



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

Universitat Politècnica de València - ETSIAMN

Centro de Investigación Príncipe Felipe

Caracterización de las bases moleculares de la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth mediante secuenciación de exoma. Análisis de patogenicidad de variantes.

Trabajo final de grado

Antonio Collado Padilla

Grado Biotecnología 2016-2017

Convocatoria 7^a Julio 2017, Valencia

Dirección: Dra. Carmen Espinós Armero. Investigadora Jefa de la Unidad de Genética y Genómica de Enfermedades Neuronales y Neurodegenerativas, Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF).

Co-dirección: Paula Sancho Salmerón. Investigadora predoctoral de la Unidad de Genética y Genómica de Enfermedades Neuronales y Neurodegenerativas, Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF).

Tutorización: Dra. Lynne Paula Yenush, Profesora Titular de Universidad, Departamento de Biotecnología de la Universitat Politècnica de València (UPV).

Datos personales

Alumno: D. Antonio Collado Padilla

Datos del trabajo de fin de grado

Título del TFG: Caracterización de las bases moleculares de la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth mediante secuenciación de exoma. Análisis de patogenicidad de variantes.

Lugar de realización: Centro de Investigación Príncipe Felipe

Fecha: Julio de 2017

Localidad: Valencia

Titulación: Grado en Biotecnología

Director/a: Prof. Dña. Carmen Espinós Armero

Codirector/a: Dña. Paula Sancho Salmerón

Tutor/a: Prof. Dña. Lynne Paula Yenush

Resumen

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) se caracteriza por una amplia heterogeneidad genética con más de 80 genes implicados. Ésta se divide principalmente en dos grandes grupos en función de estudios electrofisiológicos e histopatológicos: CMT desmielinizante y CMT axonal. Aproximadamente el 80% de los pacientes con CMT1 son diagnosticados genéticamente. Sin embargo, sólo alrededor del 60% de los pacientes con CMT2 logran alcanzar el diagnóstico molecular, lo que subraya que aún quedan genes por descubrir. La secuenciación de exoma es una aproximación interesante que permite identificar nuevos genes y nuevas mutaciones implicadas en este grupo de neuropatías. Ahora bien, en una secuenciación de exoma se identifica una media de 30.000 cambios por paciente y determinar cuál de ellos es el causante de la enfermedad es un gran desafío. El análisis de segregación y los predictores informáticos de patogenicidad pueden ayudar, pero no son concluyentes. En la mayoría de casos, se identifican variantes de significado incierto (VUS, acrónimo en inglés) que deben ser investigadas mediante ensayos funcionales.

El presente trabajo comprende dos aproximaciones:

1. Análisis de datos procedentes de secuenciación de exoma que consiste en el filtrado de los datos de secuenciación de exoma de pacientes y familiares de tres familias. Una vez seleccionados los cambios candidatos a ser mutaciones causales, estos se investigarán mediante estudios *in silico* (predicción de patogenicidad y de conservación) y genéticos (análisis de segregación).

2. Investigación de la patogenicidad de la mutación *AIFM1* c.629T>C (p.F210S). La citada mutación ha sido identificada en dos hermanos afectados por un cuadro clínico grave de una forma motora CMT. Varias enfermedades han sido asociadas con mutaciones en este gen. La singularidad del cuadro clínico, al tratarse de una neuropatía motora pura, hace que sea preciso obtener evidencias experimentales que demuestran que la mutación afecta el correcto funcionamiento de la proteína. Se ha llevado a cabo un estudio morfológico mitocondrial en fibroblastos de paciente y de control sano para identificar posibles alteraciones patológicas.

Palabras clave

Neuropatía de Charcot-Marie-Tooth; secuenciación de exome; gen *AIFM1*; morfología mitocondrial

Abstract

Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease displays broad genetic heterogeneity, involving more than 80 genes. CMT is divided into two groups based on electrophysiological and histopathological studies: demyelinating CMT (or CMT1) and axonal CMT (or CMT2). Approximately 80% of CMT1 patients are able to be diagnosed genetically. However, only about 60% of CMT2 patients manage to receive an accurate molecular diagnosis, which underlines that there are still disease genes to be discovered. Exome sequencing is an interesting approach that allows to identify new genes and mutations involved in these neuropathies. Around 30.000 variants per patient are identified in exome sequencing and determining which one is the disease mutation may be challenging. Segregation analysis and informatic predictors of pathogenicity are helpful, but not concluding. In most cases, variants of unknown significance (VUS) are identified and must be investigated through functional assays.

This work has two approaches:

1. Data analysis from exome sequencing. The exome sequence filtering from patients and relatives of three families was performed. Once the candidate variants are selected, *in silico* (pathogenicity and conservation prediction) and genetic (segregation analysis) assays will be performed.

2. Research of the patogenicity of *AIFM1* c.629T>C (p.F210S) mutation. This mutation has been identified in two brothers affected by a motor form of CMT. Several diseases have been asociated to mutations in this gene. The singularity of the clinical history makes it necessary to obtain evidences that prove the effect of the mutation on the protein. A mitochondrial morphology assay has been performed in control and patient fibroblasts, in order to identify pathological alterations.

Keywords

Charcot-Marie-Tooth neuropathy; exome sequencing; *AIFM1* gene; mitochondrial morphology

Índice de contenidos

1. Introducción (pág. 1)

- 1.1. Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (pág. 1)
- 1.2. Secuenciación de nueva generación en el diagnóstico molecular (pág. 3)
- 1.3. Ensayos funcionales aplicados al diagnóstico genético (pág.4)

2. Objetivos (pág.6)

3. Materiales y métodos (pág.7)

- 3.1. Secuenciación de exoma (pág.7)
 - 3.1.1. Familias (pág.7)
 - 3.1.2. Panel de genes y secuenciación (pág.8)
 - 3.1.3. Proceso de filtrado (pág.9)
 - 3.1.4. Proceso de priorización (pág.11)
- 3.2. Estudio de la morfología mitocondrial (pág.13)
 - 3.2.1. Mutación *AIFM1* c.629T>C (p.F210S) (pág.13)
 - 3.2.2. Tinción mitocondrial (pág.13)
 - 3.2.3. Análisis informático y estadístico (pág.14)

4. Resultados (pág.15)

- 4.1. Filtrado y priorización de variantes (pág.15)
- 4.2. Fragmentación mitocondrial (pág.23)

5. Discusión (pág.26)

- 5.1. Filtrado y priorización (pág.26)
- 5.2. Ensayos funcionales (pág.27)

6. Bibliografía (pág.28)

7. Anexos (pág.34)

- 7.1. Anexo I. Abstract - Pheripheral Nerve Society Annual Meeting (PNS) (pág.34)

Índice de figuras

Figura 1. Pedigrís de las familias fCMT-405, fCMT-383 y fCMT-216. (pag. 8)

Figura 2. Fibroblastos de SGT-361 y WT tras la tinción. (pag. 24)

Figura 3. Promedio del ratio área/perímetro mitocondrial de WT y SGT-361. (pag. 26)

Índice de tablas

Tabla 1. Aspectos técnicos de la tinción mitocondrial. (pag. 14)

Tabla 2. Variantes noveles de la familia fCMT-405. (pag. 17)

Tabla 3. Variantes con frecuencia 1-9 de la familia fCMT-405. (pag. 18)

Tabla 4. Variantes noveles encontradas en la familia fCMT-383. (pag. 19)

Tabla 5. Variantes con frecuencia 1-9 encontradas en fCMT-383. (pag. 20)

Tabla 6. Variantes noveles halladas en fCMT-216. (pag. 21)

Tabla 7. Variantes con frecuencia 1-9 halladas en la familia fCMT-216. (pag. 22)

Tabla 8. Promedios del ratio área/perímetro, desviación y error estándar por ensayo y condición. (pag. 24)

Tabla 9. Promedio del ratio área/perímetro, desviación y error estándar de los tres ensayos. Resultado del test estadístico. (pag. 25)

Tabla 10. Grado de significación estadística según el valor del test. (pag. 25)

Lista de abreviaturas

- CMT: Charcot-Marie-Tooth
- Mb: Megabase
- SNP: Sistema nervioso periférico
- SNC: Sistema nervioso central
- SNS: Sistema nervioso somático
- SNA: Sistema nervioso autónomo
- dHMN: *Distal Hereditary Motor Neuropathy*, Neuropatía hereditaria motora distal
- NGS: *Next Generation Sequencing*, Secuenciación de nueva generación
- WGS: *Whole Genome Sequencing*, Secuenciación del genoma completo
- TS: *Targeted Sequencing*, Secuenciación dirigida
- WES: *Whole Exome Sequencing*, Secuenciación de todo el exoma
- AIF: *Apoptosis-Inducing Factor (AIF) Mitochondrion-associated 1*, Factor inductor de la apoptosis asociado a la mitocondria 1
- AIFsol: Forma soluble de AIF
- fCMT: Familia afectada por CMT
- VUS: *Variant of Unknown Significance*, Variante de significado incierto
- VCF: *Variant Calling File*, archivo resultado del proceso *variant calling*
- OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*
- MGD: *The Mouse Genome Database*
- UTR: *Untranslated Region*, Región no traducida
- MLS: *Mitochondrial Leading Sequence*, Secuencia de localización mitocondrial
- IGV: *Integrative Genomics Viewer*
- ZFIN: *The Zebrafish Information Network*
- PBS: *Phosphate Buffered Saline*, Tampón fosfato salino
- PFA: Paraformaldehido
- GO: *Gene Ontology*
- *Protein Atlas: The Human Protein Atlas*
- WT: *Wildtype*, control sano
- SGT-361: Individuo enfermo del estudio de morfología mitocondrial.

1. Introducción

1.1. Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth

El Sistema Nervioso Periférico (SNP) está formado por el conjunto de nervios repartidos por todo el organismo, cuya función es conectar el sistema nervioso central con el resto del cuerpo, realizando así diversas funciones. Estos nervios periféricos pueden ser sensitivos o motores. Los sensitivos se encargan de transmitir la información procedente de órganos sensoriales, ya sean internos o externos, al Sistema Nervioso Central (SNC). Por otro lado, los nervios motores tienen la función de enviar los impulsos nerviosos generados por el SNC a los distintos músculos y glándulas del cuerpo, para que estos actúen.

Otra división de carácter funcional divide el SNP en Sistema Nervioso Somático (SNS) y Sistema Nervioso Autónomo (SNA). El SNS controla el músculo esquelético, siendo el responsable del movimiento voluntario, mientras que el SNA ejerce su función sobre el músculo liso y cardíaco, es decir, lleva a cabo los movimientos involuntarios como el peristáltico del intestino delgado.

Las neuropatías periféricas consisten en patologías que afectan a los nervios que componen el SNP, por lo que no realizan correctamente su función. Este tipo de enfermedades pueden ser debidas a muchas causas, tanto adquiridas como hereditarias [1].

La enfermedad de CMT es el conjunto de neuropatías más prevalente entre las hereditarias, con una frecuencia de un enfermo por cada 2500 individuos [2]. Abarca un grupo de diversos trastornos ya que muestra una gran heterogeneidad genética y fenotípica, con la característica común de ser una polineuropatía distal simétrica con debilitamiento y atrofia progresiva de los músculos de extremidades en su inicio, así como pérdida sensorial [3].

La neuropatía de CMT se divide en dos grandes grupos en función de estudios electrofisiológicos e histopatológicos. El CMT1 o desmielinizante, en el que la estructura de mielina que permite la conducción del impulso por parte del nervio se ve afectada. Esto hace que las velocidades de conducción medias del nervio se reduzcan, siendo menores de 38 m/s. Histopatológicamente, el CMT1 se caracteriza por presentar segmentos de desaparición y reaparición de la mielina con formación de los llamados bulbos de cebolla. La forma CMT2 o tipo axonal se caracteriza por una reducción en la

población de axones que forman el nervio. La velocidad media de conducción no se ve disminuida, pero constituye una dificultad en la función de comunicación. En biopsia de nervio, se aprecia la pérdida axonal [4].

La sintomatología de estas neuropatías se deriva de la combinación de déficits de función de los nervios sensitivos y motores. La degeneración de nervios motores genera debilitamiento y atrofia muscular, así como paresia y arreflexia. También son características las deformidades en los pies (*pes cavus*). Afecta sobre todo a extremidades inferiores, pero las extremidades superiores pueden verse perjudicadas con el tiempo. Respecto a la disfunción de los nervios sensitivos, tiene como consecuencia la disminución de la capacidad de sentir dolor y variaciones de temperatura, entre otros [3].

El conjunto de genes involucrados en CMT supera los 70 (<http://neuromuscular.wustl.edu/>), lo que subraya su amplia heterogeneidad genética. Además, la complejidad se manifiesta también en el solapamiento de estos genes, coincidiendo muchos de ellos con los causantes de otras neuropatías hereditarias. Por ejemplo, se conocen 30 genes asociados con dHMN (neuropatía hereditaria motora distal), algunos de los cuales están relacionados también con CMT2 [5, 6]. Se han observado todos los tipos de herencia, tanto dominante como recesiva, ya sea autosómica o ligada al cromosoma X.

La forma CMT más común es el CMT1A causado por la duplicación de una región de 1,4 Mb que afecta al gen *PMP22*. Esta mutación responde a aproximadamente el 70% de los casos CMT1 y a alrededor del 40% del CMT. En las grandes series estudiadas se suelen resolver aproximadamente el 70-80% de los casos CMT1. Sin embargo, en las formas axonales, aproximadamente el 30-40% de pacientes permanecen sin diagnóstico [7, 8, 9, 10]. Todo ello destaca que restan genes por descubrir implicados en CMT, principalmente en CMT2.

1.2. Secuenciación de nueva generación en el diagnóstico molecular

El surgimiento de las técnicas de secuenciación de nueva generación, o *Next Generation Sequencing* (NGS) ha facilitado la obtención de grandes cantidades de secuencias en muy poco tiempo. Además, el rápido desarrollo que han experimentado a lo largo de los últimos años se manifiesta en un aún mayor rendimiento y en la reducción de los costes. La mayor accesibilidad a estas tecnologías hace posible su empleo en disciplinas como la clínica, sobre todo en cuanto al diagnóstico molecular de enfermedades genéticas. Gracias a la tecnología NGS se han identificado una gran cantidad de genes y mutaciones, lo cual, además de posibilitar el diagnóstico, ha ayudado a conocer mejor los mecanismos fisiopatológicos que subyacen en la enfermedad [11].

Las técnicas de NGS permiten la secuenciación de distintas partes del genoma dependiendo de la captura realizada. De esta manera, se puede secuenciar desde todo el genoma (*Whole Genome Sequencing*, WGS) hasta una selección de genes concretos (*Targeted Sequencing*, TS), pasando por la captura y secuenciación del exoma (*Whole Exome Sequencing*, WES), compuesto por las regiones codificantes de los genes.

Una aproximación en el diagnóstico molecular consiste en la utilización de TS, también conocido como panel de genes, con el fin de analizar en paralelo todos los genes conocidos implicados en la neuropatía. Los paneles de genes aplicados a la enfermedad de CMT y neuropatías relacionadas han mostrado que son herramientas útiles en el diagnóstico de estas patologías [12]. Sin embargo, y como ya se ha adelantado, la heterogeneidad de estas neuropatías hereditarias es tal que en muchas ocasiones conseguir el diagnóstico es difícil. Esto refleja la elevada cantidad de genes implicados en estas neuropatías que aún no han sido estudiados.

Se estima que el 85% de las mutaciones clínicas se localizan en regiones codificantes [13]. Por este motivo, la técnica WES es la más utilizada para el diagnóstico. Esta metodología tiene la ventaja de que amplifica las regiones codificantes, que suponen un 1-2% del genoma total, consiguiendo grandes mejoras en cuanto a rendimiento y coste en comparación con la secuenciación de todo el genoma.

Es necesario tener en cuenta que en cada secuenciación de exoma se encuentran una gran cantidad de variantes [11], y determinar cuál de ellas es la posible causante de la

enfermedad resulta un desafío. En este paso es preciso realizar un filtrado basado en características de la enfermedad, como la baja frecuencia y el tipo de herencia. Aun así, no existe una guía universal para dicho filtrado, y es común finalizar el proceso con varias mutaciones candidatas que requieren ser verificadas posteriormente mediante secuenciación individual de los genes, análisis de segregación y ensayos funcionales.

1.3. Ensayos funcionales aplicados al diagnóstico genético

En muchas ocasiones, cuando se procede al diagnóstico genético de una enfermedad, se identifican mutaciones novedosas, lo cual unido a la baja prevalencia característica de las enfermedades raras hace que establecer que dichas mutaciones son las responsables de la enfermedad requiera de estudios adicionales. Éstos se realizan habitualmente de forma rutinaria e incluyen análisis de segregación, cuando se disponen de muestras de familiares, e *in silico*. Respecto a estos últimos, se recurre a predictores de patogenicidad, estudios de conservación e incluso modelaje de la estructura tridimensional de la proteína. Sin embargo, no deben considerarse concluyentes y se necesitan estudios experimentales que demuestren que la función de la proteína mutada es anómala.

Son muchos los trabajos publicados en los que se llevan estudios que sirven para demostrar dichas anomalías en la función de proteínas mutadas [14, 15]. En el proceso de diagnóstico genético de unos hermanos afectados por una polineuropatía de debut temprano con afectación exclusivamente motora sin deterioro cognitivo, se detectó el cambio *AIFM1* c.629T>C (p.F210S) mediante panel de genes Neuro104, de diseño propio en la Unidad de Genética y Genómica de Enfermedades Neuromusculares y Neurodegenerativas.

Existen numerosas mutaciones descritas en el gen *AIFM1* que cuentan con ciertas evidencias que garantizan su papel en distintas neuropatías, que varían en la sintomatología, edad de aparición, severidad y progresión. Debido a la variabilidad en cuanto a la enfermedad, cabe pensar que estas mutaciones tienen efectos diferentes entre sí a nivel de fisiología celular y función proteica. Las primeras mutaciones objeto de caracterización fueron p.R201del [16] y p.E493V [17], que producen una anomalía en el plegamiento y una ganancia de función, respectivamente. Otras mutaciones

identificadas son p.G308E [18], p.G338E [19], p.G262S [20] y p.V243L [21], de las cuales posteriormente se realizaron más estudios de caracterización *in silico* y experimentales [22]. La mutación *AIFM1* c.629T>C no ha sido previamente descrita, por lo que requiere de los estudios *in silico* y funcionales para poder relacionarla con la enfermedad.

El gen *AIFM1* se localiza en una región del cromosoma X [23] y codifica para el Factor Inductor de la Apoptosis asociado a la Mitocondria 1 (*Apoptosis-Inducing Factor (AIF) Mitochondrion-associated 1*) [24, 25]. Uno de los papeles que posee este factor es el de inducir la apoptosis en las células por una vía que es independiente a las caspasas, ya que al inhibir éstas, seguía produciendo la muerte celular programada [26]. Además, estudios más recientes demuestran el papel de AIF en la fosforilación oxidativa por su interacción con un componente de la membrana mitocondrial denominado Mia40, que participa en la biogénesis y posición de los complejos I y IV de la cadena de transporte de electrones [27].

La proteína precursora, de 67kDa, se sintetiza en el citoplasma y posee dominio de transporte a la mitocondria (*Mitochondrial Leading Sequence, MLS*) situado en el extremo N-terminal [26]. Tras ser procesada, la proteína se une a FAD y queda anclada a la membrana mitocondrial interna. Gracias a esto, es capaz de oxidar a NADH y dimerizar, motivo por el cual se sugirió que podría funcionar como un sensor de NAD capaz de establecer interacciones con otras proteínas que explicarían su papel en la función mitocondrial [28].

Bajo un estímulo apoptótico, las proteínas Bax y Bid, pertenecientes a la familia Bcl-2, permeabilizan la membrana mitocondrial interna y permiten la salida de proteínas relacionadas con la apoptosis celular [29]. En estas condiciones, la forma anclada a la membrana de AIF pasa a ser sustrato de la proteasas calpaína I [30] y catepsinas B y D [31, 32], dando lugar a la forma soluble (AIFsol), que se trasloca al núcleo y es responsable de la apoptosis en el proceso denominado *parthanatos*, o condensación y fragmentación de la cromatina [33].

Debido a las funciones de AIF, las mutaciones en el gen que lo codifica podrían ser responsables en última instancia del deterioro de la cadena de transporte de electrones, y por tanto, de la fosforilación oxidativa, que proporciona la mayor parte de la energía celular en forma de ATP. Los nervios periféricos requieren un alto nivel de energía para llevar a cabo el transporte axonal. De la misma manera, las células de Schwann se

encargan de elaborar y mantener la mielina que rodea al axón para una correcta transmisión del impulso nervioso. Por estos motivos, es necesario que el metabolismo energético mitocondrial funcione correctamente [34].

Además del caso de *AIFM1*, se han desarrollado numerosos trabajos en torno a la relación entre fallos en proteínas de la mitocondria y degeneración neuronal. Por ejemplo, está bien caracterizado el efecto patológico que tiene la alteración de la fusión y fisión mitocondrial, función de la que se encargan las proteínas codificadas por los genes *MFN2* (mitofusin-2) y *GDAP1* (*ganglioside-induced differentiation-associated protein-1*), respectivamente [Revisado en 34].

Entre los ensayos funcionales a realizar se encuentra la fragmentación mitocondrial. Las mitocondrias dentro de una célula están en un constante equilibrio dinámico, fusionándose y agregándose, de forma que se establece una gran red mitocondrial celular. Una alteración en dicho equilibrio se traduce en un aumento de la fragmentación mitocondrial y puede relacionarse de forma directa con una disfunción en estos procesos celulares en los que la mitocondria participa, como en el control de la viabilidad celular (senescencia y/o apoptosis) o en la obtención de ATP por fosforilación oxidativa [35].

2. Objetivos

El presente trabajo cuenta con dos objetivos principales:

- Análisis de datos procedentes de la secuenciación del exoma de varios miembros de tres familias distintas que presentan neuropatías periféricas hereditarias, con el fin de identificar las variantes potencialmente responsables de la enfermedad.
- Estudio de la morfología mitocondrial de fibroblastos de paciente y de control sano para demostrar la patogenicidad de la mutación novel c.629T>C (p.F210S) presente en hemizigosis en el gen *AIFM1* en dos hermanos que manifiestan una neuropatía motora.

3. Materiales y métodos

3.1. Secuenciación de exoma

3.1.1. Familias

En el presente proyecto se ha trabajado con tres familias que cuentan con familiares enfermos de diferentes neuropatías. Los pedigrís de las familias, donde aparecen todos los miembros, tanto sanos como enfermos, aparecen en la Figura 1.

La familia fCMT-405 cuenta con tres individuos enfermos, uno de los progenitores (II:4) y dos de sus hijos nacidos de parejas distintas, III:4 y III:5 (Fig. 1). Los pacientes de esta familia presentan CMT2. El modo en que se manifiesta la enfermedad lleva a pensar que, además de tratarse de una enfermedad genética heredada por los hijos, ésta cursa con una herencia dominante; de lo contrario, ambas parejas II:3 y II:5 deben ser portadoras del mismo cambio que el padre II:4 para que los hijos lo hereden en homocigosis, lo cual resulta poco probable. Además, en caso de asumir una herencia recesiva, el padre debería haber heredado las mencionadas variantes por ambos progenitores.

Otra de las familias, denominada fCMT-383, tiene tres individuos pertenecientes a tres generaciones distintas que manifiestan la enfermedad: II:1, su hija III:1 y la hija de ésta, IV:1 (Fig. 1). La neuropatía que afecta a los pacientes de esta familia es una dHMN. Del mismo modo que en la familia anterior, se asume una herencia dominante, ya que una herencia recesiva implicaría la presencia de la variante causante tanto en el individuo II:1 como en el III:2, así como la herencia de ésta por parte de ambos progenitores I:1 y I:2.

La última familia, fCMT-216, consta de dos miembros que padecen CMT1: el progenitor IV:1 y su hijo V:2. Al igual que en el resto de familias, se supuso una herencia dominante, ya que de lo contrario los enfermos serían homocigotos para un cambio que deberían presentar tanto el individuo III:2 (madre del enfermo IV:1) como uno de los progenitores de IV:2. Sin embargo, en esta familia se observa una consanguinidad que se tendrá en cuenta en el posterior análisis.

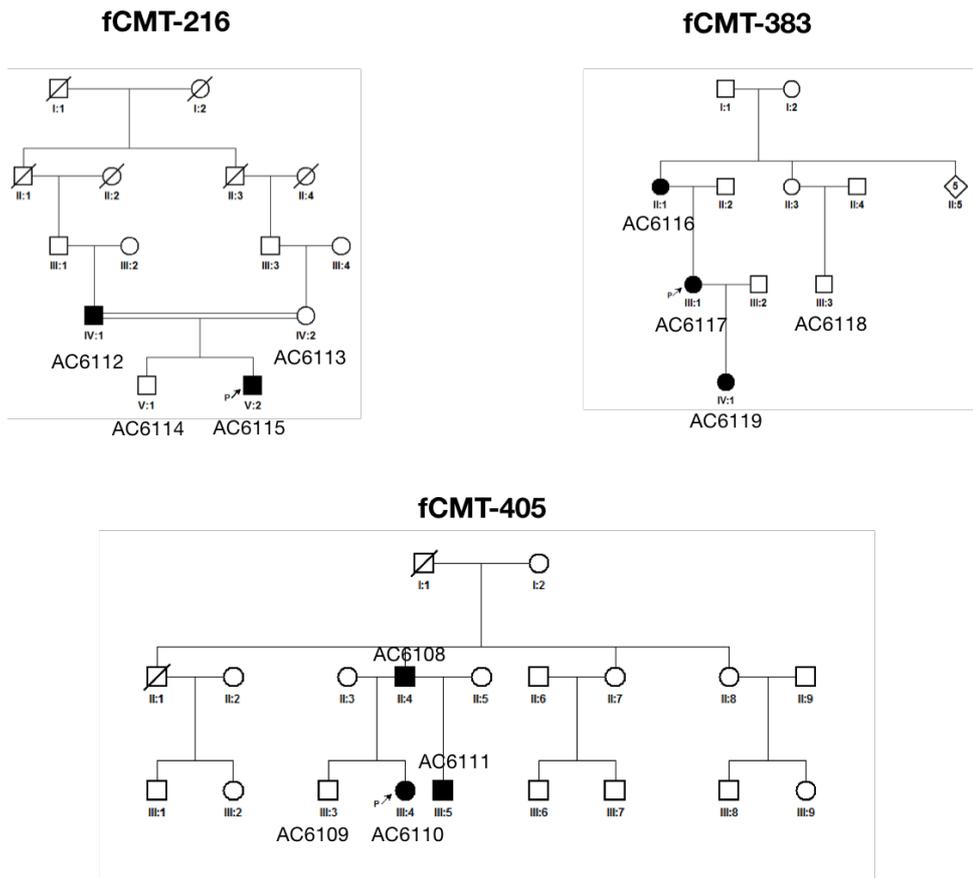


Figura 2. Pedigrís de las familias fCMT-405, fCMT-383 y fCMT-216. Los códigos AC indican los individuos cuyos exomas se secuenciaron.

3.1.2. Panel de genes y secuenciación

Para el trabajo, se emplearon muestras de ADN obtenidas de extracciones de sangre. El primer paso, no detallado en este trabajo, fue analizar las muestras con el panel de genes Neuro104 citado anteriormente. Este panel se basa en el análisis de la secuencia mediante la técnica de TS, es decir, en la captura en cada individuo de 104 genes que están implicados en la enfermedad de CMT y neuropatías relacionadas. En este primer procedimiento no se identificaron variantes candidatas a ser causantes de la enfermedad, por lo que se procedió a la secuenciación del exoma para continuar con el estudio.

Se escogieron cuatro miembros de cada familia; tres enfermos y uno sano para los casos fCMT-405 y fCMT-383, y dos enfermos y dos sanos en el caso de fCMT-216 (Fig. 1). El objetivo de esta selección fue detectar las variantes que aparecen en al menos dos enfermos y que no presentan los individuos sanos.

Tras el alineamiento de las lecturas obtenidas de la secuenciación, se realizó el *variant calling*, generando tres archivos VCF. Cada uno de estos archivos recoge todos los cambios identificados respecto al genoma de referencia, que en este caso es la versión GRCh37. En total, se generaron tres archivos en formato Excel, uno por familia, donde cada línea corresponde a una variante genética sobre la cual se añade información como su posición cromosómica, frecuencia en numerosas bases de datos, predicción de la patogenicidad del cambio, conservación de la región, etcétera.

Tanto la secuenciación de exoma como el *variant calling* fue encargado al Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica (CNAG, Barcelona).

3.1.3. Proceso de filtrado

El número de variantes detectadas es muy elevado y el objetivo es obtener un número más reducido de candidatas a ser las responsables de la enfermedad, también conocidas como variantes de significado incierto (*Variants of Unknown Significance*, VUS) que cosegreden con la enfermedad. Para ello, se ha desarrollado un pipeline compuesto por distintos pasos que constituye un método de filtrado y posterior priorización acorde a ciertas características de las presentes neuropatías.

- Como ya se ha adelantado, se asume una herencia dominante en las tres familias. Por lo tanto, el primer paso del filtrado de variantes es seleccionar aquéllas que aparezcan en heterocigosis en los pacientes (0/1) y que no estén presentes en los individuos sanos (0/0). Además, en el proceso aplicado a la familia fCMT-216 se estudiará también aquellos cambios presentes en los enfermos en homocigosis (1/1) y en heterocigosis en los miembros sanos (0/1).
- Tal y como se ha explicado en el apartado “Secuenciación de nueva generación en el diagnóstico molecular” de este trabajo, se estima que el 85% de las enfermedades mendelianas son causadas por mutaciones en regiones codificantes. En el archivo también aparece información sobre la función de la región donde se encuentran cada una de las variantes. Se seleccionaron únicamente aquellas con las etiquetas “*protein_coding*” o “*processed_transcript*”.
- También es conveniente aplicar el filtro al tipo de cambio, eliminando aquéllos que son sinónimos, aparecen en regiones intergénicas, *downstream* o *upstream*, en regiones no traducidas 5' o 3' UTR, intrónicos, en sitio de unión a factores de transcripción y en regiones cuyo transcrito no es codificante.

- A pesar de las diferencias en la manifestación de la neuropatía entre las tres familias, las tres coinciden en que se trata de enfermedades raras, por lo que el siguiente paso del filtrado es seleccionar sólo aquellas variantes de frecuencia menor del 1%. Para ello, se tendrán en cuenta simultáneamente varias bases de datos, cuya información está incluida en el archivo con el que se trabaja. Las bases de datos empleadas son *The Exome Aggregation Consortium* (<http://exac.broadinstitute.org>), *1000 Genomes Project* (<http://www.internationalgenome.org>), ARIC5606 Y ESP6500.
- Tras este paso de filtrado, las variantes restantes fueron revisadas manualmente en la base de datos de frecuencia *The Genome Aggregation Database* (<http://gnomad.broadinstitute.org>), para comprobar el número exacto de individuos en los que aparece cada variante. En función de la frecuencia de los cambios, estos fueron clasificados en tres grupos. El primer grupo está compuesto por los cambios noveles, que son los de mayor interés por no aparecer en la población. El segundo grupo está compuesto por cambios que aparezcan en la población entre 1 y 9 personas, interesantes ya que puede que el cambio patogénico ya haya aparecido en algún caso y las bases de datos no informan de la condición de las personas secuenciadas, por lo que no hay que asumir que todos los individuos secuenciados son controles. Por último, el tercer grupo cuenta con las variantes que aparecen entre 10 y 50 veces, que se tendrán en cuenta cuando alguna característica del gen en el que se encuentran sea interesante para estas enfermedades.
- También se ha tenido en cuenta la calidad de la secuenciación, ya que esta es demasiado baja para algunos cambios. En relación con este paso, fue necesario comprobar en la base de datos gnomAD la frecuencia de algunos cambios sin el filtro de calidad. Este filtro propio de la base de datos tiene en cuenta características de la calidad, como que el sitio donde aparece la variante no haya sido cubierto en un determinado porcentaje del total de individuos secuenciados. Muchos de los cambios que parecían noveles fueron descartados porque la calidad de secuenciación no era suficientemente alta, y aparecían en la base de datos como *NON-PASS* con una elevada frecuencia, es decir, no tenían calidad suficiente para superar el filtro.
- Las variantes restantes fueron revisadas en el programa *Integrative Genomics Viewer* (IGV) para corroborar que el número de lecturas en los individuos heterocigotos se aproxima a 50% para el cambio y 50% para la referencia, así

como que el número de lecturas que cubren el locus es lo suficientemente elevada.

Tras realizar el filtro de frecuencia, mediante la herramienta Venny 2.1.0 [36] se seleccionaron genes que aparecieran mutados en más de una familia, ya que éstos tendrían una alta probabilidad de ser los patogénicos.

3.1.4. Proceso de priorización

Una vez realizado el filtrado de variantes en las tres familias, se procedió al empleo de herramientas y bases de datos con el fin de priorizar unas variantes sobre otras, las cuales se detallan a continuación:

- Se comprobó la base de datos *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM, <https://www.omim.org>) con el fin de comprobar si los genes están asociados a alguna patología relacionada con el sistema nervioso o muscular. También muestra las variantes descritas al gen asociadas con dichas enfermedades y bibliografía relacionada.
- También se consultó la base *Model organism Aggregated Resources for Rare Variant Exploration* (MARRVEL, <http://marrvel.org>), que compila información sobre numerosas bases de datos. Por un lado, se tiene en cuenta la base de datos *The Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org>), donde se indican los tejidos en los que la proteína expresada por el gen ha sido localizada. Además, se considera la información sobre bases relacionadas con modelos animales, como *The Mouse Genome Database* (MGD, <http://www.informatics.jax.org>) sobre ratón [37], *The Zebrafish Information Network* (ZFIN, <http://zfin.org>) [38] sobre pez zebra, o *FlyBase* (<http://flybase.org>) [39] sobre *Drosophila melanogaster*.
- La base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org>) proporciona datos sobre los dominios de las proteínas codificadas por los distintos genes, lo que sirve para comprobar si la mutación presente en dicho gen afecta a algún dominio funcional.
- Otros parámetros útiles son los predictores de daño, que utilizan algoritmos para determinar el posible impacto de una mutación en la función de la proteína. Los utilizados son SIFT [40], que basa la predicción en el grado de conservación del residuo aminoacídico que es modificado por la variante, y PolyPhen-2, que tiene

en cuenta aspectos físicos y similitud con otras secuencias. Este último está entrenado con dos conjuntos de datos, uno llamado HumDiv con los alelos anotados en UniProt causantes de enfermedad mendeliana junto con otras diferencias proteicas asumidas como no dañinas; otro llamado HumVar que cuenta con todos los alelos causantes de enfermedad de UniProt y otros no anotados y por tanto asumidos como no dañinos, que en número son más que en el caso de HumDiv. En el caso de diagnóstico de enfermedades mendelianas, en el que se necesita diferenciar mutaciones con un elevado efecto de otras sin efecto alguno (o con un efecto ligero) en la función de la proteína, se recomienda tener en cuenta el conjunto de datos HumVar [41].

El número de variantes fue considerablemente reducido, pero para descartar más se asignó una puntuación en la que una predicción como dañino por parte de los predictores suma 3 puntos, pero una predicción en la que el resultado es que la variante es benigna resta 3 puntos, con el fin de que las variantes predichas como deletéreas sean mejor puntuadas. Si PolyPhen-2 predice el cambio como probablemente deletéreo, suma 2 puntos. También se puntúa con 3 puntos que el gen esté relacionado con una enfermedad con participación del sistema nervioso, que aparezca en el sistema nervioso según la base de datos *The Human Protein Atlas* o que afecte a un dominio de la proteína. Se añade 1 punto por cada base de datos de modelos animales (MGD, ZFIN, *FlyBase*) en la que aparezca la proteína del gen como expresada en el sistema nervioso de los mismos.

De los cambios con mayor puntuación, se buscaron algunas de sus funciones relacionadas con los términos *Gene Ontology* (GO), así como publicaciones relativas a neuropatías en Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Con este procedimiento se consigue hacer una priorización conjunta aplicada al gen (localización de la proteína, fenotipos asociados) y a la mutación concreta (dominio afectado, predicción de patogenicidad).

Es necesario tener en cuenta que los predictores sólo aportan información para las variantes no sinónimas o de cambio aminoacídico (*missense*), pero se han identificado varias mutaciones que suponen ganancia de codones de STOP (generación de proteínas truncadas), pérdida de los mismos, o deleciones. Los genes que presenten dichos cambios serán revisados según este último paso funcional.

3.2. Estudio de la morfología mitocondrial

3.2.1. Mutación *AIFM1* c.629T>C (p.F210S)

Como ya se ha adelantado en el apartado “Ensayos funcionales aplicados al diagnóstico genético”, en este trabajo se procederá a realizar la parte del conjunto de ensayos funcionales relativa al estudio de la fragmentación mitocondrial para demostrar la patogenicidad de la mutación *AIFM1* c.629T>C (p.F210S), gen que ya contaba con mutaciones descritas asociadas a neuropatías de distintas características. Esta mutación se identificó en dos hermanos afectados por una polineuropatía axonal sin deterioro cognitivo y con aparición temprana.

El análisis de segregación mostró que la madre sana era portadora en heterocigosis de la misma, mientras que su padre no. Su hermano enfermo también portaba el citado cambio en homocigosis. Los análisis *in silico* de predicción de la patogenicidad del cambio, mostraron que era probablemente deletéreo y los de conservación que se trataba de un residuo altamente conservado en la evolución. Consecuentemente, los estudios genéticos e *in silico* adicionales, apuntaba a que realmente la mutación detectada podría afectar la función correcta de la proteína.

3.2.2. Tinción mitocondrial

El estudio se realizará utilizando fibroblastos obtenidos de uno de los hermanos, paciente que recibe el nombre de SGT-361, procedente de biopsia de piel. También es necesario el uso de fibroblastos procedentes de un control sano, que en adelante se conocerá como WT.

Se partió de 350.000 fibroblastos sembrados en placas de 2 ml. En total se trabaja con seis placas de cultivo, tres de cultivo de fibroblastos SGT-361 (caso índice) y tres con fibroblastos de WT (control sano), consiguiendo tres réplicas biológicas del ensayo. En cada placa de cultivo se colocan dos cubreobjetos a partir de los cuales se hará el montaje una vez llevada a cabo la tinción. Los cultivos crecieron durante 48 horas en medio basal Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) sin glucosa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) suplementado con un 10% de Suero Bovino Fetal inactivado por calor (FBS, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) y antibióticos. Los pasos del proceso aparecen detallados en la Tabla 1.

Tabla 11. Aspectos técnicos de la tinción mitocondrial.

Tinción	MitoTracker® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 75 nM en medio de cultivo 30 minutos en oscuridad a 37°C
Lavados	PBS 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente (x3)
Fijación	PFA al 4% 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente
Lavados	PBS 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente (x3)
Montaje	Vecta-Shield Mounting Medium con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente

Por cada genotipo y ensayo se tomaron 10 imágenes utilizando el microscopio confocal Leica SP8 © (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

3.2.3. Análisis informático y estadístico

A partir de las imágenes capturadas en el microscopio de las células cuyas mitocondrias fueron teñidas, se utilizó una herramienta dentro del paquete ImageJ para el análisis morfológico mitocondrial. Este macro fue desarrollado por el Dr. Ruben K. Dagda (University of Nevada School of Medicine) [42]. Se aplicó una inversión de los colores, así como un umbral para normalizar y conseguir que las mitocondrias fueran correctamente identificadas. Tras el marcaje del perímetro de una célula individual, el programa calcula el ratio área/perímetro medio de todas las mitocondrias de la célula. Dicho valor hace referencia al estado de fragmentación de la red mitocondrial, siendo inferior cuando más fragmentadas se encuentren.

Por cada imagen se analizaron una media de 5 células, lo cual supone un total de 50 células analizadas por ensayo y muestra. Los datos del ratio área/perímetro fueron almacenados para su posterior análisis estadístico, que cuenta con un test t de Student.

4. Resultados

4.1. Filtrado y priorización de variantes

Las variantes que superan el filtro realizado, antes de la priorización, están repartidas en dos tablas por familia, según su frecuencia (Tablas 2-7). En las mismas también se recoge información sobre patologías asociadas al gen; el tipo de cambio; su expresión en ser humano, ratón, pez zebra y *Drosophila melanogaster*; dominio afectado por la mutación; predicción por SIFT y PolyPhen-2; y la puntuación asignada tal y como se ha indicado en “Proceso de priorización”.

Entre las variantes noveles de fCMT-405 (Tabla 2) destacan dos protocadherinas, la 18 y la β -protocadherina. Sin embargo, la protocadherina 18 no ha mostrado una segregación favorable, aunque pasa el filtro de calidad. Se relacionan con la realización de la sinapsis y la proyección neuronal. También destaca el gen *LAMP1*, que codifica para glicoproteína asociada a la membrana lisosomal 1. Se ha demostrado la relación funcional con la catepsina- β involucrada en la eliminación de placas β -amiloides. Sin embargo, su expresión es muy elevada en todos los tejidos y no es específica del sistema nervioso.

Respecto a aquéllas que aparecen en la población entre 1 y 9 veces (Tabla 3), se encuentra una mutación en *FAM111A*, que codifica para la proteína homónima y está relacionada con la hipomagnesemia, asociada a su vez con la irritabilidad neuromuscular. La proteína codificada por el gen *STARD10*, sin embargo, se asocia a funciones reproductivas por similitud, por lo que no es interesante. La proteína sintetizada por *MAVS* se relaciona con una respuesta antiviral por parte de la mitocondria, lo cual no tiene relación con , y *PASK* tiene varios términos GO sobre envoltura de axones en *Drosophila melanogaster* y fisiología nerviosa anormal en ratón. La truncación aparecida en *POLM* se relaciona con hipermutación de inmunoglobulinas y linfocitos B, por lo que se descarta.

En el conjunto de variantes noveles de fCMT-383 (Tabla 4) son llamativas aquéllas de los genes *LRP6* y *PIK3C2A*. El primero codifica para la proteína relacionada con el receptor de LDL (lipoproteína de baja densidad) 6, que es un correceptor Wnt que interviene en el metabolismo del folato y reparación de neurotoxicidad. Algunos términos GO lo relacionan con cuerpo celular de neuronas y sinapsis. Por otro lado, *PIK3C2A* está relacionada con el metabolismo de la glucosa y también con las vesículas de clatrina. Otros dos cambios que no son *missense* aparecen, de los cuales destaca una forma truncada en *MTAP*, gen que se asocia con una estenosis medular.

En el conjunto de genes con cambios *missense* de frecuencias 1-9 (Tabla 5) destaca *LAMB4*, que codifica para la subunidad β -4 de la laminina. Los términos GO en ratón lo asocian con la sinapsis, la unión neuromuscular y la guía del axón.

Por último, entre los cambios noveles de la familia fCMT-216 (Tabla 6) cabe destacar dos presentes en el gen *UTRN*. Este gen codifica para la utrofina, similar a la distrofina pero presente en el desarrollo embrionario. Una vez que la distrofina ocupa su papel, la utrofina se localiza en la unión neuromuscular.

Entre las variantes con frecuencia 1-9 (Tabla 7), destacan las encontradas en *NOX5*. Este gen codifica para una NADPH oxidasa que se encarga de procesos redox en linfocitos y células germinales masculinas, pudiendo tener un papel en la apoptosis. La localización no resulta interesante para estas enfermedades.

Resulta interesante la aparición de cambios en dos familias en *C20orf194*. La familia fCMT-405 presenta una delección en esta región, mientras que en fCMT-216 se ha detectado una mutación de cambio aminoacídico, siendo ambos noveles. Existe un estudio que relacionó una ataxia espinocerebelar con un *locus* localizado en la región 20p13. Este locus comprendía 37 genes, uno de los cuales es *C20orf194*; sin embargo, finalmente se asoció con otro de los genes presentes en el locus, *NOP56* [43].

Tabla 12. Variantes novedales de la familia fCMT-405

Gen	Cambio	OMIM	Protein Atlas	MGD	ZFIN	FlyBase	Dominio	SIFT	PolyPhen HumVar	Puntuación	
<i>C20orf194</i>	Delección en pauta	-	SN	-	-	-	-	-	-	1	
<i>LAMP1</i>	Cambio de aminoácido	-	SN	SN	-	SN	Second lumenal domain	D	D	14	
<i>MYH11</i>		-	-	SN	-	-	Myosin motor	D	B	4	
<i>NDE1</i>		Hidranencef., Lisencefalia 4	SN	SN	-	-	-	T	B	1	
<i>PCDH18</i>		-	SN	SN	SN	-	Cadherin 1	D	D	14	
<i>PCDHB8</i>		-	-	-	SN	-	Cadherin 1	D	D	10	
<i>SLC25A2</i>		-	-	SN	-	-	Repeat solcar 2	D	B	4	
<i>TH</i>		Síndrome Segawa	-	-	SN	SN	SN	-	T	B	0

T: Tolerado, B: Benigno, P: Probablemente dañino, D: Dañino. SN: Expresión en sistema nervioso.

Tabla 13. Variantes con frecuencia 1-9 de la familia fCMT-405

Gen	Cambio	OMIM	Protein Atlas	MGD	ZFIN	FlyBase	Dominio	SIFT	PolyPhen HumVar	Puntuación
<i>FAM111A</i>	Cambio de aminoácido	Kenny-Caffey tipo 2	SN	SN	-	-	SV40 Interaction	D	D	16
<i>GRTP</i>		-	-	SN	SN	SN	-	T	B	-3
<i>LATS1</i>		-	SN	SN	SN	SN	Kinase	T	B	3
<i>MAVS</i>		-	SN	-	SN	-	-	D	D	10
<i>MED17</i>		Microcefalia, atrofia cerebral	-	-	-	-	-	T	P	2
<i>MYH13</i>		-	-	-	-	-	Coiled coil	D	P	8
<i>PASK</i>		-	SN	SN	-	SN	-	D	D	11
<i>STARD10</i>		-	SN	SN	-	-	START	D	P	12
<i>ZNF304</i>		-	SN	SN	-	SN	Zinc finger	T	B	2
<i>POLM</i>	Ganancia STOP	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>FAM65C</i>	Región de splice	-	SN	-	-	-	-	-	-	3

T: Tolerado, B: Benigno, P: Probablemente dañino, D: Dañino. SN: Expresión en sistema nervioso.

Tabla 14. Variantes novedales encontradas en la familia fCMT-383.

Gen	Cambio	OMIM	Protein Atlas	MGD	ZFIN	FlyBase	Dominio	SIFT	PolyPhen HumVar	Puntuación
<i>CIT</i>	Cambio de aminoácido	Microcefalia 17 recesiva	SN	SN	-	-	-	T	B	1
<i>GJA10</i>		-	-	-	SN	-	-	D	D	7
<i>KIAA1107</i>		-	SN	SN	-	-	-	T	B	-2
<i>LRP6</i>		-	SN	SN	-	SN	LDL receptor	D	D	14
<i>MROH6</i>		-	-	-	-	SN	-	D	B	1
<i>NRP1</i>		-	-	-	SN	SN	MAM domain	D	B	5
<i>OR51M1</i>		-	-	-	-	-	-	D	D	6
<i>PAPD5</i>		-	-	-	-	-	-	T	B	-6
<i>PIK3C2A</i>		-	SN	-	SN	SN	Clatrin interaction	T	D	8
<i>TTC7A</i>		-	-	-	SN	SN	TPR1 repeat	T	B	-1
<i>OXA1L</i>	Región de <i>splice</i>	-	-	-	SN	SN	-	-	-	2
<i>MTAP</i>	Ganancia de STOP	Estenosis medular diafisaria	-	SN	SN	SN	-	-	-	6

T: Tolerado, B: Benigno, P: Probablemente dañino, D: Dañino. SN: Expresión en sistema nervioso.

Tabla 15. Variantes con frecuencia 1-9 encontradas en fCMT-383.

Gen	Cambio	OMIM	Protein Atlas	MGD	ZFIN	FlyBase	Dominio	SIFT	PolyPhen HumVar	Puntuación
<i>ANKRD62</i>	Cambio de aminoácido	-	-	-	-	-	Coiled coil	T	B	-3
<i>FAM46A</i>		-	-	-	-	-	-	D	D	6
<i>FAM98A</i>		-	-	-	-	-	-	T	B	-6
<i>HNRNPLL</i>		-	SN	SN	-	SN	RRM1 domain	T	B	2
<i>LAMB4</i>		-	SN	SN	SN	-	Laminin domain	D	D	14
<i>MAP2K2</i>		-	SN	SN	SN	SN	Kinase	T	B	3
<i>SLC39A4</i>		-	-	SN	-	-	-	T	B	-3
<i>THUMPD1</i>		-	-	-	SN	-	-	D	B	0
<i>TRIM56</i>		-	SN	-	SN	SN	-	T	D	5
<i>ZNF215</i>		-	-	SN	SN	-	Zinc finger	T	P	4

T: Tolerado, B: Benigno, P: Probablemente dañino, D: Dañino. SN: Expresión en sistema nervioso.

Tabla 16. Variantes novedales halladas en fCMT-216

Gen	Cambio	OMIM	Protein Atlas	MGD	ZFIN	FlyBase	Dominio	SIFT	PolyPhen HumVar	Puntuación
<i>JAK3</i>	Cambio de aminoácido	-	-	SN	-	SN	FERM	T	B	-1
<i>PXDNL</i>		-	-	SN	-	SN	IG-like	D	P	10
<i>RBM34</i>		-	SN	SN	SN	-	RRM	D	D	14
<i>SDCBP2</i>		-	-	-	SN	SN	-	D	D	8
<i>TGFA</i>		-	SN	-	-	-	-	T	D	3
<i>TOP2B</i>		-	SN	SN	SN	SN	-	D	B	6
<i>UTRN</i>		-	SN	SN	-	SN	Espectrin 9	D	D	14
<i>UTRN</i>		-	SN	SN	-	SN	Espectrin 20	T	B	2
<i>ZNF469</i>		-	-	-	-	-	-	T	B	-6
<i>ZNF469</i>		-	-	-	-	-	-	D	B	0
<i>C20orf194</i>		-	SN	-	-	-	-	D	B	3

T: Tolerado, B: Benigno, P: Probablemente dañino, D: Dañino. SN: Expresión en sistema nervioso.

Tabla 17. Variantes con frecuencia 1-9 halladas en la familia fCMT-216.

Gen	Cambio	OMIM	Protein Atlas	MGD	ZFIN	FlyBase	Dominio	SIFT	PolyPhen HumVar	Puntuación
<i>FBN1</i>	Cambio de aminoácido	-	-	-	-	-	-	T	B	-6
<i>KIAA0319</i>		Susceptible a dislexia	-	SN	-	SN	MANSC	T	B	2
<i>NBPF1</i>		-	SN	-	-	-	NBPF 5 domain	-	-	6
<i>NBPF1</i>		-	SN	-	-	-	NBPF 5 domain	-	-	6
<i>NOX5</i>		-	-	-	-	-	EF-hand	D	D	9
<i>PPP4R4</i>		-	-	SN	-	-	-	T	B	-3
<i>SLC22A9</i>		-	-	-	-	-	-	T	B	-6
<i>TPP2</i>		-	SN	-	-	-	Peptidase S8	T	B	0
<i>VAMP4</i>		-	SN	SN	SN	SN	v-SNARE	T	B	3
<i>ZNF407</i>		-	SN	-	-	-	-	D	D	9
<i>ZNHIT2</i>		-	-	SN	-	-	-	D	P	6
<i>GMNN</i>	Región de <i>splice</i>	-	-	SN	SN	-	-	T	P	1
<i>OR4A47</i>	Pérdida de STOP	-	-	-	-	-	-	-	-	0

T: Tolerado, B: Benigno, P: Probablemente dañino, D: Dañino. SN: Expresión en sistema nervioso.

Respecto a las coincidencias entre familias, se identificó la misma mutación en los individuos afectados de las familias fCMT-405 y fCMT-383, una mutación de cambio de aminoácido en la posición 9:131186822 en el gen *CERCAM*. Sin embargo, no era novel (rs768877508).

Igualmente se detectaron un conjunto de mutaciones de cambio de aminoácido noveles entre los enfermos de las familias fCMT-405 y fCMT-216, pero éstas se encuentran en la región del gen *IGHV3-11*. Se descartaron por la función del gen, relacionado con la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulinas.

También aparecían variantes de cambio de aminoácido en varios genes en común entre varias familias, aunque no se trataba de una misma mutación compartida. Son genes como *MUC2* o *MUC6*, relacionados con el sistema digestivo. Ninguno de estos genes ha sido tenido en cuenta por su función.

Para finalizar, aunque se comprobó los cambios en homocigosis para la familia fCMT-216 debido a su consanguinidad, no se detectó ninguno interesante debido a que todos tenían una elevada frecuencia.

4.2. Fragmentación mitocondrial

En las imágenes tomadas al microscopio confocal, ya se puede observar una mayor fragmentación mitocondrial en SGT-361 comparado con WT tal y como se muestra en la Figura 2. En la ampliación de la imagen correspondiente a SGT-361 es posible ver zonas aisladas teñidas, en contraposición con WT, cuyos fibroblastos poseen una red compuesta por filamentos más largos y fusionados.

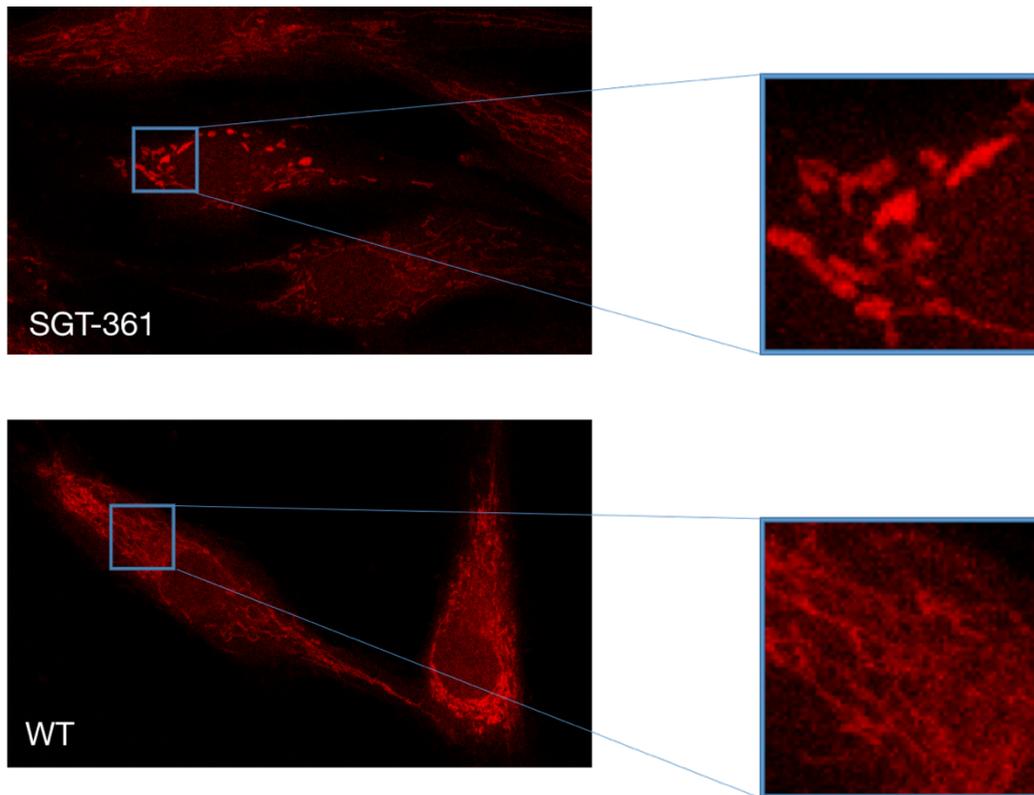


Figura 3. Fibroblastos de SGT-361 y WT tras la tinción.

Sin embargo, la utilización del programa informático citado en “Análisis informático y estadístico” permite demostrar esta mayor fragmentación estadísticamente. Tras obtener todos los valores del ratio área/perímetro de cada una de las 50 células cuantificadas por muestra y ensayo, se realizaron las medias, presentes en la Tabla 8. También se calculó la desviación estándar y el error estándar de las 50 medidas realizadas por muestra y ensayo.

Tabla 18. Promedios del ratio área/perímetro, desviación y error estándar por ensayo y condición.

Muestra	Ensayo	Promedio del ratio área/perímetro	Desviación estándar	Error estándar
WT	1	4,529	1,075	0,538
	2	4,630	1,478	0,739
	3	4,611	1,447	0,724
SGT-361	1	2,754	0,510	0,255
	2	2,858	0,884	0,442

	3	2,974	0,912	0,221
--	---	-------	-------	-------

El siguiente paso es realizar las medias de los ensayos de WT y de SGT-361 por separado, así como la desviación estándar y el error estándar entre los tres valores de cada muestra. Esto permitirá demostrar mediante un test t de Student que los valores entre WT y SGT-361 son significativamente diferentes. El resultado del mismo aparece en la Tabla 9. El p-valor resultante de dicho test es un indicativo de la significancia, existiendo distintos grados resumidos en la Tabla 10.

Tabla 19. Promedio del ratio área/perímetro, desviación y error estándar de los tres ensayos. Resultado del test estadístico.

Muestra	Promedio del ratio área/perímetro	Desviación estándar	Error estándar	t de Student
WT	4,590	0,054	0,027	0,000186842
SGT-361	2,862	0,110	0,055	

Tabla 20. Grado de significación estadística según el valor del test.

Grado de significancia	p-valor
*	< 0,05
**	< 0,01
***	< 0,001

Los resultados de las medias de los ratios área/perímetro de WT y SGT-361 aparecen de forma gráfica en la Figura 3, junto con el error y la significancia de la diferencia entre ambos valores.

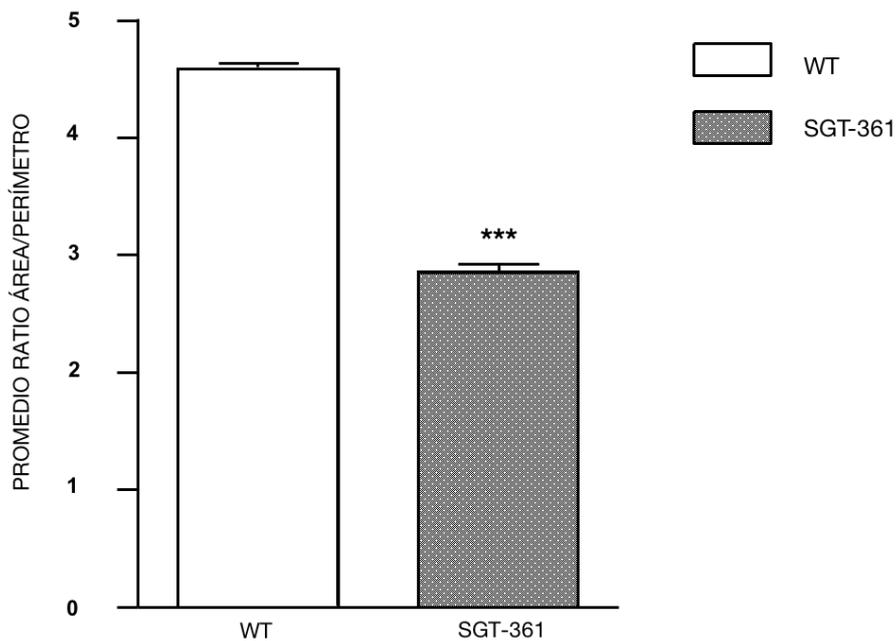


Figura 4. Promedio del ratio área/perímetro mitocondrial de WT y SGT-361.

5. Discusión

5.1. Filtrado y priorización

Tras el filtrado de exoma, quedan una serie de variantes divididas en noveles o de aparición entre 1 y 9 veces en la población (baja frecuencia). A partir de este punto, resulta difícil determinar cuál es la causante de la enfermedad. Como ya se ha hablado en apartados anteriores, para determinar la patogenicidad de una variante es necesario realizar estudios *in silico* y funcionales; sin embargo, el número de candidatos es elevado y sólo se cuenta con herramientas como la información sobre la función del gen, los predictores de patogenicidad en la proteína o la expresión en tejidos de interés para priorizar, entre otros. Por tanto, el paso más conveniente en el diagnóstico molecular de estos pacientes sería la extracción de muestras de nuevos familiares con el propósito de investigar en ellos los cambios detectados. De esta manera, un cierto número de variantes candidatas podría ser descartado por aparecer en individuos sanos de esa misma familia. Así está descrito que la secuenciación de exoma conduce a diagnóstico molecular en aproximadamente el 25% de los casos [44] y que este

porcentaje aumenta cuando es posible la realización de análisis de segregación a un número relevante de individuos de la familia [45].

Además, es necesario tener en cuenta que hay cambios que no se han tenido en cuenta, como los intrónicos, en regiones intergénicas, regiones UTR, etcétera, y que éstos existen asociados múltiples enfermedades [13].

Otra aproximación interesante sería comprobar las interacciones que tienen las proteínas codificadas por estos genes con otras para comprobar si existe alguna relación con algún gen relacionado con neuropatías, para lo cual puede utilizarse la herramienta STRING (<https://string-db.org>). La construcción del interactoma de una proteína en concreto puede revelar la existencia de interactores de interés y por tanto, posibles nuevos genes implicados en la enfermedad, tal y como se ha publicado anteriormente [46, 47].

5.2. Ensayos funcionales

Los resultados del ensayo realizado con los fibroblastos del probando comparado con el control sano reflejan que el ratio área/perímetro mitocondrial es significativamente más bajo en el paciente que en el control, demostrando que el primero presenta una fragmentación mitocondrial mucho más elevada que el segundo, tal y como se esperaba al ser portador de la mutación *AIFM1* c.629C>T (p.F210S), gen relacionado con el metabolismo mitocondrial [26, 48, 16].

La fragmentación mitocondrial supone un parámetro bien establecido que se relaciona con condiciones pre-apoptóticas y una alteración del metabolismo mitocondrial a nivel de fosforilación oxidativa [17]. Sin embargo, además del ensayo realizado en el presente trabajo, existen otros previos del laboratorio que igualmente buscan la demostración de la patogenicidad de esta variante. Estos resultados sostienen que la mutación provoca una menor cantidad de proteína, una alteración general de la morfología celular y a pesar de no encontrar alteraciones en la función apoptótica, los fibroblastos del paciente parecen tener un marcado fenotipo senescente.

Quedaría pendiente la realización de otros ensayos relacionados con la caracterización de la mutación, como el análisis de la fosforilación oxidativa para detectar posibles alteraciones en la generación de ATP. Los resultados extraídos de este futuro

experimento arrojarían luz al efecto que está teniendo la mutación sobre la función de la proteína.

El presente resultado del ensayo de fragmentación mitocondrial, así como los citados previos pertenecientes al laboratorio, serán presentados en una comunicación al congreso “*Peripheral Nerve Society Annual Meeting*” (PNS) que se celebrará en Sitges este mes de julio (8-10 de julio, 2017), cuyo abstract se adjunta en el Anexo I. Además, todos estos resultados, se recogerán en una publicación que actualmente se encuentra en preparación.

6. Bibliografía

1. HUGHES, R. (2002) Regular review: Peripheral neuropathy. *BMJ*, 324(7335), pp.466-469.
2. COMBARROS, O., CALLEJA, J., POLO, J.M., BERCIANO, J. (1987). Prevalence of hereditary motor and sensory neuropathy in Cantabria. *Acta Neurol Scand*, 75(1), pp.9-12
3. SZIGETI, K. and LUPSKI, J. (2009) Charcot–Marie–Tooth disease. *European Journal of Human Genetics*, 17(6), pp.703-710
4. WEIS, J., CLAEYS, K. G., ROOS, A., AZZEDINE, H., KATONA, I., SCHRODER, J.M., et al. (2016) Towards a functional pathology of hereditary neuropathies. *Acta Neuropathol.* 133, pp.493–515.
5. ROSSOR, A., KALMAR, B., GREENSMITH, L. and REILLY, M. (2011). The distal hereditary motor neuropathies. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 83(1), pp.6-14
6. BANSAGI, B., GRIFFIN, H., WHITTAKER, R., ANTONIADI, T., EVANGELISTA, T., MILLER, J., GREENSLADE, M., FORESTER, N., DUFF, J., BRADSHAW, A., KLEINLE, S., BOCZONADI, V., STEELE, H., RAMESH, V., FRANKO, E., PYLE, A., LOCHMÜLLER, H., CHINNERY, P. and HORVATH, R. (2017) Genetic heterogeneity of motor neuropathies. *Neurology*, 88(13), pp.1226-1234.
7. SIVERA, R., SEVILLA, T., VILCHEZ, J.J., MARTINEZ-RUBIO, D., CHUMILLAS, M.J., VAZQUEZ, J.F., MUELAS, N., BATALLER, L., MILLAN, J.M., PALAU, F., ESPINÓS, C. (2013) Charcot-Marie-Tooth disease: Genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series. *Neurology*. 81, pp.1617-1625.

8. FRIDMAN, V., BUNDY, B., REILLY, M.M., PAREYSON, D., BACON, C., BURNS, J., DAY, J., FEELY, S., FINKEL, R.S., GRIDER, T., KIRK, C.A., HERMANN, D.N., LAURA, M., LI, J., LLOYD, T., SUMNER, C.J., MUNTONI, F., PISCOSQUITO, G., RAMCHANDREN, S., SHY, R., SISKIND, C.E., YUM, S.W., MORONI, I., PAGLIANO, E., ZUCHNER, S., SCHERER, S.S., SHY, M.E. (2015) CMT subtypes and disease burden in patients enrolled in the Inherited Neuropathies Consortium natural history study: a cross-sectional analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 86, pp.873-878.
9. MURPHY, S.M., LAURA, M., FAWCETT, K., PANDRAUD, A., LIU, Y.T., DAVIDSON, G.L., ROSSOR, A.M., POLKE, J.M., CASTLEMAN, V., MANJI, H., LUNN, M.P., BULL, K., RAMDHARRY, G., DAVIS, M., BLAKE, J.C., HOULDEN, H. REILLY, M.M. (2012) Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 83, pp.706-710.
10. SAPORTA, A.S., SOTTILE, S.L., MILLER, L.J., FEELY, S.M., SISKIND, C.E., SHY, M.E. (2011) Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol*. 69, pp.22-33.
11. LIU, Y., LEE, Y. and SOONG, B. (2015). What we have learned from the next-generation sequencing: Contributions to the genetic diagnoses and understanding of pathomechanisms of neurodegenerative diseases. *Journal of Neurogenetics*, 29(2-3), pp.103-112
12. LUPO, V. et al. Assessment of Targeted Next-Generation Sequencing as a Tool for the Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth Disease and Hereditary Motor Neuropathy. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 18(2) , pp.225 – 234
13. COOPER, D.N., CHEN, J.M., BALL, E.V., HOWELLS, K., MORT, M., PHILLIPS, A.D., CHUZHANOVA, N., KRAWCZAK, M., KEHRER-SAWATZKI, H., STENSON, P.D. (2010) Genes, mutations, and human inherited disease at the dawn of the age of personalized genomics. *Hum Mutat*. 31(6):631-55.
14. SEVILLA, T., SIVERA, R., MARTINEZ-RUBIO, D., LUPO, V., CHUMILLAS, M.J., CALPENA, E., DOPAZO, J., VÍLCHEZ, J., PALAU, F., ESPINÓS, C. (2015) The EGR2 gene is involved in axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Eur J Neurol*, 22: 1548-55.
15. LUPO, V., PASCUAL-PASCUAL, S.I., SANCHO, P., CALPENA, E., GUTIÉRREZ-MOLINA, M., MATEO-MARTÍNEZ, G., ESPINÓS, C*, ARRIOLA-PEREDA, G. (2015) Complexity of the hereditary motor and sensory neuropathies: clinical and cellular characterization of the MPZ p.D90E mutation. *J Child Neurol*; 30: 1544-48

16. HANGEN, E., BLOMGREN, K., BENIT, P., KROEMER, G. & MODITAHEDI, N. (2010). Life with or without AIF. *Trends Biochem. Sci.* 35, pp.278-287.
17. GHEZZI, D., SEVRIOUKOVA, I., INVERNIZZI, F., LAMPERTI, C., MORA, M., D'ADAMO, P., NOVARA, F., ZUFFARDI, O., UZIEL, G. & ZEVIANI, M. (2010). Severe X-linked mitochondrial encephalomyopathy associated with a mutation in apoptosis-inducing factor. *Am. J. Hum. Genet.* 86, pp.639-649.
18. ARDISSONE, A., PISCOSQUITO, G., LEGATI, A., LANGELLA, T., LAMANTEA, E., GARAVAGLIA, B., SALSANO, E., FARINA, L., MORONI, I., PAREYSON, D. & GHEZZI, D. (2015). A slowly progressive mitochondrial encephalomyopathy widens the spectrum of AIFM1 disorders. *Neurology*, 84, 2193-2195.
19. BERGER, I., BEN-NERIAH, Z., DOR-WOLMAN, T., SHAAG, A., SAADA, A., ZENVIRT, S., RAAS-ROTHSCHILD, A., NADJARI, M., KAESTNER, K. H. & ELPELEG, O. (2011). Early prenatal ventriculomegaly due to an AIFM1 mutation identified by linkage analysis and whole exome sequencing. *Mol. Genet. Metab.* 104, pp.517-520
20. KETTWIG, M., SCHUBACH, M., ZIMMERMANN, F. A., KLINGE, L., MAYR, J. A., BISKUP, S., SPERL, W., GARTNER, J. & HUPPKE, P. (2015). From ventriculomegaly to severe muscular atrophy: expansion of the clinical spectrum related to mutations in AIFM1. *Mitochondrion* 21, pp.12-18.
21. ZONG, L., GUAN, J., EALY, M., ZHANG, Q., WANG, D., WANG, H., ZHAO, Y., SHEN, Z., CAMPBELL, C. A., WANG, F., YANG, J., SUN, W., LAN, L., DING, D., XIE, L., QI, Y., LOU, X., HUANG, X., SHI, Q., CHANG, S., XIONG, W., YIN, Z., YU, N., ZHAO, H., WANG, J., SALVI, R. J., PETIT, C., SMITH, R. J. & WANG, Q. (2015). Mutations in apoptosis-inducing factor cause X-linked recessive auditory neuropathy spectrum disorder. *J. Med. Genet.* 52, pp.523-531.
22. SEVRIOUKOVA, I.F., (2016) Structure/function relations in AIFM1 variants associated with neurodegenerative disorders. *Journal of Molecular Biology*, 428(18), pp.3650-3665.
23. DAUGAS, E., NOCHY, D., RAVAGNAN, L., LOEFFLER, M., SUSIN, S., ZAMZAMI, N. and KROEMER, G. (2000). Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Letters*, 476(3), pp.118-123.
24. SUSIN, S., ZAMZAMI, N., CASTEDO, M., HIRSCH, T., MARCHETTI, P., Macho, A., DAUGAS, E., GEUSKENS, M., and KROEMER, G. (1996). Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *Journal of Experimental Medicine*,

- 184(4), pp.1331-1341.
25. DIODATO, D., TASCA, G., VERRIGNI, D., D'AMICO, A., RIZZA, T., TOZZI, G., MARTINELLI, D., VERARDO, M., INVERNIZZI, F., NASCA, A., BELLACCHIO, E., GHEZZI, D., PIEMONTE, F., DIONISI-VICI, C., CARROZZO, R. & BERTINI, E. (2015). A novel AIFM1 mutation expands the phenotype to an infantile motor neuron disease. *European Journal of Human Genetics*, 24(3), pp.463-466.
 26. SUSIN, S., LORENZO, H.K., ZAMZAMI, N., MARZO, I., SNOW, B.E., BROTHERS, G.M., MANGION, J., JACOTOT, E., COSTANTINI, P., LOEFFLER, M., LAROCLETTE, N., GOODLETT, D.R., AEBERSOLD, R., SIDEROVSKI, D.P., PENNINGER, J.M., & KROEMER, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: pp.441–446.
 27. CHACINSKA, A., PFANNSCHMIDT, S., WIEDEMANN, N., KOZIAK, V., SANJUAN-SZKLARZ, L. K., SCHULZE-SPECKING, A., TRUSCOTT, K. N., GUIARD, B., MEISINGER, C. & PFANNER, N. (2004) Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *EMBO J.* 23, 3735-3746.
 28. CHURBANOVA, I. Y. & SEVRIOUKOVA, I. F. (2008) Redox-dependent changes in molecular properties of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J. Biol. Chem.* 283, 5622-5631.
 29. HARADA, H., GRANT, S. (2003) Apoptosis regulators. *Rev Clin Exp Hematol*; 7:117–138.
 30. CAO, G., XING, J., XIAO, X., LIOU, A., GAO, Y., YIN, X., CLARK, R., GRAHAM, S. & CHEN, J. (2007). Critical Role of Calpain I in Mitochondrial Release of Apoptosis-Inducing Factor in Ischemic Neuronal Injury. *Journal of Neuroscience*, 27(35), pp.9278-9293.
 31. YACOUB, A., PARK, M. A., HANNA, D., HONG, Y., MITCHELL, C., PANDYA, A. P., HARADA, H., POWIS, G., CHEN, C. S., KOUMENIS, C., GRANT, S., & DENT, P. (2006) OSU-03012 promotes caspase-independent but PERK-, cathepsin B-, BID-, and AIF-dependent killing of transformed cells. *Mol. Pharmacol.* 70, pp.589–603.
 32. BIDERE, N., LORENZO, H. K., CARMONA, S., LAFORGE, M., HARPER, F., DUMONT, C., & SENIK, A. (2003) Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, pp.31401–31411.
 33. YU, S., ANDRABI, S., WANG, H., KIM, N., POIRIER, G., DAWSON, T. & DAWSON, V. (2006) Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(48),

- pp.18314-18319.
34. LINDHOLM, D., ERIKSSON, O. & KORHONEN, L. (2004). Mitochondrial proteins in neuronal degeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 321(4), pp.753-758.
 35. YOULE, R. & KARBOWSKI, M. (2005). Mitochondrial fission in apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(8), pp.657-663.
 36. OLIVEROS, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
 37. EPPIG, J., BLAKE, J., BULT, C., KADIN, J. & RICHARDSON, J. (2014). The Mouse Genome Database (MGD): facilitating mouse as a model for human biology and disease. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), pp.D726-D736.
 38. RUZICKA et al., (2015). ZFIN, The zebrafish model organism database: Updates and new directions. *Genesis*, 53(8), pp.498-509.
 39. ATTRILL, H., FALLS, K., GOODMAN, J., MILLBURN, G., ANTONAZZO, G., REY, A. & MARYGOLD, S. (2015). FlyBase: establishing a Gene Group resource for *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), pp.D786-D792.
 40. KUMAR, P., HENIKOFF, S. & NG, P. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols*, 4(8), pp.1073-1081.
 41. ADZHUBEI, I., SCHMIDT, S., PESHKIN, L., RAMENSKY, V., GERASIMOVA, A., BORK, P., KONDRASHOV, A. & SUNYAEV, S. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, 7(4), pp.248-249.
 42. DAGDA, R.K., CHERRA III, S. J, KULICH, S.M. , TANDON, A, PARK, D., CHU, C.T. Loss of PINK1 function promotes autophagy through effects on fission in neurons. *J.Biol Chem.* 284(20):13843-55, 2009.
 43. KOBAYASHI, H., ABE, K., MATSUURA, T., IKEDA, Y., HITOMI, T., AKECHI, Y., HABU, T., LIU, W., OKUDA, H. & KOIZUMI, A. (2011). Expansion of Intronic GGCCTG Hexanucleotide Repeat in NOP56 Causes SCA36, a Type of Spinocerebellar Ataxia Accompanied by Motor Neuron Involvement. *The American Journal of Human Genetics*, 89(1), pp.121-130.
 44. YANG, Y., MUZNY, D.M., REID, J.G. et al. (2013) Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med*: 369: pp.1502-1511.
 45. REHMAN, A.U., SANTOS-CORTEZ, R.L., DRUMMOND, M.C. et al. (2015) Challenges and solutions for gene identification in the presence of familial locus heterogeneity. *Eur J Hum Genet*: 23: pp.1207-1215.

46. TELLO, C., DARLING, A., LUPO, V., PÉREZ-DUEÑAS, B., ESPINÓS, C. (2017) On the complexity of clinical and molecular bases of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Clin Genet*
47. DIDONNA, A., OPAL, P. (2016) Advances in sequencing Technologies for understanding hereditary ataxias. A review. *JAMA Neurology*; 73: 1485-90.
48. JOZA, N., SUSIN, S.A., DAUGAS, E., et al. (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*;410:549-54.

7. Anexos

7.1. Anexo I. Abstract - Pheripheral Nerve Society Annual Meeting (PNS)

THE *AIFM1* p.F210S MUTATION DOES NOT CAUSE AN APOPTOTIC FAILURE BUT AN ACTIVATION OF SENESCENT PROGRAM IN FIBROBLASTS DERIVED FROM PATIENT BIOPSIES

Sancho P^{1,2}, Sánchez-Monteagudo A^{1,2}, Collado-Padilla A^{1,2}, Marco C^{3,4}, Domínguez C⁵, Camacho A⁶, Knecht E^{2,4,7}, Espinós E^{1,2,8*}, Lupo V^{1,2,8}. ¹Unit of Genetics and Genomics of Neuromuscular and Neurodegenerative Disorders, Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia, Spain; ²INCLIVA & IIS La Fe Rare Diseases Joint Units, Valencia, Spain; ³Unit of Structural Enzymopathology, Instituto de Biomedicina de Valencia, ⁴CIBER of Rare Diseases (CIBERER), Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia, Spain; ⁵Department of Neurology, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain; ⁶Department of Neuropediatrics, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain; ⁷Unit of Intracellular Protein Degradation, Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia, Spain; ⁸Department of Genomics and Traslational Genetics, Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia, Spain.

AIFM1 encodes a mitochondria associated apoptosis inducing factor. Mutations in *AIFM1* lead to a wide spectrum of neurodegenerative disorders: Cowchock syndrome; a combined oxidative phosphorylation deficiency 6 (COXPD6) with severe encephalomyopathy; X-linked deafness with peripheral sensory neuropathy; spondyloepimetaphyseal dysplasia (SEMD) with mental retardation; and an infantile motor neuron disease. Previous studies showed severe defects in mitochondrial metabolism, related to redox function, mitochondrial fragmentation, and respiratory deficiencies. In addition, some mutations impair the protein expression of *AIFM1* and cause an increase in caspase-independent apoptosis. By targeted next-generation sequencing, we detected the *AIFM1* c.629C>T (p.Phe210Ser), in a 12 year-boy. This mutation was confirmed in his 7 year-old affected brother. Electromyography and nerve conduction velocities studies revealed an axonal polyneuropathy with exclusive involvement of motor fibers, with an early childhood-onset. Both children currently show normal cognitive and cranial nerves functions. The in silico structural modeling of human *AIFM1* showed that the mutation of a phenylalanine to serine at position 210 disrupts the hydrophobic interaction between Phe210 and Pro207, and consequently, it destabilizes an alpha-loop domain. Cartoon of protein superposition between two different human *AIFM1* structures suggest that a lack of constraints in this region could affect the

interaction between 517–533 helix and the 190–202 β -hairpin regions, a very important stage for the functional activity of the *AIFM1* protein. Patient-derived fibroblasts were used to investigate the pathological effect of the p.Phe210Ser mutation: fibroblasts from patients show a similar mRNA but different protein expression of *AIFM1* compared to healthy control fibroblasts. However, they have an aberrant morphology, from fibroblastic to polygonal shape, and they are larger than control fibroblast; mitochondria from mutant fibroblasts are markedly fragmented compared to controls; the viability of the patient's fibroblasts is lower, but it does not correlate with an increase in apoptosis. Instead, it seems to be caused by an increase in the expression of genes activating the senescent program, like P21 and P16. Our study confirms that variable effect of different mutations on the protein function may contribute to the clinical variability observed in *AIFM1* patients. Funds: ISCIII (PI12/00453); Fundació per Amor a l'Art.