*induced Pluripotency Stem Cells*), o bien de otros precursores neurales. Y, por último, estudios de dinámica y transporte axonal y dendrítico en células neuronales.

4.3.- Variante en SETX

El análisis bioinformático sobre la variante c.331C>T en SETX, corroboró las sospechas de ser una variante altamente patogénica. *Mutation Transfer* predijo que este cambio afectaría a la expresión génica por el NMD, a la secuencia aminoacídica por el codón de parada prematuro y a la función de la proteína. El *score* es de 6 sobre 215, es decir, la probabilidad de ser la causante de la enfermedad es muy alta.

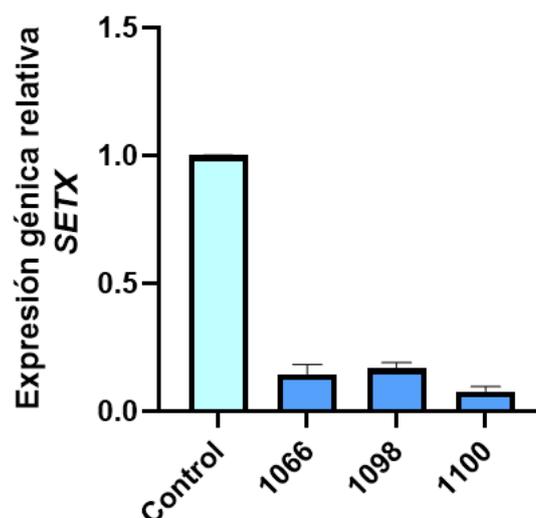


Figura 18. Expresión génica de SETX en los miembros de la familia con la variante p.R111*. Se observa una reducción significativa de la expresión e mRNA de SETX en el paciente 1066, y en un hijo, 1100. Los datos de la qPCR se normalizaron con GADPH. La barra de error corresponde a la desviación estándar por los triplicados.

Los resultados de la qPCR se compararon con un control sano, el cual se sabía previamente que no tenía la variante por lo que *a priori* la expresión de *SETX* no debería verse afectada. Cómo se puede observar en la Figura 18, la expresión génica de *SETX* por parte del padre (1066) y de los hijos (1098 y 1100) se ve afectada con la disminución de esta hasta el punto de casi no producir como es el caso de un hijo. Estadísticamente, la prueba T pareada resultó en que la diferencia en la expresión entre la muestra control y las muestras, es significativa para $P < 0,05$. Por lo que esta disminución de la expresión génica puede considerarse que afecte en todos los individuos. Aunque esto se tendría que corroborar con el genotipado de los familiares.

p.R111* es una variante sin sentido, que establece un codón de parada prematuro. En muchos de estos tipos de variantes se ha observado la actuación de un mecanismo endógeno celular el cual ejerce de control de calidad y cantidad de mRNA. Este mecanismo se llama *Nonsense-Mediated mRNA Decay* (NMD) y sirve para detectar mutaciones sin sentido en el mRNA, y eliminar que estos errores se acumulen en el transcriptoma (Kurosaki et al.; 2019). Probablemente, el NMD entre en juego en la disminución de los niveles de mRNA en el gen de la senataxina.

La reducción de la expresión del gen *SETX* significaría una bajada en la cantidad de proteína y esto es, precisamente, visible en la Figura 19. Los familiares presentan menor cantidad de proteína que en el control sano, alrededor de la mitad. Esto concuerda con la heterocigosis supuesta en la que se encuentra el gen, ya que normalmente presentan estos genotipos los pacientes de fALS. Probablemente, al no estar la proteína en una concentración adecuada en la célula, no pueda cubrir sus funciones al cien por cien. Esto se vería representado en una neurodegeneración de las células motoras superiores e inferiores, que dependerán más de la funcionalidad de esta proteína. De ahí que el fenotipo que aparece sea el de ELA, u otras enfermedades relacionadas, como ataxia o AOA2 (Grunseich et al.; 2020).

Cada vez se descubren más variantes en la *SETX* cuyos portadores manifiestan un fenotipo neuropático. Normalmente, estas variantes suelen estar en heterocigosis en los pacientes por lo que sólo uno de los dos alelos se vería afectado. (Grunseich et al.; 2020) ya definieron una variante heterocigota familiar que mermaba la expresión génica de la senataxina y los portadores padecían ELA. Esta variante se estudió más en profundidad y se vio que se reducían los *R-loops*, los cuales son estructuras de DNA (no de tipo B) que resguardan los híbridos de RNA-DNA durante la transcripción. Su desregulación, está directamente relacionada con inestabilidad genómica, altos niveles de recombinación, y daño en el DNA (García-Muse & Aguilera, 2019). Por otra parte, la *SETX* se ha visto involucrada en el mantenimiento de la plasticidad de las sinapsis neuro-musculares, y su defecto provoca la progresión de la ELA en modelos de *Drosophila melanogaster* debido (Mushtaq et al.; 2016). Estos son sólo algunos de los efectos que podrían estar ocurriendo en este paciente con ELA, pero hay muchas más rutas posiblemente implicadas en la fisiopatología causada por esta variante.

El estudio de esta variante continuaría con la cuantificación de la expresión génica y western blotting del señalizador TGF- β , ya que resulta ser un biomarcador de la actividad de *SETX* debido a que esta participa en rutas de regulación de la citocina (Grunseich et al.; 2020). También, se realizaría el estudio del mantenimiento y cantidad de los *R-loops*, principal mecanismo en el que se involucra *SETX*. Esto se analizaría a través de inmunocitoquímica dirigida a los híbridos RNA-DNA con anticuerpos específicos.

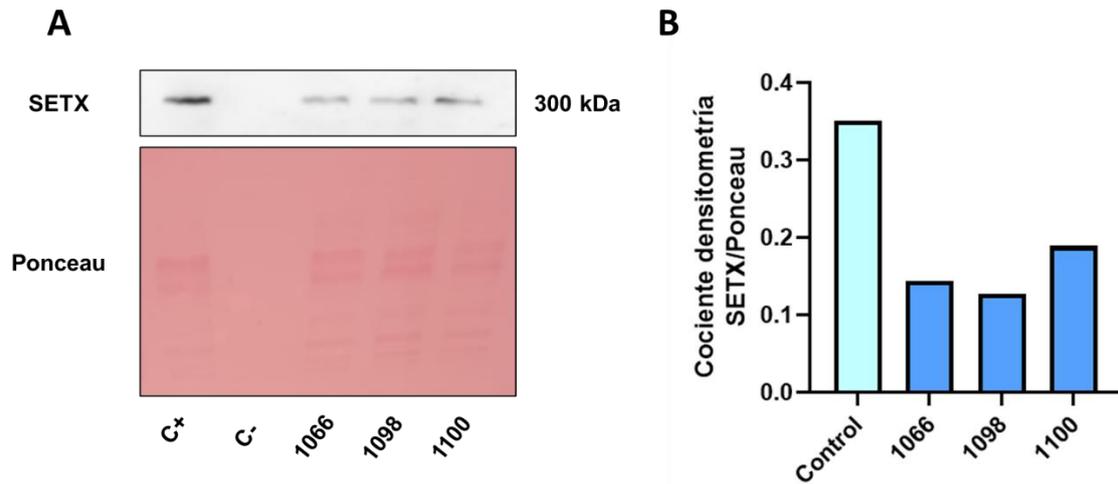


Figura 19. *Western blotting* del plasma de los familiares de la variante p.R111* en SETX. El control es un individuo sano. (A) Detección de SETX en los miembros de la familia y tinción con Ponceau de las proteínas en la membrana de nitrocelulosa. Esto es debido a que faltó tiempo para realizar el *western blotting* de la actina en las muestras de esta familia. (B) Coeficiente densitométrico a partir de la tinción en rojo con el colorante de Ponceau.

5.- Conclusión

Las principales conclusiones de este estudio pueden resumirse brevemente en las siguientes:

1. La puesta a punto de la inmunocitoquímica no se logró llevar a cabo completamente debido a ciertos problemas. Estos se solventarían con distintas pruebas en las que se determinarían las concentraciones necesarias de MitoTracker, anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios, además de un mejoramiento de la técnica con tratamientos de reducción de la autofluorescencia, entre otros. Así pues, se podría observar si hay algún defecto en la dinámica mitocondrial.
2. La variante c.305C>T (p.Thr115Met) localizada en el gen *DNM1L* no afectaría a la expresión génica de este, pero sí a la formación de los homotetrámeros proteicos que componen su proteína DRP1. Estos complejos funcionan más eficientemente que los monómeros sueltos, es por eso por lo que, probablemente, se observe una disminución en la presencia de los complejos, y, por consiguiente, en la actividad de la dinamina.
3. La variante c.359delT (p.Phe120fs) en el gen *ACAD9*, parece que no disminuye la expresión de este a pesar de que los predictores sugerían que se procesaba con NMD debido al *frame shift* y el mRNA aberrante que se obtendría. Además, se observa una muy poca cantidad de proteína en el *western blotting*, pero sin ser concluyente ya que el progenitor debería tener la misma cantidad de proteína que el control.
4. Los resultados en el estudio en *DNM1L* se acercan a la posibilidad de que se presente la hipótesis principal de la sinergia por estrés oxidativo. Sin embargo, no se puede afirmar nada ya que se necesitan obtener muchos más datos y esclarecer los defectos que puedan formar parte de la atrofia óptica 5 con ataxia y retraso en el desarrollo.
5. La variante c.2993-9T>G (intrónica) en el gen *KIF5A* fue predicha como patogénica por su implicación en errores en el *splicing* alternativo. La expresión génica, a pesar de ser baja en plasma, no tenía diferencias significativas con el control. En cambio, la cantidad de proteína observada fue mucho menor en los familiares que tenían esta variante, hecho que puede estar involucrado en la deficiencia de algunos mecanismos moleculares que previamente se han visto relacionados con la ELA.
6. La variante c.566C>T (p.Ser189Leu) en el gen *KIF5A* se observó una cantidad relativamente normal de proteína y en los predictores predominó la definición del cambio como benigno. Se deberían realizar más pruebas para valorar si existe una posible patogénesis desencadenada de esta variante, ya que no está del todo clara su implicación en la ELA.
7. Los resultados de la variante c.331C>T (p.Arg111*) en el gen *SETX* cumplen con las predicciones de ser una variante altamente patogénica, por el momento. La expresión génica se ve reducida significativamente, y la cantidad de proteína se ve mermada a la mitad, coincidiendo con la heterocigosis de la variante.

Entre los diversos resultados conseguidos, no hay nada confirmado, solamente son sugerencias de lo que estará pasando en los hipotéticos escenarios. A tal efecto, se debería seguir trabajando sobre las variantes descritas para esclarecer mejor cuáles son sus efectos y si forman parte del proceso fisiopatológico. La genética molecular, junto con la biología molecular, poseen las herramientas necesarias para continuar con la investigación en estos casos de enfermedades cuyas bases genéticas y mecanismos moleculares no están pulcramente definidos.

6.- Bibliografía

- AHMAD, S. S.; & KANUKOLLU, V. M. (2023). *Optic Atrophy*.
- AKBAR, U.; & ASHIZAWA, T. (2015). Ataxia. *Neurologic Clinics*, 33(1), 225–248. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2014.09.004>
- AMORE, G.; ROMAGNOLI, M.; CARBONELLI, M.; BARBONI, P.; CARELLI, V.; & LA MORGIA, C. (2021). Therapeutic Options in Hereditary Optic Neuropathies. In *Drugs* (Vol. 81, Issue 1, pp. 57–86). Adis. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01428-3>
- AUBIN, J. E. (1979). Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 27(1), 36–43. <https://doi.org/10.1177/27.1.220325>
- BONNEAU, D.; COLIN, E.; OCA, F.; FERRE, M.; CHEVROLIER, A.; GUÉGUEN, N.; DESQUIRET-DUMAS, V.; N’GUYEN, S.; BARTH, M.; ZANLONGHI, X.; RIO, M.; DESGUERRE, I.; BARNERIAS, C.; MOMTCHILOVA, M.; RODRIGUEZ, D.; SLAMA, A.; LENAERS, G.; PROCACCIO, V.; AMATI-BONNEAU, P.; & REYNIER, P. (2014). Letter to the editor: Early-onset Behr syndrome due to compound heterozygous mutations in OPA1. In *Brain* (Vol. 137, Issue 10). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/brain/awu184>
- BROWN, T. L.; & MELOCHE, T. M. (2016). Exome sequencing a review of new strategies for rare genomic disease research. *Genomics*, 108(3–4), 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2016.06.003>
- BÜRK, K. (2017). Friedreich Ataxia: current status and future prospects. *Cerebellum & Ataxias*, 4, 4. <https://doi.org/10.1186/s40673-017-0062-x>
- BURRY, R. W. (2010). Sample Preparation/Fixation. In *Immunocytochemistry* (pp. 17–28). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1304-3_3
- CAROSI, L.; LO GIUDICE, T.; DI LULLO, M.; LOMBARDI, F.; BABALINI, C.; GAUDIELLO, F.; MARFIA, G. A.; MASSA, R.; KAWARAI, T.; & ORLACCHIO, A. (2015). Hereditary spastic paraplegia: a novel mutation and expansion of the phenotype variability in SPG10. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 86(6), 702–704. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-308625>
- ÇELIK-UZUNER, S.; & O’NEILL, C. (2021). Cellular Autofluorescence in Mouse Embryonic Fibroblasts Interferes with Antigen Detection Using Flow Cytometry. *Journal of Fluorescence*, 31(3), 873–879. <https://doi.org/10.1007/s10895-021-02724-1>
- CHARIF, M.; GUEGUEN, N.; FERRÉ, M.; ELKARHAT, Z.; KHIATI, S.; LEMAO, M.; CHEVROLIER, A.; DESQUIRET-DUMAS, V.; GOUDENÈGE, D.; BRIS, C.; KANE, S.; ALBAN, J.; CHUPIN, S.; WETTERWALD, C.; CAPORALI, L.; TAGLIAVINI, F.; LAMORGIA, C.; CARBONELLI, M.; JURKUTE, N.; ... LENAERS, G. (2021). Dominant ACO2 mutations are a frequent cause of isolated optic atrophy. *Brain Communications*, 3(2), fcab063. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcab063>
- CHECKOWAY, H.; LUNDIN, J. I.; & KELADA, S. N. (2011). Neurodegenerative diseases. *IARC Scientific Publications*, 163, 407–419.
- CHENG, F.; & GESCHWIND, D. (2022). Human Molecular Genetics Review Issue 2022. *Human Molecular Genetics*, 31(R1). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddac219>

- CHEVALIER-LARSEN, E.; & HOLZBAUR, E. L. F. (2006). Axonal transport and neurodegenerative disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1762(11–12), 1094–1108. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.04.002>
- CLAUSSNITZER, M.; CHO, J. H.; COLLINS, R.; COX, N. J.; DERMITZAKIS, E. T.; HURLES, M. E.; KATHIRESAN, S.; KENNY, E. E.; LINDGREN, C. M.; MACARTHUR, D. G.; NORTH, K. N.; PLON, S. E.; REHM, H. L.; RISCH, N.; ROTIMI, C. N.; SHENDURE, J.; SORANZO, N.; & MCCARTHY, M. I. (2020). A brief history of human disease genetics. In *Nature* (Vol. 577, Issue 7789, pp. 179–189). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1879-7>
- CRIMELLA, C.; BASCHIROTTO, C.; ARNOLDI, A.; TONELLI, A.; TENDERINI, E.; AIROLDI, G.; MARTINUZZI, A.; TRABACCA, A.; LOSITO, L.; SCARLATO, M.; BENEDETTI, S.; SCARPINI, E.; SPINICCI, G.; BRESOLIN, N.; & BASSI, M. T. (2012). Mutations in the motor and stalk domains of KIF5A in spastic paraplegia type 10 and in axonal Charcot-Marie-Tooth type 2. *Clinical Genetics*, 82(2), 157–164. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01717.x>
- CYTOCHEMISTRY, AND, FOX, C. H.; JOHNSON, F. B.; WHITING, J.; & ROLLER, P. P. (1985). *The Journal of Histochemistry Formaldehyde Fixation Review Article* (Vol. 33, Issue 8).
- DABBS, D. J. (2008). Immunohistochemical Protocols. *American Journal of Clinical Pathology*, 129(3), 355–356. <https://doi.org/10.1309/NKF29KCHNMYEMCT3>
- D'AMICO, F.; SKARMOUTSOU, E.; & STIVALA, F. (2009). State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *Journal of Immunological Methods*, 341(1–2), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.11.007>
- DESLER, C.; HANSEN, T. L.; FREDERIKSEN, J. B.; MARCKER, M. L.; SINGH, K. K.; & JUEL RASMUSSEN, L. (2012). Is There a Link between Mitochondrial Reserve Respiratory Capacity and Aging? *Journal of Aging Research*, 2012, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2012/192503>
- DUIS, J.; DEAN, S.; APPLGATE, C.; HARPER, A.; XIAO, R.; HE, W.; DOLLAR, J. D.; SUN, L. R.; WABERSKI, M. B.; CRAWFORD, T. O.; HAMOSH, A.; & STAFSTROM, C. E. (2016). KIF5A mutations cause an infantile onset phenotype including severe myoclonus with evidence of mitochondrial dysfunction. *Annals of Neurology*, 80(4), 633–637. <https://doi.org/10.1002/ana.24744>
- DUQUETTE, A.; RODDIER, K.; MCNABB-BALTAR, J.; GOSSELIN, I.; ST-DENIS, A.; DICAIRE, M.-J.; LOISEL, L.; LABUDA, D.; MARCHAND, L.; MATHIEU, J.; BOUCHARD, J.-P.; & BRAIS, B. (2005). Mutations in senataxin responsible for Quebec cluster of ataxia with neuropathy. *Annals of Neurology*, 57(3), 408–414. <https://doi.org/10.1002/ana.20408>
- ENSENAUER, R.; HE, M.; WILLARD, J.-M.; GOETZMAN, E. S.; CORYDON, T. J.; VANDAHL, B. B.; MOHSEN, A.-W.; ISAYA, G.; & VOCKLEY, J. (2005). Human acyl-CoA dehydrogenase-9 plays a novel role in the mitochondrial beta-oxidation of unsaturated fatty acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(37), 32309–32316. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504460200>
- FRAGAKI, K.; CHAUSSENOT, A.; BOUTRON, A.; BANNWARTH, S.; ROUZIER, C.; CHABROL, B.; & PAQUIS-FLUCKLINGER, V. (2017). Assembly defects of multiple respiratory chain complexes in a child with cardiac hypertrophy associated with a novel ACAD9 mutation. *Molecular Genetics and Metabolism*, 121(3), 224–226. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.05.002>
- FREZZA, C.; CIPOLAT, S.; MARTINS DE BRITO, O.; MICARONI, M.; BEZNOUSSENKO, G. V.; RUDKA, T.; BARTOLI, D.; POLISHUCK, R. S.; DANIAL, N. N.; DE STROOPER, B.; & SCORRANO, L. (2006). OPA1

- Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion. *Cell*, 126(1), 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.025>
- GARCÍA-MUSE, T.; & AGUILERA, A. (2019). R Loops: From Physiological to Pathological Roles. *Cell*, 179(3), 604–618. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.055>
- GIACHIN, G.; BOUVEROT, R.; ACAJAOUI, S.; PANTALONE, S.; & SOLER-LÓPEZ, M. (2016). Dynamics of Human Mitochondrial Complex I Assembly: Implications for Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00043>
- GRAD, L. I.; ROULEAU, G. A.; RAVITS, J.; & CASHMAN, N. R. (2017). Clinical Spectrum of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024117>
- GRUNSEICH, C.; PATANKAR, A.; AMAYA, J.; WATTS, J. A.; LI, D.; RAMIREZ, P.; SCHINDLER, A. B.; FISCHBECK, K. H.; & CHEUNG, V. G. (2020). Clinical and Molecular Aspects of Senataxin Mutations in Amyotrophic Lateral Sclerosis 4. *Annals of Neurology*, 87(4), 547–555. <https://doi.org/10.1002/ana.25681>
- GUSELLA, J. F.; WEXLER, N. S.; CONNEALLY, P. M.; NAYLOR, S. L.; ANDERSON, M. A.; TANZI, R. E.; WATKINS, P. C.; OTTINA, K.; WALLACE, M. R.; & SAKAGUCHI, A. Y. (n.d.). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*, 306(5940), 234–238. <https://doi.org/10.1038/306234a0>
- HARES, K.; REDONDO, J.; KEMP, K.; RICE, C.; SCOLDING, N.; & WILKINS, A. (2017). Axonal motor protein KIF5A and associated cargo deficits in multiple sclerosis lesional and normal-appearing white matter. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 43(3), 227–241. <https://doi.org/10.1111/nan.12305>
- HOGARTH, K. A.; COSTFORD, S. R.; YOON, G.; SONDEIMER, N.; & MAYNES, J. T. (2018). DNMT1 Variant Alters Baseline Mitochondrial Function and Response to Stress in a Patient with Severe Neurological Dysfunction. *Biochemical Genetics*, 56(1–2), 56–77. <https://doi.org/10.1007/s10528-017-9829-2>
- JACKSON, M.; LENNOX, G.; & LOWE, J. (1996). Motor Neurone Disease-inclusion Dementia. *Neurodegeneration*, 5(4), 339–350. <https://doi.org/10.1006/neur.1996.0046>
- JACKSON, M.; MARKS, L.; MAY, G. H. W.; & WILSON, J. B. (2018). The genetic basis of disease. In *Essays in Biochemistry* (Vol. 62, Issue 5, pp. 643–723). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/EBC20170053>
- JAMUR, M. C.; & OLIVER, C. (2010). *Permeabilization of Cell Membranes* (pp. 63–66). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_9
- KANNAN, A.; CUARTAS, J.; GANGWANI, P.; BRANZEI, D.; & GANGWANI, L. (2022). Mutation in senataxin alters the mechanism of R-loop resolution in amyotrophic lateral sclerosis 4. *Brain*, 145(9), 3072–3094. <https://doi.org/10.1093/brain/awab464>
- KOVACS, G. G. (2019). Molecular pathology of neurodegenerative diseases: principles and practice. *Journal of Clinical Pathology*, 72(11), 725–735. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2019-205952>
- KRAUS, F.; ROY, K.; PUCADYIL, T. J.; & RYAN, M. T. (2021). Function and regulation of the divisome for mitochondrial fission. *Nature*, 590(7844), 57–66. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03214-x>

- KRENACS, L.; KRENACS, T.; STELKOVIĆ, E.; & RAFFELD, M. (2010). Heat-induced antigen retrieval for immunohistochemical reactions in routinely processed paraffin sections. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 588, 103–119. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_14
- KUROSAKI, T.; POPP, M. W.; & MAQUAT, L. E. (2019). Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(7), 406–420. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0126-2>
- LEIPNITZ, G.; MOHSEN, A.-W.; KARUNANIDHI, A.; SEMINOTTI, B.; ROGINSKAYA, V. Y.; MARKANTONE, D. M.; GRINGS, M.; MIHALIK, S. J.; WIPF, P.; VAN HOUTEN, B.; & VOCKLEY, J. (2018). Evaluation of mitochondrial bioenergetics, dynamics, endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk, and reactive oxygen species in fibroblasts from patients with complex I deficiency. *Scientific Reports*, 8(1), 1165. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19543-3>
- LENAERS, G.; HAMEL, C.; DELETTRE, C.; AMATI-BONNEAU, P.; PROCACCIO, V.; BONNEAU, D.; REYNIER, P.; & MILEA, D. (2012). Dominant optic atrophy. In *Orphanet Journal of Rare Diseases* (Vol. 7, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-46>
- LENAERS, G.; NEUTZNER, A.; LE DANTEC, Y.; JÜSCHKE, C.; XIAO, T.; DECEMBRINI, S.; SWIRSKI, S.; KIENINGER, S.; AGCA, C.; KIM, U. S.; REYNIER, P.; YU-WAI-MAN, P.; NEIDHARDT, J.; & WISSINGER, B. (2021). Dominant optic atrophy: Culprit mitochondria in the optic nerve. In *Progress in Retinal and Eye Research* (Vol. 83). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100935>
- LESLIE, N.; WANG, X.; PENG, Y.; VALENCIA, C. A.; KHUCHUA, Z.; HATA, J.; WITTE, D.; HUANG, T.; & BOVE, K. E. (2016). Neonatal multiorgan failure due to ACAD9 mutation and complex I deficiency with mitochondrial hyperplasia in liver, cardiac myocytes, skeletal muscle, and renal tubules. *Human Pathology*, 49, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.09.039>
- LILL, C. M.; & BERTRAM, L. (2011). Towards unveiling the genetics of neurodegenerative diseases. *Seminars in Neurology*, 31(5), 531–541. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1299791>
- LONGINETTI, E.; & FANG, F. (2019). Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: an update of recent literature. *Current Opinion in Neurology*, 32(5), 771–776. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000730>
- LYON, M. S.; WOSISKI-KUHN, M.; GILLESPIE, R.; CARESS, J.; & MILLIGAN, C. (2019). Inflammation, Immunity, and amyotrophic lateral sclerosis: I. Etiology and pathology. In *Muscle and Nerve* (Vol. 59, Issue 1, pp. 10–22). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/mus.26289>
- MARESCA, A.; LA MORGIA, C.; CAPORALI, L.; VALENTINO, M. L.; & CARELLI, V. (2013). The optic nerve: a “mito-window” on mitochondrial neurodegeneration. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 55(100), 62–76. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.08.004>
- MEJZINI, R.; FLYNN, L. L.; PITOUT, I. L.; FLETCHER, S.; WILTON, S. D.; & AKKARI, P. A. (2019). ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? *Frontiers in Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01310>
- MUSHTAQ, Z.; CHOUDHURY, S. D.; GANGWAR, S. K.; ORSO, G.; & KUMAR, V. (2016). Human Senataxin Modulates Structural Plasticity of the Neuromuscular Junction in *Drosophila* through a Neuronally Conserved TGF β Signalling Pathway. *Neuro-Degenerative Diseases*, 16(5–6), 324–336. <https://doi.org/10.1159/000445435>

- NAKANO, J.; CHIBA, K.; & NIWA, S. (2022). An ALS-associated KIF5A mutant forms oligomers and aggregates and induces neuronal toxicity. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 27(6), 421–435. <https://doi.org/10.1111/gtc.12936>
- NICOLAS, A.; KENNA, K. P.; RENTON, A. E.; TICOZZI, N.; FAGHRI, F.; CHIA, R.; DOMINOV, J. A.; KENNA, B. J.; NALLS, M. A.; KEAGLE, P.; RIVERA, A. M.; VAN RHEENEN, W.; MURPHY, N. A.; VAN VUGT, J. J. F. A.; GEIGER, J. T.; VAN DER SPEK, R. A.; PLINER, H. A.; SHANKARACHARYA, SMITH, B. N.; ... LANDERS, J. E. (2018). Genome-wide Analyses Identify KIF5A as a Novel ALS Gene. *Neuron*, 97(6), 1268–1283.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.02.027>
- NOUWS, J.; NIJTMANS, L.; HOUTEN, S. M.; VAN DEN BRAND, M.; HUYNEN, M.; VENSELAAR, H.; HOEFS, S.; GLOERICH, J.; KRONICK, J.; HUTCHIN, T.; WILLEMS, P.; RODENBURG, R.; WANDERS, R.; VAN DEN HEUVEL, L.; SMEITINK, J.; & VOGEL, R. O. (2010). Acyl-CoA dehydrogenase 9 is required for the biogenesis of oxidative phosphorylation complex I. *Cell Metabolism*, 12(3), 283–294. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.08.002>
- NOUWS, J.; TE BRINKE, H.; NIJTMANS, L. G.; & HOUTEN, S. M. (2014). ACAD9, a complex I assembly factor with a moonlighting function in fatty acid oxidation deficiencies. *Human Molecular Genetics*, 23(5), 1311–1319. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt521>
- OLIVEIRA, V. C.; CARRARA, R. C. V, SIMOES, D. L. C.; SAGGIORO, F. P.; CARLOTTI, C. G.; COVAS, D. T.; & NEDER, L. (2010). Sudan Black B treatment reduces autofluorescence and improves resolution of in situ hybridization specific fluorescent signals of brain sections. *Histology and Histopathology*, 25(8), 1017–1024. <https://doi.org/10.14670/HH-25.1017>
- PAN, Z.; WU, T. H.; CHEN, C.; PENG, P.; HE, Y. W.; YI, W. Z.; YIN, F.; & PENG, J. (2021). [DNM1L gene variant caused encephalopathy, lethal, due to defective mitochondrial peroxisomal fission 1: three cases report and literature review]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi = Chinese Journal of Pediatrics*, 59(5), 400–406. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn112140-20200921-00893>
- PAVONE, P.; PRATICÒ, A. D.; PAVONE, V.; LUBRANO, R.; FALSAPERLA, R.; RIZZO, R.; & RUGGIERI, M. (2017). Ataxia in children: Early recognition and clinical evaluation. In *Italian Journal of Pediatrics* (Vol. 43). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13052-016-0325-9>
- RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ, M.; CÓRDOBA, J. J.; & ANDRADE, M. J. (2015). *Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods* (pp. 31–56). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_3
- ROTH, T. L.; & MARSON, A. (2021). Genetic Disease and Therapy. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2021, 16, 145–166. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis>
- RYU, S.-W.; JEONG, H. J.; CHOI, M.; KARBOWSKI, M.; & CHOI, C. (2010). Optic atrophy 3 as a protein of the mitochondrial outer membrane induces mitochondrial fragmentation. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 67(16), 2839–2850. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0365-z>
- SAEZ-ATIENZAR, S.; DALGARD, C. L.; DING, J.; CHIÒ, A.; ALBA, C.; HUPALO, D. N.; WILKERSON, M. D.; BOWSER, R.; PIORO, E. P.; BEDLACK, R.; & TRAYNOR, B. J. (2020). Identification of a pathogenic intronic KIF5A mutation in an ALS-FTD kindred. *Neurology*, 95(22), 1015–1018. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000011064>
- SCHMITT, K.; GRIMM, A.; DALLMANN, R.; OETTINGHAUS, B.; RESTELLI, L. M.; WITZIG, M.; ISHIHARA, N.; MIHARA, K.; RIPPERGER, J. A.; ALBRECHT, U.; FRANK, S.; BROWN, S. A.; & ECKERT, A. (2018).

- Circadian Control of DRP1 Activity Regulates Mitochondrial Dynamics and Bioenergetics. *Cell Metabolism*, 27(3), 657-666.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.01.011>
- SHEMESH, A.; SOOD, G.; & MARGOLIN, E. (2023). *Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON)*.
- SMIRNOVA, E.; GRIPARIC, L.; SHURLAND, D. L.; & VAN DER BLIEK, A. M. (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell*, 12(8), 2245–2256. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.8.2245>
- TOFFOLI, D.; MATHEWS, M.; ALMEIDA, T.; NATARIO, & COUSER, L. (n.d.). *Genetic Abnormalities of the Optic Nerve and Color Vision*.
- VANSTONE, J. R.; SMITH, A. M.; MCBRIDE, S.; NAAS, T.; HOLCIK, M.; ANTOUN, G.; HARPER, M.-E.; MICHAUD, J.; SELL, E.; CHAKRABORTY, P.; TETREAU, M.; CARE4RARE CONSORTIUM, MAJEWSKI, J.; BAIRD, S.; BOYCOTT, K. M.; DYMENT, D. A.; MACKENZIE, A.; & LINES, M. A. (2016). DNMT1L-related mitochondrial fission defect presenting as refractory epilepsy. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 24(7), 1084–1088. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.243>
- VERMA, A. (2021). Clinical Manifestation and Management of Amyotrophic Lateral Sclerosis. In *Amyotrophic Lateral Sclerosis* (pp. 1–14). Exon Publications. <https://doi.org/10.36255/exonpublications.amyotrophiclateralsclerosis.management.2021>
- WARD, J. M.; & REHG, J. E. (2014). Rodent Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 51(1), 88–101. <https://doi.org/10.1177/0300985813503571>
- YOON, G.; MALAM, Z.; PATON, T.; MARSHALL, C. R.; HYATT, E.; IVAKINE, Z.; SCHERER, S. W.; LEE, K.-S.; HAWKINS, C.; COHN, R. D.; & FINDING OF RARE DISEASE GENES (FORGE) IN CANADA CONSORTIUM STEERING COMMITTEE. (2016). Lethal Disorder of Mitochondrial Fission Caused by Mutations in DNMT1L. *The Journal of Pediatrics*, 171, 313-6.e1-2. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2015.12.060>

ANEXO I: Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030.

Tabla AI-1. Grado de relación con los Objetivos de Desarrollo Sostenible.

Objetivos de Desarrollo Sostenible		Grado de relación con el trabajo			
Número	Nombre	Alto	Medio	Bajo	No procede
1	Fin de la pobreza.				
2	Hambre cero.				
3	Salud y bienestar.	X			
4	Educación de calidad.				
5	Igualdad de género.				
6	Agua limpia y saneamiento.				
7	Energía asequible y no contaminante.				
8	Trabajo decente y crecimiento económico.				
9	Industria, innovación e infraestructuras.				
10	Reducción de las desigualdades.				
11	Ciudades y comunidades sostenibles.				
12	Producción y consumo responsables.				
13	Acción por el clima.				
14	Vida submarina.				
15	Vida de ecosistemas terrestres.				
16	Paz, justicia e instituciones sólidas.				
17	Alianzas para lograr objetivos.				

Justificación:

El trabajo se alinea con el Objetivo de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2023: Salud y bienestar. Los objetivos del trabajo son establecer el análisis funcional de diversas variantes genéticas encontradas en familias con algún miembro afectado por la enfermedad. Concretamente, estas enfermedades son, en primer lugar, una enfermedad rara caracterizada por atrofia óptica, ataxia y retraso en el desarrollo; y, en segundo lugar, la esclerosis lateral amiotrófica. El estudio funcional de estas variantes delimitaría si, como se ha predicho, son patológicas y afectarían al organismo produciendo la enfermedad. Una vez asociadas de este modo, se definirían las variantes y quedarían en la información científica por si vuelven a aparecer, al detectarse, se establecería un diagnóstico más rápido de la enfermedad. Además, podrían ser de uso fructífero en estudios futuros de biología molecular en el diseño de nuevas terapias para dianas específicas en estas enfermedades. Todo esto contribuye en mayor o menor medida a la salud y el bienestar de las personas.

Marc Miravet Martí

Valencia, Julio 2023