

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

## ***Bases genéticas de las ataxias. Análisis de mutaciones de splicing en ATM***

**Trabajo Final de Grado**  
**Autora: Claudia Vázquez Calvo**  
Grado en Biotecnología  
Curso Académico: 2018/2019

**Tutora:** Carmen Espinós Armero, Investigadora del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF)  
**Co-Tutora:** Dolores Martínez Rubio, Investigadora del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF)  
**Tutor UPV:** Santiago Vilanova Navarro, Profesor de la Universidad Politécnica de Valencia

VALENCIA, JULIO 2019

<b>Título</b>	Bases genéticas de las ataxias. Análisis de mutaciones de <i>splicing</i> en <i>ATM</i>
<b>Autor/a</b>	Claudia Vázquez Calvo
<b>Tutora</b>	Carmen Espinós Armero
<b>Co-Tutora</b>	María Dolores Martínez Rubio
<b>Tutor UPV</b>	Santiago Vilanova Navarro
<b>Localidad y fecha</b>	Valencia, Julio de 2019

## RESUMEN

Las ataxias cerebelosas son un grupo heterogéneo de enfermedades del sistema nervioso central de carácter progresivo debidas a un proceso degenerativo que afecta a sistemas neuronales selectivos del cerebelo y sus vías. Los síntomas motores incluyen pérdida del equilibrio y de la coordinación, marcha inestable, disartria y movimientos oculares anómalos. Las ataxias hereditarias se suelen clasificar en dos grupos principales: ADCAs (*Autosomal Dominant Cerebellar Ataxias*) y ARCAs (*Autosomal Recessive Cerebellar Ataxias*), si bien también existen las formas ligadas al X. La prevalencia global de las ADCAs se estima en 1-5/100.000 y de las ARCAs en 3/100.000. Las ADCAs más frecuentes son las SCAs (*SpinoCerebellar Ataxias*) y las formas ARCA más comunes son la ataxia de Friedreich y las ataxias con mutaciones en el gen *SPG7*. Tanto para un grupo como para otro de ataxias, se conocen más de 80 genes implicados y esta cifra sigue creciendo. La disponibilidad actual de técnicas de secuenciación de última generación (NGS, *Next Generation Sequencing*) facilita indudablemente la consecución de un diagnóstico genético de una forma más rápida y eficaz.

**Bases genéticas de las ataxias.** En el marco de un proyecto de mecenazgo (<http://indacea.org/>) hemos diseñado una nueva herramienta de diagnóstico molecular para ataxias y paraparesias espásticas (SPGs). Hemos diseñado un panel con tecnología *SureSelectXT* (Agilent) para MiSeq (Illumina), que comprende 363 genes asociados con estos grupos de trastornos (panel AtxSPG-365). Así, en el marco del presente trabajo fin de grado se han investigado 19 pacientes con ataxias, cuyos datos crudos se han filtrado de acuerdo con un *pipeline* de diseño propio para la priorización de variantes de interés. Éstas han sido posteriormente analizadas mediante análisis de segregación con el propósito de lograr evidencias que afiancen o descarten que realmente son mutaciones clínicas.

**Análisis de una mutación de *splicing* en *ATM*.** En una paciente de nuestra serie clínica de ataxia, mediante el panel AtxSPG-365 se identificaron dos cambios intrónicos en el gen *ATM* (NM\_000051.3): c.2921+1G>A (rs587781558, intrón 19)/c.1899-11C>G (rs730881282, intrón 12). *ATM* está implicado en la ataxia telangiectasia (AT; MIM 208900), una enfermedad rara pediátrica. La AT cursa con herencia autosómica recesiva y clínicamente se caracteriza por ataxia cerebelar y otras manifestaciones neurológicas, telangiectasias, y afectación del sistema inmune. El cuadro clínico de la paciente era compatible con el definido para la AT y por ello, era nuestro interés indagar si realmente estas mutaciones afectaban a la proteína resultante. Para ello se han llevado estudios genéticos adicionales (análisis de segregación) e *in silico*, y analizando la expresión del ARNm de la paciente, se ha investigado si la mutación afecta al procesado correcto de la proteína.

**PALABRAS CLAVES:** Panel de genes; NGS (*Next Generation Sequencing*); Diagnóstico genético; Ataxias; Ataxia telangiectasia; gen *ATM*.

<b>Title</b>	Genetic bases of ataxias. Analysis of <i>ATM</i> splicing mutations
<b>Author</b>	Claudia Vázquez Calvo
<b>Tutor</b>	Carmen Espinós Armero
<b>Co-Tutor</b>	María Dolores Martínez Rubio
<b>Tutor UPV</b>	Santiago Vilanova Navarro
<b>Place and date</b>	Valencia, July 2019

## SUMMARY

Cerebellar ataxias are a heterogeneous group of diseases of the central nervous system of progressive character, due to a degenerative process that affects to selective neuronal systems of the brain and its pathways. Motor symptoms include loss of balance and coordination, unsteady gait, derangement, and abnormal eye movements. Hereditary ataxias are usually classified into two main groups: ADCA (*Autosomal Dominant Cerebellar Ataxias*) and ARCA (*Autosomal Recessive Cerebellar Ataxias*), although there are also X-linked forms. The overall prevalence of ADCA is considered in 1-5/100,000 and ARCAs in 3/100,000. The most frequent ADCAs are SCAs (*SpinoCerebellar Ataxias*) and the most common ARCA forms are Friedreich's ataxia and ataxias with mutations in the SPG7 gene. Both, for one group and another of ataxias, more than 80 genes are known and this number continues to grow. The current availability of *Next Generation Sequencing* (NGS) undoubtedly facilitates the achievement of a genetic diagnosis in a faster and more efficient way.

**Genetic bases of ataxias.** In the framework of a sponsorship project (<http://indacea.org/>) we have designed a new molecular diagnostic tool for ataxias and spastic paraparesis (SPGs). We designed a panel with *SureSelectXT* (Agilent) technology for MiSeq (Illumina), comprising 363 genes associated with these groups of disorders (AtxSPG-365 panel). Thus, in the framework of the present bachelor's thesis, 19 patients with ataxias have been investigated. Their results have been filtered according to a design *pipeline* of our own for the prioritization of the variants of interest. These have been analyzed by segregation analysis with the purpose of obtaining evidences that reveal or discard that these are clinical mutations.

**Analysis of an *ATM* splicing mutation.** In a patient from our clinical ataxia series, two intronic changes in the *ATM* gene (NM\_000051.3) were identified by the AtxSPG-365 panel: c.2921+1G>A (rs587781558, intron 19) / c.1899-11C> G (rs730881282, intron 12). *ATM* is involved in ataxia telangiectasia (AT, MIM 208900), a rare pediatric disease. AT has an autosomal recessive inheritance and is clinically characterized by cerebral ataxia and other neurological manifestations, telangiectasia, and involvement of the immune system. The clinical picture of the patient was compatible with that defined for the AT and therefore, our interest was to investigate if these mutations affect the resulting protein. To this end, additional genetic studies (segregation analysis) and *in silico* analysis have been carried out, and by analyzing the mRNA expression of the patient, the mutation in the correct process of the protein has been investigated.

**KEYWORDS:** Gen panel; NGS (*Next Generation Sequencing*); Genetic diagnosis; Ataxias; Ataxia-telangiectasia; *ATM* gen

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, debo agradecer a mi tutora Carmen Espinós por permitirme hacer el *Trabajo Final de Grado* en su laboratorio. Por todos sus consejos, apoyo y por hacer cada una de mis correcciones con mucha paciencia cuando no ponía los nombres de los genes o las palabras en inglés en cursiva, a pesar de repetírmelo 2000 veces.

También quiero tener unas palabras para mi segunda tutora, Lola Martínez, que ha sido la persona más paciente del mundo. Ha conseguido que una persona demasiado dramática como yo, consiga tranquilizarse en los peores momentos, aun cuando había que repetir los experimentos una y otra vez porque no salían. Gracias por hacer mi día a día en el laboratorio mucho más llevadero. Me llevo en ti una gran mentora.

Por otro lado, no me puedo olvidar de la gente del laboratorio y que han estado dispuestos a echarme una mano en cualquier momento. En primer lugar, a Vincenzo, por explicarme las cosas en el momento en que lo necesitaba, y Natalia, por siempre estar dispuesta a ayudar sin perder la sonrisa de su rostro.

A Amparo, Andrea, Ana y Virginia por enseñarme a moverme por el laboratorio sola, pero siempre dispuestas a ser mi apoyo moral, aunque salieran contaminados los controles negativos cada dos por tres o no consiguiera purificar la banda.

Y tampoco me puedo olvidar de Paula, Elo y Laura que, a pesar de no compartir tanto tiempo con ellas, siempre tenían una sonrisa para mí y ganas de ayudar, aunque fuera un momento.

Por último, acordarme en este apartado de Marina, mi compañera de bancada y de ordenador, a la que la transfección no le permitía avanzar, pero siempre me hacía los días en el laboratorio más amenos, a pesar de estar las dos hasta arriba de faena e igual de estresadas por el *TFG*. Igual que a María, que estaba en el otro grupo del laboratorio pero que era una más de las nuestras, les quiero dar las gracias a ambas por ser siempre una distracción en los días largos de trabajo. Las comidas no habrían sido las mismas sin vosotras.

Tengo que acordarme aquí de mis padres, para los que he sido una pesadilla estos meses de trabajo incansable en los que casi no podía pensar en otra cosa que no fuera mi *TFG*. Porque, a pesar de no entender del todo qué es lo que estaba haciendo, siempre tenían palabras de aliento para conseguir que no bajara los brazos, aunque me chocara una y otra vez contra las paredes. Gracias de verdad por vivir con una *zombie* todos estos meses.

También quiero dedicarles unas palabras a mis amigas. Por aguantar que les repitiera una y otra vez que no conseguía salir de mi "bucle infinito de contaminación" y que "estaba hasta las narices de escribir". Algunas de ellas también tenían su *TFG* y otras no tenían ni idea de lo que hablaba. A todas ellas, perdón por no hablar de otra cosa que del *TFG* y os prometo que, cuando acabe, solo voy a hablar de series a partir de entonces.

Para terminar, quiero agradecer a Santi Vilanova por acceder a ser mi tutor UPV y por el interés mostrado con mi trabajo.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Enfermedades neurodegenerativas.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Ataxias hereditarias .....	2
1.1.2. Paraparesia espástica hereditaria.....	3
<b>1.2. El diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. ¿Cómo averiguar que un cambio es patológico? Mutaciones en <i>ATM</i> como paradigma. ..</b>	<b>6</b>
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1. Sujetos de estudio .....</b>	<b>10</b>
3.1.1. Panel de genes <i>AtxSPG-365</i> .....	10
3.1.2. Análisis de mutaciones en <i>ATM</i> .....	12
<b>3.2. Análisis genético mediante panel de genes <i>AtxSPG-365</i>.....</b>	<b>13</b>
3.2.1. Secuenciación y análisis bioinformático .....	13
3.2.2. Análisis de la cobertura.....	13
3.2.3. Priorización de las variantes candidatas .....	13
3.2.4. Validación y estudio de segregación de los cambios .....	14
3.2.4.1. Diseño de cebadores .....	14
3.2.4.2. Condiciones de PCR y de Secuenciación Sanger.....	15
<b>3.3. Estudio de variantes en <i>ATM</i>.....</b>	<b>16</b>
3.3.1. Análisis de segregación .....	16
3.3.2. Estudio <i>in silico</i> .....	17
3.3.3. Análisis de las consecuencias de <i>ATM</i> c.2921+1G>A y c.1899-11C>G.....	17
3.3.3.1. Extracción de RNA y retrotranscripción a cDNA.....	17
3.3.3.2. Diseño de cebadores, condiciones de PCR y de secuenciación Sanger .....	18
3.3.3.3. Extracción/purificación ADN a partir de gel de agarosa.....	19
3.3.3.4. Clonación de productos de PCR con TOPO® TA Cloning® Kit y purificación del ADN.....	19
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1. Análisis mediante panel de genes <i>AtxSPG-365</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>4.2. Estudio de los cambios c.2921+1G&gt;A y c.1899-11C&gt;G del gen <i>ATM</i> .....</b>	<b>24</b>
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>30</b>
<b>5.1. Análisis mediante panel de genes <i>AtxSPG-365</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>5.2. Estudio de los cambios c.2921+1G&gt;A y c.1899-11C&gt;G del gen <i>ATM</i> .....</b>	<b>32</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>35</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>36</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Solapamiento fenotípico y genético de diferentes grupos de enfermedades neurodegenerativas. ....	1
Figura 2. Comparativa entre WES y panel de genes en la selección de cambios. Imagen modificada de Olgiati <i>et al.</i> , 2016. ....	5
Figura 3. Esquema de los pasos a seguir para establecer que una variante es patológica. ....	7
Figura 4. Clasificación clínica de los 19 pacientes estudiados, donde n es igual al número de casos correspondiente a cada fenotipo clínico. ....	10
Figura 5. Árbol genealógico de la familia fATX-168. ....	11
Figura 6. Árbol genealógico de la familia fATX-169. ....	11
Figura 7. Árbol genealógico de la familia fATX-173. ....	12
Figura 8. Árbol genealógico de la familia fATX-174. ....	12
Figura 9. Árbol genealógico de la familia fATX-165. ....	12
Figura 10. Filtros aplicados hasta la selección final de variantes. MAF: Frecuencia del alelo menos común ( <i>minor allele frequency</i> ). ....	20
Figura 11. Electroforesis de los productos de PCR, testados en agarosa al 2% y peso molecular <i>1 Kb Plus DNA Ladder</i> ; para (a), (b) y (c) amplicón 1 con cDNA del paciente (SGT-1451) y de un control sano, y sin cDNA (CN), respectivamente. (d), (e) y (f) Repetición de las carreras anteriores utilizando el primer reverso ATM_cDNA_Exón20_21_r. (g), (h) y (i) amplicón 3 con cDNA del paciente y de un control, y sin CDNA, respectivamente. (j), (k) y (l) GAPDH con cDNA del paciente y de un control, y sin cDNA, respectivamente. ....	25
Figura 12. Secuenciación de las bandas purificadas para el amplicón 1. (A) Muestra control (banda de 512 pb). (B) Banda de 512 que corresponde a la secuencia consenso. (C) Banda de 429 pb, que coincide con una deleción del exón 19. (D) Banda de 229 pb que corresponde con una deleción de los exones 18 y 19. (E) Heterodúplex entre las bandas (B) y (C). ....	26
Figura 13. Secuenciación de las bandas purificadas para el amplicón 2. (A) Muestra control (banda de 470 pb). (B) Banda de 470 que corresponde a la secuencia consenso. (C) Banda de 387 pb, que coincide con una deleción del exón 19. (D) Banda de 187 pb que corresponde con una deleción de los exones 18 y 19. (E) Heterodúplex entre las bandas (B) y (C). ....	27
Figura 14. Secuenciación de las bandas purificadas para el amplicón 3. (A) Banda de 578 pb que es del tamaño esperado del amplicón secuenciada en el control y corresponde a la secuencia consenso. (B) Secuenciación del paciente en la que se aprecia que hay un cambio en la pauta de lectura, teniendo una secuencia del exón 12 limpia. ....	28

Figura 15. Testado en agarosa al 1% de los productos de PCR de 18 colonias y el control negativo tras la clonación por TOPO® TA Cloning®. Peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder*... 28

Figura 16. Secuenciación de las clonaciones. (A) Control sano (banda de 578 pb). (B) Colonia 6, que corresponde al fragmento wild type. (C) Colonia 7, que corresponde al fragmento con la delección. La línea negra marca el final del exón 12 y el principio del exón 13, que en el caso de (C) es distinto debido a la delección. .... 29

Figura 17. Secuencia consenso de los exones 12 (en negro) y 13 (en rojo y azul) del gen *ATM* (NCBI). La secuencia en rojo de 41 bases es la delecionada..... 29



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de cebadores empleados para la amplificación de cada región de interés para la validación de las variantes candidatas. ....	15
Tabla 2. Programa general para realizar una PCR. ....	15
Tabla 3. Componentes de la mezcla de reacción para PCR por muestra. ....	16
Tabla 4. Secuencias de cebadores empleados para la amplificación de cada región de interés en el estudio de segregación de la familia fATX-165. ....	17
Tabla 5. Reactivos empleados en la reacción de retrotranscripción de ARN a cDNA. ....	17
Tabla 6. Secuencias de cebadores empleados para la amplificación de cada región de interés. ....	18
Tabla 7. Componentes de la mezcla de reacción para PCR por muestra. ....	18
Tabla 8. Cambios de interés detectados con el panel AtxSPG-365 en doce casos. ....	22
Tabla 9. Análisis de segregación de KCND3 c.1117A>G en la familia fATX-168. ....	23
Tabla 10. Análisis de segregación de SPAST c.1235C>T en la familia fATX-169. ....	23
Tabla 11. Análisis de segregación de FAT2 c.11906-5C>T en la familia fATX-173. ....	24
Tabla 12. Análisis de segregación de SPTBN2 c.4166C>T en la familia fATX-174. ....	24
Tabla 13. Análisis de segregación de ATM c.2921+1G>A/c.1899-11C>G en la familia fATX-165. ....	24

## LISTA DE ABREVIATURAS

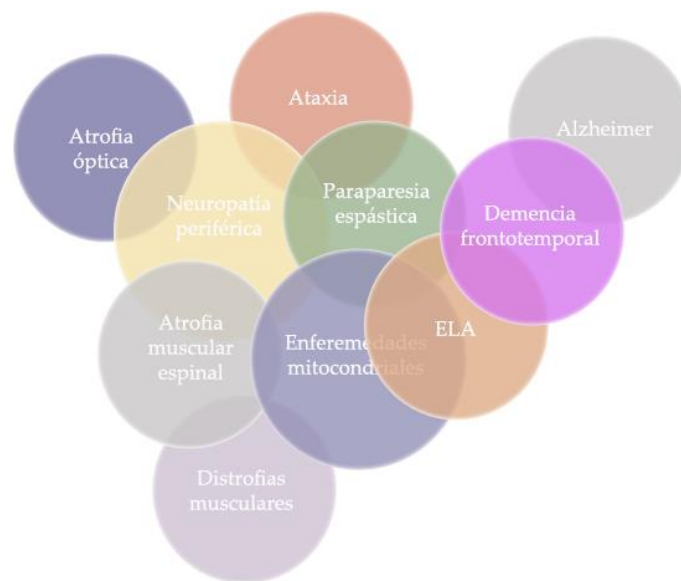
<b>aas</b>	Aminoácidos
<b>ADCA</b>	Ataxia cerebelosa autosómica dominante (acrónimo en inglés: <i>autosomal dominant cerebellar ataxia</i> )
<b>ADHSP</b>	Paraparesia espástica hereditaria autosómica dominante (acrónimo en inglés: <i>autosomal dominant hereditary spastic paraparesis</i> )
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>cDNA</b>	ADN complementario
<b>AOA</b>	Ataxia con apraxia oculomotora (acrónimo en inglés: <i>ataxia with oculomotor apraxia</i> )
<b>ARCA</b>	Ataxia cerebelosa autosómica recesiva (acrónimo en inglés: <i>autosomal recessive cerebellar ataxia</i> )
<b>ARHSP</b>	Paraparesia espástica hereditaria autosómica recesiva (acrónimo en inglés: <i>autosomal recessive hereditary spastic paraparesis</i> )
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>AT</b>	Ataxia-telangiectasia
<b>AVED</b>	Ataxia con deficiencia de vitamina E (acrónimo en inglés: <i>ataxia with vitamin E deficiency</i> )
<b>ARSACS</b>	Ataxia espástica autosómica recesiva de Charlevoix-Saguenay (acrónimo en inglés: <i>autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay</i> )
<b>CNV</b>	Variación en el número de copias (acrónimo en inglés: <i>Copy Number Variation</i> )
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos
<b>DMB</b>	Distrofia muscular de Becker
<b>DMD</b>	Distrofia muscular de Duchenne
<b>DRPLA</b>	Atrofia dentatorubro-pálid-luisiana (acrónimo en inglés: <i>dentatorubral-pallidoluisian atroph</i> )
<b>ENACH</b>	Neurodegeneración con Acumulación Cerebral de Hierro
<b>GERP</b>	<i>Genomic Evolutionary Rate Profiling</i>
<b>HGMD</b>	Base de datos de mutaciones en genes humanos (acrónimo en inglés: <i>Human Gene Mutation Database</i> )
<b>HSF</b>	Human Splicing Finder
<b>HSP</b>	Paraparesia espástica hereditaria (acrónimo en inglés: <i>hereditary spastic paraparesis</i> )
<b>indel</b>	Pequeña inserción y/o delección
<b>kb</b>	Polimorfismo de un único nucleótido (acrónimo en inglés: <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )
<b>LB</b>	Medio Luria-Bertani
<b>MAF</b>	Frecuencia del alelo menor (acrónimo en inglés: <i>Minor allele frequency</i> )
<b>MAVE</b>	Ensayos multiplexados de efectos variantes (acrónimo en inglés: <i>multiplexed assays of variant effects</i> )
<b>MRI</b>	Imagen por resonancia magnética (acrónimo en inglés: <i>magnetic resonance imaging</i> )
<b>NBIA</b>	Neurodegeneración con Acumulación Cerebral de Hierro (acrónimo en inglés: <i>Neurodegeneration with brain iron accumulation</i> )
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NGS</b>	Secuenciación de nueva generación (acrónimo en inglés: <i>next generation sequencing</i> )
<b>NMD</b>	Degradación mediada por sin sentido (acrónimo en inglés: <i>Non-sense Mediated</i>

	<i>Decay</i> )
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa (acrónimo en inglés: <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PDB</b>	Base de Datos de Proteínas (acrónimo en inglés: <i>Protein Data Base</i> )
<b>RT</b>	Transcripción reversa (acrónimo en inglés: <i>reverse transcription</i> )
<b>SCA</b>	Ataxias espinocerebelosas (acrónimo en inglés: <i>Spinocerebellar Ataxia</i> )
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un único nucleótido (acrónimo en inglés: <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )
<b>SNV</b>	Variación en un único nucleótido (acrónimo en inglés: <i>Single Nucleotide Variant</i> )
<b>VUS</b>	Variante nucleotídica de significado incierto (acrónimo en inglés: <i>variant of unknown significance</i> )
<b>WES</b>	Secuenciación de exoma (acrónimo en inglés: <i>whole exome sequencing</i> )
<b>WGS</b>	Secuenciación del genoma (acrónimo en inglés: <i>whole genome sequencing</i> )
<b>WT</b>	Tipo silvestre (acrónimo en inglés: <i>wild type</i> )
<b>XLHSP</b>	Paraparesia espástica hereditaria ligada a X (acrónimo en inglés: <i>X-linked hereditary spastic paraparesis</i> )

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por disfunción progresiva y pérdida de neuronas (Kovacs, 2017). Este grupo de enfermedades agrupa patologías muy diversas tales como ataxias, neurodegeneración con acumulación de hierro en cerebro (ENACH/NBIA acrónimo en inglés), distonías, enfermedades mitocondriales, atrofas musculares, paraparesias espásticas otras (**Fig. 1**). Las bases moleculares de estas enfermedades son complejas debido a la gran heterogeneidad genética existente y el espectro tan amplio de síntomas. Además, existe solapamiento genético entre ellas: por ejemplo, distonías y ataxias al menos comparten 99 genes (Nibbelinga *et al.*, 2016). Y también, algunos de estos síntomas se aprecian en otras enfermedades: hay pacientes NBIA que cursan con ataxia y otros con paraparesia espástica (Kurian *et al.*, 2008; Ozes *et al.*, 2018), entre otros signos adicionales más típicos de otras enfermedades neurodegenerativas, lo cual conlleva un gran reto, dada la dificultad de realizar un diagnóstico diferencial adecuado. Es por eso que ambas enfermedades se suelen estudiar conjuntamente.



**Figura 1.** Solapamiento fenotípico y genético de diferentes grupos de enfermedades neurodegenerativas.

### 1.1.1. Ataxias hereditarias

Las ataxias son un grupo heterogéneo, tanto clínica como genéticamente, de trastornos del movimiento que afectan a individuos de todas las edades y que tienen el síndrome cerebelar como nexo común (Németh *et al.*, 2013). La ataxia a menudo ocurre cuando se dañan partes del sistema nervioso que controlan el movimiento, sufriendo fallos en el control muscular de los brazos y de las piernas, lo cual ocasiona pérdida de equilibrio o coordinación o alteración en el modo de caminar.

La ataxia puede afectar a los dedos, manos, extremidades superiores e inferiores, al habla o a los movimientos oculares, y puede ser la manifestación principal de una condición clínica y tratarse de una enfermedad genética, o bien, un signo clínico que acompaña a un proceso degenerativo. En la evolución de la neurodegeneración, el órgano más afectado es el cerebelo, en el que sus células se degeneran o atrofian y, en ocasiones, también existe afectación de la médula espinal. Las expresiones degeneración cerebelosa y espinocerebelosa se usan para describir cambios que se han producido en el sistema nervioso de una persona, pero ninguno de ellos constituye un diagnóstico específico. La degeneración cerebelosa y espinocerebelosa tiene muchas causas diferentes. La edad de presentación de la ataxia resultante varía dependiendo de la causa subyacente de la degeneración (Nibbelinga *et al.*, 2016).

Las ataxias hereditarias más comunes son las causadas por la repetición de trinucleótidos, entre las que se encuentran algunas ataxias espinocerebelosas (SCA, *spinocerebellar ataxia*), tales como los tipos 1, 2, 3, 6, 7 y 17, y la DRPLA (*dentatorubral-pallidoluysian atrophy*) o la ataxia de Friedreich, pero mutaciones puntuales se han descrito en muchos otros genes que igualmente causan ataxia, tales como la AOA (*ataxia with oculomotor apraxia*) o ARSACS (*autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay*) (Kovacs, 2017).

Las ataxias hereditarias se suelen subdividir por el modo de herencia y habitualmente se consideran dos grandes grupos (Bird, 1998). Las ataxias cerebelosas autosómicas dominantes (ADCA, *autosomal dominant cerebellar ataxia*) o SCAs, que tienen una prevalencia del 2,7/100.000 habitantes (Németh *et al.*, 2013). Se han descrito 47 subtipos distintos de SCAs, de entre éstas, la SCA3 es la más común, seguida de SCA2 y SCA6 (Németh *et al.*, 2013; Parodi *et al.*, 2018). A menudo, una ADCA no se puede diferenciar de otra porque: las manifestaciones más frecuentes de todas las ADCAs son la ataxia progresiva de la marcha de adulto (a menudo con disimetría en la mano) y la disartria asociada con atrofia cerebelar en las imágenes del cerebro, además de las edades de inicio que a menudo se superponen (Kurian *et al.*, 2008).

Las ataxias cerebelosas autosómicas recesivas (ARCA, *autosomal recessive cerebellar ataxia*) se caracterizan por una clínica más grave que las ADCAs y un debut antes de la segunda década de vida, como suele ocurrir en las enfermedades con herencia recesiva. Este grupo igualmente, comprende un número relevante de ataxias raras con una prevalencia media estimada de 3,3/100.000, siendo la más frecuente la ataxia de Friedreich, seguida de la AOA y de la ataxia telangiectasia (Németh *et al.*, 2013). Entre las ARCA las manifestaciones clínicas sí que pueden ser específicas para cada condición si bien todas cursan con atrofia cerebelosa. Así por ejemplo, la AVED (*ataxia with vitamin E deficiency*) causada por mutaciones en el gen *TTPA* que conducen a una mala absorción de vitamina E (Ouahchi *et al.*, 1995), o la anemia sideroblástica con ataxia debida a mutaciones en el gen *ABC7* que se caracteriza por una anemia leve con presencia de sideroblastos en anillo en médula ósea (Pagon *et al.*, 2008).

### 1.1.2. Paraparesia espástica hereditaria

La paraparesia espástica hereditaria (HSP, *hereditary spastic paraparesis*) comprende un grupo de trastornos neurodegenerativos raros genéticamente heterogéneos caracterizados por debilidad progresiva y espasticidad de las extremidades inferiores. Estos síntomas se deben a la degeneración progresiva o a la axonopatía distal del tracto corticoespinal, que conduce la información nerviosa desde la corteza cerebral a la médula espinal y permite el control de las funciones motoras (Elert-Dobkowska *et al.*, 2019). La HSP se clasifica como una forma pura cuando los síntomas se limitan a: espasticidad progresiva y debilidad de las extremidades inferiores, disfunción de la vejiga y déficit somatosensoriales leves. En caso de cualquier síntoma neurológico adicional, se reconoce una forma de HSP compleja (Elert-Dobkowska *et al.*, 2019). Estos signos pueden ser neurológicos o no neurológicos, incluida la disfunción cerebelosa (ataxia, nistagmo, temblor); neuropatía periférica axonal o desmielinizante (incluyendo disautonomía y alteraciones sensoriales marcadas); deterioro cognitivo (incluyendo demencia y retraso mental o discapacidad intelectual); epilepsia; características miopáticas (que incluyen ptosis y oftalmoparesia, un fenotipo similar a la oftalmoplejía externa crónica progresiva); rasgos extrapiramidales (parkinsonismo, corea, distonía); trastornos psiquiátricos; y anomalías en la MRI (*magnetic resonance imaging*) del cerebro y la columna vertebral altamente sugestivas de un subtipo genético específico (cambios leves de la sustancia blanca, leucodistrofia, hipomielinización, cuerpo calloso delgado, atrofia de la médula espinal, acumulación de hierro en el cerebro, hidrocefalia y atrofia del cerebelo) (Bis-Brewer & Züchner, 2018).

La aparición de HSP varía desde la primera infancia hasta más de 70 años. La edad de inicio depende del defecto genético subyacente, pero también es muy variable entre los miembros de una misma familia (variabilidad intrafamiliar) para casi todos los tipos de HSP. Además, el inicio de los primeros síntomas a veces es difícil de determinar con precisión y probablemente se subestima, ya que la mayoría de las formas de HSP son de lenta progresión y los pacientes se quejan de su discapacidad mucho tiempo después del inicio. En general, la mayoría de los pacientes con HSP muestran una progresión lenta de sus síntomas motores. Sin embargo, el avance de la discapacidad funcional también es muy variable, desde casos bastante estáticos, sin empeoramiento, hasta un deterioro inexorable y rápido. En muchos pacientes, una meseta funcional se alcanza después de una agravación continua (Bis-Brewer & Züchner, 2018).

El diagnóstico de HSP se basa en la presencia de los siguientes hallazgos: (a) síntomas clínicos característicos de espasticidad y debilidad de extremidades inferiores bilaterales que pueden ser no progresivas o lentamente progresivas; (b) examen neurológico que muestra afectación del tracto corticoespinal, como espasticidad, hiperreflexia y respuestas plantaresensoriales; (c) historia familiar de enfermedad genética, aunque también pueden ocurrir casos esporádicos y (d) pruebas genéticas moleculares, guiadas de acuerdo con la sospecha clínica principal o mediante enfoques NGS (*next generation sequencing*) (Bis-Brewer & Züchner, 2018).

Las HSPs se clasifican según el tipo de herencia: autosómica dominante (ADHSP, *autosomal dominant hereditary spastic paraparesis*), autosómica recesiva (ARHSP, *autosomal recessive hereditary spastic paraparesis*), ligado al X (XLHSP, *X-linked hereditary spastic paraparesis*) y, con menor frecuencia, mitocondrial, que es un fenotipo HSP extremadamente raro complicado con múltiples signos y síntomas que sugieren un trastorno del espectro mitocondrial subyacente (Bis-Brewer & Züchner,

2018). Los dos primeros tipos, los más mayoritarios, tienen una prevalencia media estimada en la población de 1,8/100.000 (Ruano *et al.*, 2014).

Entre los 20 tipos diferentes de ADHSP, SPG4 (Enfermedad de Strümpell-Lorrain o ADHSP tipo 2) es la más común y representa aproximadamente el 40% de los casos. Es una HSP pura y resultante de mutaciones en el gen *SPAST*. La frecuencia de otros tipos ADHSP varía de 1% a 10%.

Los principales ARHSP son SPG5, que es resultado de mutaciones en el gen *CYP7B1*; seguida de SPG7, SPG11 y SPG15, que son debidas a mutaciones en los genes *SPG7*, *spatacsin* y *ZFYVE26*, respectivamente (Klebe *et al.*, 2015).

## 1.2. El diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas

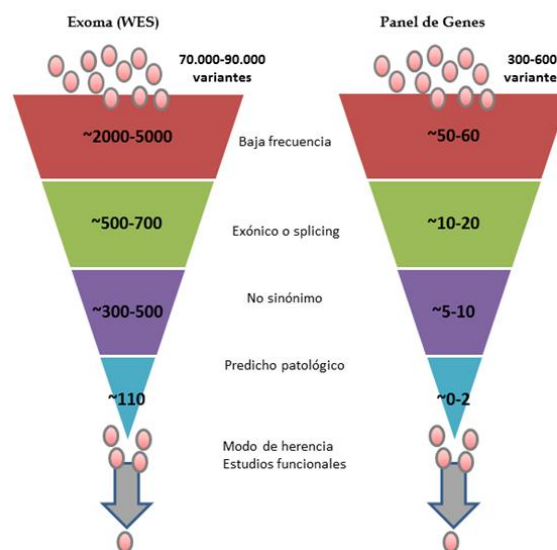
La secuenciación masiva o NGS ha supuesto una revolución en el diagnóstico genético, ya que permite la secuenciación de cientos/miles de genes de forma eficaz y rápida a un coste razonable. Esta característica es especialmente interesante cuando se trata de grupos de enfermedades con heterogeneidad genética en las que la clínica es compleja y solapante (Bis-Brewer & Züchner, 2018; Parodi *et al.*, 2018). La tecnología NGS permite realizar pruebas genéticas utilizando tres enfoques: paneles de genes, que consiste en la secuenciación de una selección de cientos de genes; secuenciación de exoma o WES (*whole exome sequencing*), es decir, la secuenciación del 1% (Newman & Black, 2014) de todo el genoma humano que contiene el ADN que codifica las proteínas, donde reside hasta el 85% de todas las mutaciones patológicas (Cooper *et al.*, 2010); y secuenciación del genoma o WGS (*whole genome sequencing*), la técnica más costosa e integral, capaz de detectar mutaciones en las regiones codificantes y no codificante (Xue *et al.*, 2015).

A pesar de las ventajas obvias de la tecnología NGS, ésta tiene limitaciones técnicas relacionadas con los procedimientos de amplificación por PCR, así como la captura selectiva de regiones diana, los fallos en la cobertura y la posibilidad de no encontrar cambios debido a que se encuentren fuera de las dianas seleccionadas en el estudio (Meienberg *et al.*, 2016). Con los continuos avances tecnológicos, las máquinas y los sistemas de captura se mejoran, de forma que cada vez se secuencia más y mejor a un coste menor. El desafío actualmente radica en la interpretación de los resultados obtenidos, ya que se obtiene gran cantidad de datos en su mayoría incidentales. Establecer qué variantes tienen algún efecto en el fenotipo clínico y cuáles no, no es tarea fácil (Newman & Black, 2014).

La tasa de éxito de diagnóstico genético empleando herramientas NGS es muy variable según la serie estudiada y las enfermedades investigadas. Los porcentajes de éxito con paneles de genes son muy dispares, ya que además cada panel tiene un diseño propio y evidentemente, este aspecto también influye en el número de casos finalmente diagnosticados (Coutelier *et al.*, 2017; D'Amore *et al.*, 2018). Estrategias tales como captura dirigida de una WES han logrado el diagnóstico en un 22,6% en cohortes de pacientes con ataxia cerebelosa (Coutelier *et al.*, 2018), mientras que en otra serie el éxito ha sido de un 17% utilizando panel de genes y de un 36% con WES (Galatolo *et al.*, 2018). En enfermedades raras pediátricas se logra diagnosticar el 28% de los pacientes mediante WES del probando; esta tasa se ve incrementada a 40% cuando la WES incluye a los progenitores, si bien sólo llega a 42% si se lleva a cabo WGS del trío (probando más padres) (Wright *et al.*, 2018).

Los paneles de genes tienen muchas ventajas sobre WES: secuencian menos dianas que con WES y siguen siendo más baratos en términos de coste absoluto, aunque no cuando se considera coste por base. De hecho el número de variantes que se obtienen en un WES está alrededor de 70.000-90.000, mientras que en un panel se obtiene una media de 300-600 cambios (**Fig. 2**) (Wright *et al.*, 2018). Por ello, las exigencias informáticas para su análisis son mayores en una WES, si bien en esencia, los pasos esenciales a seguir para el filtrado de datos son los mismos independientemente de la herramienta aplicada (**Fig. 2**). Es importante destacar que muchas de las metodologías para la secuenciación de exoma basadas en captura, en particular a niveles más bajos de cobertura general, han dado como resultado una cobertura irregular con una pérdida o no secuenciación de muchos exones. Desde un punto de vista diagnóstico, esta pérdida ha sido considerada como un desafío, ya que dificulta la capacidad del clínico para entregar un informe que proporciona una información segura de que se ha realizado un examen exhaustivo de los genes seleccionados (Bis-Brewer & Züchner, 2018).

A pesar de los pros, el panel de genes tiene algunas desventajas en el diagnóstico. El tener que determinar los genes que se examinan reduce la probabilidad de encontrar hallazgos inesperados y potencialmente útiles. No obstante, es más fácil encontrar una variante de interés porque los genes incluidos en el panel necesariamente están asociados a la enfermedad que sufre el paciente que se investiga.



**Figura 2.** Comparativa entre WES y panel de genes en la selección de cambios. Imagen modificada de Olgiati *et al.*, 2016.

En la Unidad de Genética y Genómica de Enfermedades Neuromusculares y Neurodegenerativas se dispone de un panel de diseño propio AtxSPG-365, basado en tecnología SureSelectXT Custom (Agilent Technologies In., Santa Clara, CA, EEUU) para HiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, EEUU) y financiado mediante mecenazgo (Plataforma Indacea; <https://indacea.org/project/investigacion-en-ataxia-y-paraparesia-buscando-un-kit-diagnostico/>), que contiene 365 genes implicados en ataxias hereditarias y paraparesias espásticas familiares. Se trata de un panel donde se agrupan todos los genes asociados a mecanismos fisiopatológicos similares o comunes, y consecuentemente a fenotipos solapantes, el cual proporciona un diagnóstico más resolutivo, y asimismo ayuda a entender mejor la correlación genotipo-fenotipo para estas enfermedades. Sin embargo, esta



tecnología tiene una serie de limitaciones, como la detección de un número considerable de variantes nucleotídicas de significado incierto (VUS, *variant of unknown significance*), lo cual podría dificultar el resultado del informe genético definitivo, o la dificultad de detectar CNVs (*Copy Number Variation*), grandes deleciones y/o duplicaciones, y/o también de expansiones de nucleótidos repetidos en tándem, dado que la herramienta está pensada para la identificación de mutaciones puntuales y pequeñas inserciones y deleciones (indels).

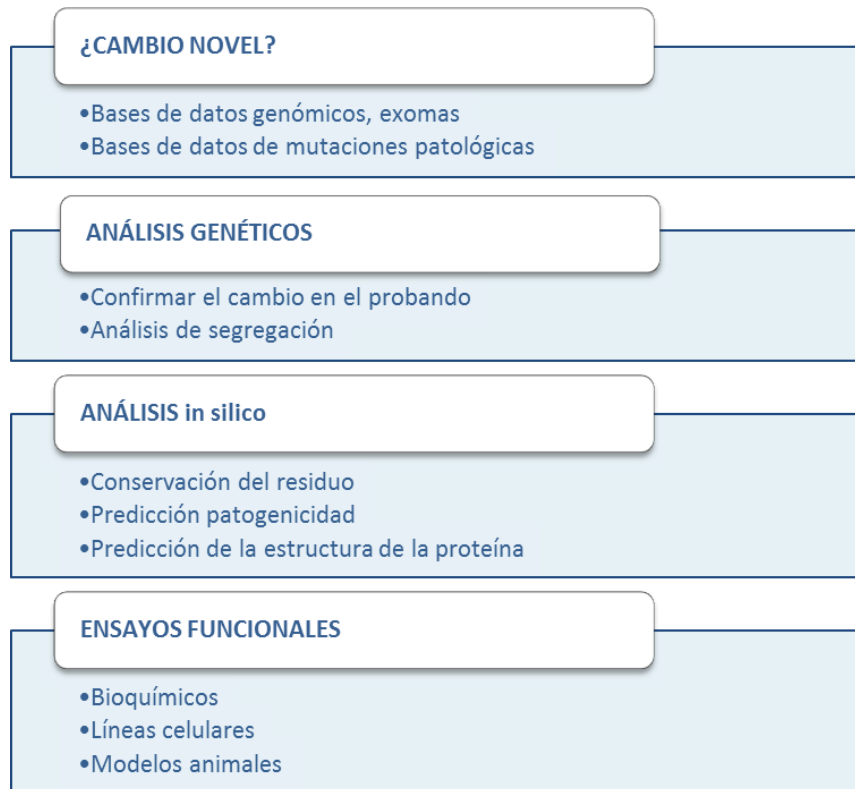
### 1.3. ¿Cómo averiguar que un cambio es patológico? Mutaciones en *ATM* como paradigma.

Cuando estudiamos la secuenciación de un paciente, sea su panel de genes (como en el caso de este TFG) o un exoma, se pueden identificar cambios en éste con respecto al genoma de referencia. Lo primero que se debe hacer es determinar si se trata de un cambio novel (**Fig. 3**). Para ello, se hace una búsqueda por las bases de datos genómicos y de mutaciones patológicas, como pueden ser ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>), HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), o gnomAD (<http://www.gnomad.broadinstitute.org/>), entre otras. Necesariamente si un cambio tiene una frecuencia alta en población control, difícilmente va a ser una mutación patológica. Éstas habitualmente son novedades o tienen frecuencias muy bajas. La definición de polimorfismo, de hecho, se basa en la presencia de un cambio en población sana con una frecuencia superior al 1%. Adicionalmente, estas bases de datos nos darán información previa o bibliografía a consultar, útil para proseguir con el estudio del cambio.

Es importante también la realización de estudios genéticos (**Fig. 3**). Por un lado, se debe corroborar que el cambio candidato a ser mutación clínica lo tiene el individuo objeto de estudio, ya que podría tratarse de un falso positivo. Esto se realizaría amplificando la región de interés con una PCR y posterior secuenciación por Sanger. Para saber si este cambio cosegrega con la enfermedad, se debe comprobar si familiares del probando tienen el cambio si están enfermos, o no lo tienen estando sanos. Esto es lo que se conoce como análisis de segregación y es la forma más sencilla para descartar cambios candidatos, siempre y cuando los individuos estudiados hayan sido evaluados clínicamente por el facultativo clínico.

Un tercer paso a realizar comprende los estudios *in silico* (**Fig. 3**). En la web existen múltiples softwares que predicen si un cambio de aminoácido es patológico como SIFT (<https://www.sift.bii.a-star.edu.sg/>) o PolyPhen-2 (<http://www.genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), o si un cambio puede conducir a un *splicing* anómalo como NNSPLICE versión 0.9 ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)) o NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>). También el estudio de la conservación del residuo es útil, ya que un aminoácido no conservado es probablemente poco relevante. Para ello se han diseñado herramientas tales como PhyloP (<https://www.ccg.epfl.ch/mga/hg19/phylop/phylop.html>) o GERP (*Genomic Evolutionary Rate Profiling*; <http://www.mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/gerp/>). Entre las aproximaciones computacionales disponibles está el análisis de las consecuencias en la estructura de la proteína, empleando programas tales como Coot (<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/Personal/pemsley/coot/>), si bien para este tipo de estudios es imprescindible contar con el cristal de la proteína en la PDB (Protein Data Bank; <http://www.rcsb.org/>). En su conjunto, todas estas aproximaciones son muy

económicas y sencillas de aplicar, aunque no dejan de ser predicciones o estimaciones de lo que pudiera estar ocurriendo.



**Figura 3.** Esquema de los pasos a seguir para establecer que una variante es patológica.

Por último, también se pueden realizar ensayos funcionales para ganar evidencias experimentales de la patogenicidad del cambio. Éstos son especialmente relevantes cuando se trata de cambios noveles, máxime si el gen nunca ha sido previamente asociado a enfermedad humana. Analizando 84 variantes, descritas como responsables de fibrosis quística, con análisis de expresión se demostró que 6 de ellas (13%) realmente no afectaban a la actividad de la proteína mutada, habiendo sido predichas como deletéreas o probablemente deletéreas (Raraigh *et al.*, 2018). Este hallazgo subraya la necesidad de ser cautos con las herramientas *in silico* empleadas habitualmente en el análisis de las consecuencias de las mutaciones. Evidentemente, los estudios a realizar dependerán de la función del gen. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo estudios de localización subcelular para ver si la variante hace que la proteína no alcance la localización correcta para ejercer su actividad, como sucede con algunas mutaciones con MPZ que es una proteína de membrana (Sevilla *et al.*, 2011). O bien, ensayos de actividad de expresión para establecer si la mutación altera ésta cuando se trata de un factor de transcripción como EGR2 (Sevilla *et al.*, 2015). El problema esencial es que estos experimentos son *ad hoc* para cada variante y por tanto, costosos en tiempo y dinero, por lo que resulta imposible su realización para todas las variantes noveles que se detecten. Con el propósito de facilitar esta tarea se ha generado la plataforma MAVE (*multiplexed assays of variant effects*; <https://www.mavedb.org/>) que une mutaciones con ensayos funcionales y por tanto, afianza la causalidad de la variante, con el objetivo de construir un atlas genotipo-fenotipo (Starita *et al.*, 2017; Weile & Roth, 2018).

Entre las mutaciones que suelen requerir de ensayos adicionales que proporcionen evidencias que muestren que éstas realmente alteran la función de la proteína resultante, son los cambios de *splicing*, *ATM* c.2921+1G>A/c.1899-11C>G, detectado en la paciente SGT-1191, perteneciente a la serie clínica investigada en la Unidad de Genética y Genómica de Enfermedades Neuromusculares y Neurodegenerativas del CIPF.

Las mutaciones en *ATM* se asocian con ataxia-telangiectasia (AT). Se trata de un trastorno autosómico recesivo que se caracteriza principalmente por degeneración cerebelosa, telangiectasia, inmunodeficiencia, susceptibilidad al cáncer y sensibilidad a la radiación (Rothblum-Oviatt *et al.*, 2016). La incidencia de AT se ha estimado en 1 de cada 40.000–100.000 niños nacidos vivos y se estima que la frecuencia de portadores sanos está entre 1–3% (Easton, 1994). Existen hasta 165 variantes de *splicing* en el gen *ATM* descritas en HGMD (consultado 25/03/2019), la mayoría de las cuales están relacionadas con AT, aunque también hay algunas relacionadas con el cáncer de mama (Prodosmo *et al.*, 2016).

En este TFG, se estudian dos mutaciones en el gen *ATM*, c.2921+1G>A y c.1899-11C>G, identificadas en la paciente SGT-1191 mediante el panel de diseño propio, AtxSPG-365, descrito en el apartado anterior. La probando SGT-1191 tiene un hermano que también padece la enfermedad, SGT-1451, lo que sugeriría una probable herencia autosómica recesiva. Los signos clínicos principales en la paciente, además de ataxia, son telangiectasias oculares y disartria. De acuerdo con la clínica, *ATM* era desde el primer momento el gen candidato a contener las mutaciones causales responsables de la enfermedad en estos pacientes.

El cambio c.2921+1G>A ya había sido publicado con anterioridad (Gilad *et al.*, 1996; Xiong *et al.*, 2015). En un primer artículo, se describe que este cambio causa la pérdida completa del exón 21. Como consecuencia de la eliminación de 83 pb, el marco de lectura normal cambia después de la metionina 946, lo que produce un codón de parada prematuro en el residuo 955 (Gilad *et al.*, 1996). Otros autores, en un estudio computacional que puntúa la capacidad con la que ciertas mutaciones alteran el *splicing* del ARN, para c.2921+1G>A, determinaron que alteraba notablemente el *splicing*, con un ratio de  $\Delta\Psi = -0,123051$  (Xiong *et al.*, 2015), siendo  $\Psi$  el porcentaje de transcritos donde el exón central sufre *splicing* según las características del ADN y el tipo celular de estudio y  $\Delta\Psi$  la diferencia de capacidad de producir cambio en el *splicing* entre la secuencia consenso y la secuencia con el SNP o variante de estudio.

La mutación c.1899-11C>G es novel. No está anotada en la base de datos HGMD (consultada a 25/03/2019). Para dicha posición en el ADN, no se conocen mutaciones de ningún tipo. Se trata de una variante intrónica fuera de la secuencia consenso de *splicing*. Mutaciones de este tipo han sido previamente publicadas en *ATM*, tales como c.2251-10T>G (Telatar *et al.*, 1998) o c.3403-12T>A (Stankovic *et al.*, 1998). La primera produce una inserción de 9 nucleótidos (Telatar *et al.*, 1998) y la segunda una delección de 174 nucleótidos (Stankovic *et al.*, 1998).

En el presente TFG, proponemos un estudio de los cambios c.2921+1G>A y c.1899-11C>G localizados en *ATM*, para investigar su implicación en el *splicing* y con ello, su posible patogenicidad.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La clínica y la genética de ataxias y paraparesias espásticas son complejas. La variabilidad clínica, la gran heterogeneidad genética, y la baja casuística hacen difícil establecer la causa genética en muchos casos. Los paneles posibilitan el estudio de cientos de genes simultáneamente, por lo que postulamos que el empleo de esta herramienta diagnóstica debe permitir diagnosticar a pacientes con mutaciones clínicas en genes infrecuentes y con ello, conducir a una expansión del espectro clínico-genético asociado con éstas.

Adicionalmente, la interpretación de las variantes identificadas puede resultar muy difícil. Un panel de genes puede resultar en cientos de cambios y sólo uno o unos pocos realmente son patológicos. Pese al desarrollo de los algoritmos *in silico* para el análisis de la patogenicidad de mutaciones, la realidad es que son meramente softwares predictivos. Por ello, proponemos que la realización de estudios adicionales es esencial para ganar evidencias que ayuden a determinar que el cambio detectado contribuye al fenotipo clínico.

Los objetivos del presente Trabajo Final de Grado son los siguientes:

**Objetivo 1.** Identificar la causa genética en 19 pacientes mediante el empleo de un panel de genes de diseño propio, dirigido al diagnóstico de ataxias y paraparesias espásticas.

**Objetivo 2.** Investigar la patogenicidad de las variantes *ATM* c.2921+1G>A/c.1899-11C>G identificadas en una paciente con ataxia telangiectasia mediante el análisis de *splicing*.

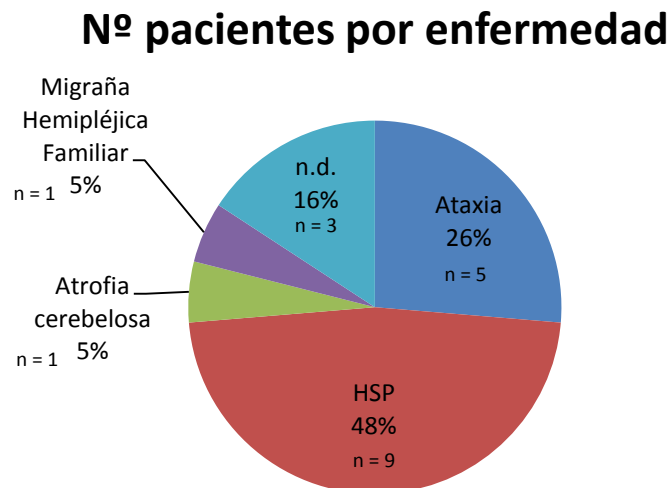
### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Sujetos de estudio

##### 3.1.1. Panel de genes AtxSPG-365

Se incluyen en este estudio 19 muestras procedentes de una serie clínica de pacientes con ataxia y paraparesia espástica familiar (HSP) investigada en la Unidad de Genética y Genómica de Enfermedades Neuromusculares y Neurodegenerativas del CIPF. Estos pacientes fueron reclutados y evaluados clínicamente por neurólogos de seis hospitales españoles: H. U. i P. La Fe de Valencia, Complejo Hospitalario de Navarra, H. U. de Bellvitge, H. Francesc de Borja de Gandía, H. Son Espases de Mallorca y H. Santa Creu i Sant Pau de Barcelona. Los participantes fueron informados de las características del proyecto y firmaron el consentimiento informado, aprobado por los respectivos comités éticos de investigación de cada hospital.

En la **figura 4**, se muestra el porcentaje y el número (n) de casos correspondiente a cada fenotipo clínico.

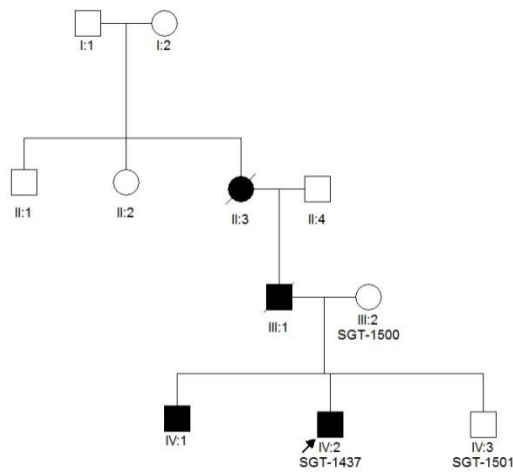


**Figura 4.** Clasificación clínica de los 19 pacientes estudiados, donde n es igual al número de casos correspondiente a cada fenotipo clínico.

El fenotipo predominante es HSP, representando el 48% de los casos. Tanto la atrofia cerebelosa como la migraña hemipléjica familiar, ambos son signos clínicos que en pueden acompañar a casos de ataxias y paraparesias. En cuatro de los 19 probados evaluados ha sido posible realizar estudios de segregación de las variantes candidatas en muestras de familiares.

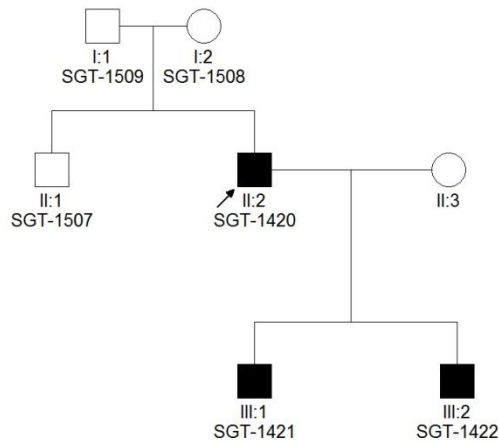
A continuación, se detallan estas familias en las que se ha llevado a cabo los estudios de segregación:

**fATX-168:** El probando es un hombre (SGT-1437; **Fig. 5**) que padece ataxia. Se trata de un caso esporádico, ya que no existen antecedentes familiares. Se pudieron obtener muestras de ADN de su madre (SGT-1500) y su hermano (SGT-1501), ambos sanos.



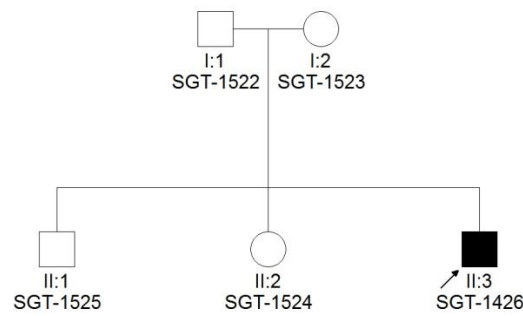
**Figura 5.** Árbol genealógico de la familia fATX-168.

**fATX-169:** El probando es un hombre (SGT-1420; **Fig. 6**) que presenta un fenotipo de HSP-AD. Es un caso familiar con familiares afectados en dos generaciones. Se pudieron obtener muestras de ADN de sus hijos varones (SGT-1421 y SGT-1422), ambos enfermos; y de su hermano (SGT-1507), madre (SGT-1508) y padre (SGT-1509), asintomáticos.



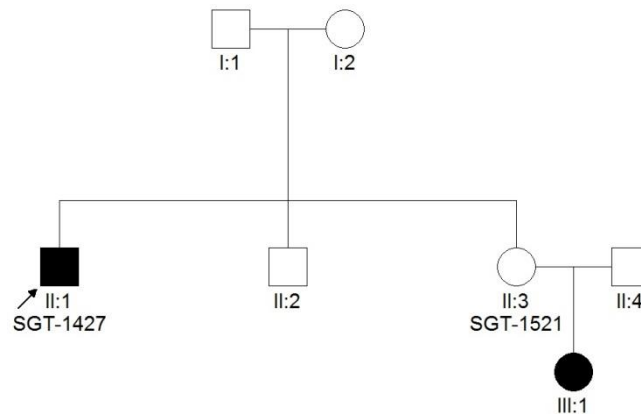
**Figura 6.** Árbol genealógico de la familia fATX-169.

**fATX-173:** El caso índice es un hombre (SGT-1426; **Fig. 7**) que presenta un fenotipo de HSP. Se trata de un caso esporádico y se ha dispuesto de muestras de ADN de su padre (SGT-1522), madre (SGT-1523), hermana (SGT-1524) y hermano (SGT-1525), todos ellos asintomáticos.



**Figura 7.** *Árbol genealógico de la familia fATX-173.*

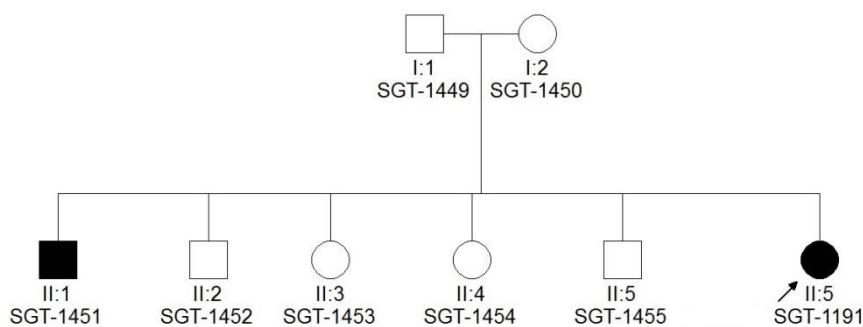
**fATX-174:** El propositus es un hombre (SGT-1427; **Fig. 8**) que cursa con HSP. Se trata de un caso familiar, si bien sólo se ha contado con la muestra de ADN de hermana (SGT-1521), en principio sana.



**Figura 8.** *Árbol genealógico de la familia fATX-174.*

### 3.1.2. Análisis de mutaciones en ATM

Las mutaciones investigadas, c.2921+1G>A y c.1899-11C>G, se identificaron en la probando SGT-1191 que pertenece a la familia fATX-165 (**Fig. 9**). Tal y como se indicó en la Introducción, la paciente cursa con ataxia, telangiectasias oculares y disartria, con un debut de la enfermedad a los 26 años. Se trata de un caso familiar, estando uno de sus hermanos afectados (SGT-1451) en una fratría de seis (**Fig. 9**). Las muestras disponibles se indican con el código SGT en el árbol genealógico de la **Fig. 9**.



**Figura 9.** *Árbol genealógico de la familia fATX-165.*

### 3.2. Análisis genético mediante panel de genes AtxSPG-365

El panel AtxSPG-365 es de diseño propio y comprende 365 genes implicados en ataxias hereditarias y paraparesias espásticas familiares (**Anexo I**). Está basado en tecnología SureSelectXT Custom (Agilent Technologies In., Santa Clara, CA, EEUU) para HiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, EEUU) y financiado mediante mecenazgo (Plataforma Indacea; <https://indacea.org/project/investigacion-en-ataxia-y-paraparesia-buscando-un-kit-diagnostico/>).

#### 3.2.1. Secuenciación y análisis bioinformático

El análisis bioinformático de los datos de plataforma de secuenciación masiva se realizó mediante un *pipeline* creado en la UGGENN del CIPF. El programa BWA (archivo BAM) se emplea para el alineamiento y ensamblaje de las secuencias con el genoma de referencia GRCh37. La identificación de las variantes de un solo nucleótido (SNV) y pequeñas deleciones e inserciones (indel), determinación de su genotipo y filtrado posterior se realizó mediante la herramienta HaplotypeCaller del software GATK (archivo VCF). Para la anotación se empleó la herramienta Variant effect Predictor de Ensembl.

#### 3.2.2. Análisis de la cobertura

Antes de analizar los resultados obtenidos en el filtrado informático, se debe comprobar que todos los genes del panel estén bien cubiertos. Con los resultados de cobertura, se analizan los genes que tienen una cobertura mayor y menor a 20.

Por otro lado, para cada intervalo para cada uno de los genes, se obtiene un ratio que permita comparar los resultados de los intervalos entre ellos para identificar si tenemos CNVs, inserciones o deleciones. El ratio se obtiene como el cociente del ratio de la cobertura del intervalo frente a la suma de las coberturas de un paciente, entre el promedio del ratio de las coberturas del intervalo frente a la suma de esas coberturas. Lo que se pretende es normalizar las coberturas de cada región de interés de la muestra para poder ser comparadas con las demás muestras de la serie para obtener una cobertura relativa.

Una vez obtenidos los valores, se resaltan los valores por debajo de 0,69 y aquéllos por encima de 1,29. Estos valores son establecidos como modificación de la metodología descrita en (Aparisi *et al.*, 2014). Los valores muy pequeños podrían indicar deleciones, mientras que los muy grandes podrían indicar duplicaciones. Se analiza uno a uno los resultados obtenidos.

#### 3.2.3. Priorización de las variantes candidatas

Teniendo en cuenta el elevado número de variantes detectadas tras el análisis bioinformático es necesario establecer unos criterios de priorización que nos permita centrarnos en el estudio de aquellas variantes que nos ofrezcan mayores indicios de que puedan ser patológicas. El laboratorio tiene un *pipeline* concreto que sigue a la hora de llevar a cabo este proceso.



Uno de los criterios que se tiene particularmente en cuenta es la frecuencia en población sana. Filtramos según la frecuencia MAF (*minor allele frequency*) anotada para cada variante, considerando sólo los cambios con frecuencia alélica inferior al 1%. Consultando la base de datos gnomAD (<http://gnomad-old.broadinstitute.org/>) que es un repositorio de WES y WGS de individuos no relacionados, se anota el número de alelos descritos en heterocigosis u homocigosis para cada variante seleccionada.

Además, nos fijamos en el efecto que las variantes causan en la proteína, siendo las de mayor interés las que causan un codón de parada prematuro, incluyendo las de cambio de pauta de lectura, además de mutaciones de cambio de aminoácido y de secuencia de *splicing*.

Las variantes más interesantes se revisaron en el resto de pacientes estudiados con el panel (*multisample analysis*). La presencia de un cambio en un número elevado de muestras de la tanda de pacientes sugeriría que se puede tratar de un artefacto de la técnica o del análisis bioinformático.

Por último, se emplean programas de predicción de patogenicidad *in silico*, como SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>) o PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), para cambios de aminoácido. Son herramientas que hay que tener en cuenta con cautela ya que son meramente productoras en función principalmente de la conservación del residuo. Por otro lado, para las mutaciones que afectan al *splicing*, se hace uso de NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>), NNSPLICE versión 0.9 ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)) y Human Splicing Finder versión 3.1 (<http://www.umd.be/HSF3/HSF.shtml>). Gracias a estos predictores, se observa el posible efecto que van a tener las variantes en el cDNA que se va a obtener, que se confirmará con el estudio funcional.

Una vez filtradas las variantes para cada uno de los pacientes y seleccionadas aquéllas más interesantes por los criterios nombrados anteriormente, se indaga más en la posible asociación de la variante y del gen con la enfermedad mediante búsquedas bibliográficas, y en bases de datos de mutaciones patológicas (HGMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) y de enfermedades mendelianas o con contenido clínico (OMIM, <https://www.omim.org/>; HPO, <https://hpo.jax.org/app/>; NCBI [*National Center for Biotechnology Information*] ClinVAR, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

#### 3.2.4. Validación y estudio de segregación de los cambios

##### **3.2.4.1. Diseño de cebadores**

Para poder analizar las regiones en las que se encuentran las variantes candidatas, se debe proceder al diseño de cebadores o *primers* que se utilizaran para amplificar dicha zona durante la PCR. Las secuencias de nucleótidos empleadas se obtuvieron a partir de la bases de datos del Ensembl Genome Browser 37 (ENSEMBL, <http://www.ensembl.org>) y se obtuvieron sus parámetros a partir de la herramienta de la casa comercial Sigma-Aldrich llamada OligoEvaluator™ (<http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet>). Para el diseño, se tienen en cuenta una serie de criterios:

- Los *primers*, preferiblemente, son diseñados para ser capaces de amplificar una región de entre 300 y 700 pb.
- Los *primers* deben tener un tamaño aproximado de entre 18 y 24 bp.
- Se debe evitar que los *primers* tengan algún SNP de elevada frecuencia en población control para evitar la posible pérdida de la amplificación de un alelo. En el caso de que esto sea imposible, se prefiere que éstos se encuentren en la región 5' del primer.
- Es preferible que la región 3' del *primer* acabe con una GC, CC, GG, C o G.
- Es preferible que los *primers* tengan un porcentaje de GCs superior al 40%.
- La temperatura de hibridación de los *primers* debe ser, preferentemente, superior a 60°C. Debe haber una diferencia mínima entre los *primers* directo y reverso de dicha región. En nuestro caso, se diseñaron con una diferencia de 1°C.
- Para garantizar que los *primers* están diseñados correctamente, se debe comprobar que amplifican específicamente la región de interés. Para ello se puede utilizar la herramienta *Primer blast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) del NCBI.

### 3.2.4.2. Condiciones de PCR y de Secuenciación Sanger

La amplificación del ADN objeto de estudio se llevó a cabo en termocicladores Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems, Waltham, MA, EEUU). Las secuencias de los cebadores diseñados junto con las temperaturas de hibridación que varían en función del amplicón se muestran en la **tabla 1**. El programa de PCR general empleado se describe en la **tabla 2**.

**Tabla 1.** Secuencias de cebadores empleados para la amplificación de cada región de interés para la validación de las variantes candidatas.

ADN SGT	Gen	Cebadores	Secuencia 5'-3'	Tamaño Amplicón	Temperatura hibridación
1420	SPAST	SPAST/E9b_d	GTACTTAAATCGGTAATATGG	417 pb	55°C
		SPAST/E9b_r	ACTGTGAGACAATAAATTGC		
1426	FAT2	FAT2_E21_D	GTCACCAACCTCAGGGTC	576 pb	62°C
		FAT2_E21_R	GCCTCCCATTGGACTTTCTAG		
1427	SPTBN2	SPTBN2_Exon21_d	GAGTGGGGTTCATCAGCAG	585 pb	62°C
		SPTBN2_Exon21_r	GCTAGTGAAGGTGTTATCTGCC		
1428	MECP2	MECP2_EXON1_d	GGCCGAAATGGACAGGAAATCTC	502 pb	64°C
		MECP2_EXON1_r	GGCCGAGGGGAGAGTCCGC		
1437	KCND3	KCND3_Exon2_d	GTCCATGTCACAGTACCTGGC	609 pb	65°C
		KCND3_Exon2_r	GGCTGAGTGGCAGTGGCT		

**Tabla 2.** Programa general para realizar una PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95°C	5 minutos	1
Desnaturalización	95°C	30 segundos	35
Hibridación	X°C	30 segundos	
Extensión	72°C	35 segundos	
Extensión	72°C	7 minutos	1
Reposo	4°C	∞	1

\*Las reacciones de PCR correspondientes a los genes *SPG7* y *KCND3* se programaron con un tiempo de extensión de 40 segundos.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ , siguiendo unas condiciones de PCR estándar, indicadas en la **tabla 3**.

**Tabla 3.** Componentes de la mezcla de reacción para PCR por muestra.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O			19,5
Tampón	10X	1X	2,5
dNTPs	20 mM	0,4 mM	0,5
Primer directo	10 $\mu\text{M}$	0,2 $\mu\text{M}$	0,5
Primer reverso	10 $\mu\text{M}$	0,2 $\mu\text{M}$	0,5
Taq polimerasa	1 U/ $\mu\text{L}$	0,5 U/ $\mu\text{L}$	0,5
ADN			1

\*En el caso del gen *MECP2*, se utilizó 1,25  $\mu\text{L}$  de DMSO y 0,5  $\mu\text{L}$  de MgCl<sub>2</sub>, por lo que el volumen total de agua es de 17,75  $\mu\text{L}$ .

A continuación, se indican los reactivos empleados:

- Tampón Standard 10x con MgCl<sub>2</sub> (Biotools, Inc., Jupiter, FL, EEUU).
- Enzima *Taq* Polimerasa (1U/ $\mu\text{L}$ ) (Biotools, Inc., Jupiter, FL, EEUU).
- dNTPs (IBIANLab Technologies, Zaragoza, España).
- Cebadores (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemania).
- H<sub>2</sub>O libre de DNAsa y RNAsa (VWR Life Science, Radnor, PA, Estados Unidos).

Los productos de PCR se visualizaron empleando el agente intercalante GelRed (Biotium, Fremont, CA, EEUU), en geles de agarosa al 1%, preparados con TAE 1% (Tris, acetato, EDTA y H<sub>2</sub>O) y agarosa de baja EEO (Scharlab SL, Barcelona, España). Como marcador de peso molecular se empleó 1 Kb Plus ADN Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU).

La secuenciación *Sanger* de los productos de PCR se realizó en el Servicio de Genómica y Genética Traslacional (SGGT) del CIPF, en un secuenciador *3730xl ADN Analyzer* (Applied Biosystems, Waltham, MA, EEUU). Los electroferogramas obtenidos se analizaron con el *software* libre *Chromas versión 2.5* y, empleando la herramienta *BLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), las secuencias genéticas obtenidas se compararon con las de referencia del genoma, con el fin de detectar variaciones.

### 3.3. Estudio de variantes en *ATM*

#### 3.3.1. Análisis de segregación

Para poder analizar las regiones con las variantes de interés, se diseñan cebadores siguiendo los criterios del apartado 3.2.4.1. y con ellos, se llevan a cabo las necesarias reacciones de PCR, cuyo programa se detalla en el apartado 3.2.4.2. (**Tabla 2**) en condiciones de PCR estándar. Los productos se testaron empleando GelRed (Biotium, Fremont, CA, EEUU) en geles de agarosa al 1%. Posteriormente, se secuenciaron en el SGGT-CIPF. Las secuencias de los *primers* así como las temperaturas de hibridación empleadas se indican en la **tabla 4**.

**Tabla 4.** Secuencias de cebadores empleados para la amplificación de cada región de interés en el estudio de segregación de la familia fATX-165.

Cambios en ATM	Cebadores	Secuencia 5'-3'	Tamaño amplicón	Temperatura hibridación
c.1899-11C>G	ATM/E13_d	ATGACATTTGATATAAGTAGGTCTC	678 pb	58°C
	ATM/E13_R	CTTACTATTCTCACTAACCTACAC		
c.2921+1G>A	ATM/E19_20_d	AGGCTGTTCTCAAACCTCC	603 pb	58°C
	ATM/E19_20_r	GATGTATTAGCTATGTAGGAAGATC		

### 3.3.2. Estudio *in silico*

Para estudiar el efecto de los cambios intrónicos, se hace uso de los predictores de *splicing* nombrados en el apartado 3.2.3.

Además de estos predictores, para estimar la proteína que se generaría a partir de los transcritos que se produzcan a causa del posible cambio en el *splicing*, se empleará la herramienta *ExpASy* (<https://web.expasy.org/translate/>), para obtener la traducción del mensajero, y la herramienta *BLASTP* ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LC=blasthome)) para comparar la proteína generada con la *wild type*.

### 3.3.3. Análisis de las consecuencias de ATM c.2921+1G>A y c.1899-11C>G

#### 3.3.3.1. Extracción de RNA y retrotranscripción a cDNA

Para llevar a cabo el análisis funcional de los cambios, se necesita obtener el RNA del paciente, que se extrae a partir de sangre periférica. Para ello, se hace uso del kit comercial PAXgene Blood RNA Kit IVD (QIAGEN, Hilden, Germany <https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/rna/total-rna/paxgene-blood-rna-kit-ivd/#resources>).

Para obtener cDNA a partir de RNA, es decir, llevar a cabo una retrotranscripción, utilizamos el kit comercial qScript cDNA SuperMix (Quantabio, Beverly, MA, EEUU).

Pasos:

- 5 minutos a 25°C
- 30 minutos a 42°C
- 5 minutos a 85°C
- Reposo tiempo indefinido a 4°C

Para un volumen final de 20 µL, se utilizan:

**Tabla 5.** Reactivos empleados en la reacción de retrotranscripción de ARN a cDNA.

Reactivo	Volumen de reactivo
qScript cDNA SuperMix	4 µL
RNA (partiendo de una concentración de RNA de 500 ng)	2,5 µL
H <sub>2</sub> O (DNasa y RNasa free)	13,5 µL

### 3.3.3.2. Diseño de cebadores, condiciones de PCR y de secuenciación Sanger

Para poder analizar las regiones de interés, se deben diseñar cebadores con los criterios explicados en el apartado 3.2.4.1. Se debe tener en cuenta que se trabaja con cDNA, por lo que se utiliza como referencia el transcrito ATM-201 (ENST00000278616.4; NM\_000051), cuya secuencia se ha obtenido de Ensembl Genome Browser 37 (ENSEMBL, <http://www.ensembl.org>), teniendo en cuenta los predictores *in silico* y la bibliografía referente al *splicing* (Gilad *et al.*, 1996; Stankovic *et al.*, 1998; Telatar *et al.*, 1998; Xiong *et al.*, 2015).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo amplificando el cDNA del paciente y de un control para poder comparar los patrones de electroforesis. Se utilizó el programa de PCR estándar (**Tabla 2**). Los *primers* y las temperaturas de hibridación utilizadas están en la **tabla 6**. Las condiciones de PCR fueron las estándar suplementadas con MgCl<sub>2</sub> (**Tabla 7**). Además, se amplificó *GAPDH* como control de carga para comprobar que el cDNA está en buenas condiciones y para normalizar la retrotranscripción (**Tabla 6**). Los productos de PCR se visualizaron empleando GelRed (Biotium, Fremont, CA, EEUU), en geles de agarosa al 1%, como se ha explicado en el apartado 3.2.4.2.

**Tabla 6.** Secuencias de cebadores empleados para la amplificación de cada región de interés.

Amplicón (n)	Cambios en ATM	Cebadores	Secuencia 5'-3'	Tamaño amplicón	Temperatura hibridación
1	c.2921+1G>A	cD_E17_d	GGAGAGAGCCAAAGTACCATAG	512 pb	60°C
		cD_E21_r	ACTAGGGCCATTCTTACAGAG		
2	c.2921+1G>A	cD_E17_d	GGAGAGAGCCAAAGTACCATAG	470 pb	62°C
		cD_E20_21_r	GTTAGATGCCAAAATGCTCC		
3	c.1899-11C>G	cD_E11_d	GTGCCTCCAATTCTTACAG	578 pb	60°C
		cD_E15_r	AAGCAACGTGTACATAGCTGC		
Gen		Cebadores	Secuencia 5'-3'	Tamaño amplicón	Temperatura hibridación
<i>GAPDH</i>		GAPDH_D	CATTGACCTCAACTACATGG	395 pb	58 °C
		GAPDH_R	CAAAGTTGTCATGGATGACC		

**Tabla 7.** Componentes de la mezcla de reacción para PCR por muestra.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
H <sub>2</sub> O			18,5
Tampón	10X	1X	2,5
dNTPs	20 mM	0,4 mM	0,5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0,5 mM	0,5
Primer <i>directo</i>	10 μM	0,2 μM	0,5
Primer <i>reverso</i>	10 μM	0,2 μM	0,5
Taq polimerasa	1 U/μL	0,5 U/μL	0,5
cDNA			1,5

\*Las casas comerciales se indican en el apartado 3.2.4.2.

### **3.3.3.3. Extracción/purificación ADN a partir de gel de agarosa**

Con el fin de separar diferentes bandas visiblemente separables (al ser testadas en un gel de agarosa) en un producto de PCR, se corre éste (dos productos juntos para que se pueda purificar más cantidad de ADN) en un gel de doble agarosa al 1,5% preparado con TAE 1% (Tris, acetato, EDTA y H<sub>2</sub>O) y agarosa de baja electroendosmosis (Scharlab SL, Barcelona, España). Se cortan las bandas de utilizando un transiluminador de luz ultravioleta y se extrae el ADN empleando el kit de extracción llamado NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Alemania). Una vez purificada, la banda se secuencía en el SGGT-CIPF.

### **3.3.3.4. Clonación de productos de PCR con TOPO® TA Cloning® Kit y purificación del ADN**

Para purificar diferentes bandas de un producto de PCR, que no son visiblemente separables en el gel de agarosa, se deben clonar los diferentes productos, para, posteriormente, ser secuenciadas por separado.

Para la clonación se empleó el vector pCR™2.1-TOPO® del TOPO® PCR Cloning Kit for Sequencing (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). El mapa de este vector se encuentra disponible en el **Anexo II**. La reacción de ligación del inserto correspondiente y el vector se llevó a cabo añadiendo 4 µL de producto de PCR, 1 µL de solución salina y 1 µL de vector TOPO, durante 5 minutos a temperatura ambiente y, seguidamente, se incubó en hielo. La transformación se realizó siguiendo un protocolo de choque térmico, empleando bacterias *E. coli* competentes. Se añadieron 2 µL de la reacción de ligación. Tras 30 minutos en hielo, se aplicó un choque térmico a 42°C durante 30 segundos, las bacterias se incubaron en hielo 2 minutos más y se añadieron 250 µL de medio de cultivo para bacterias LB. Tras incubar el cultivo 1 hora a 37°C, se sembraron en placas de agar con concentración de ampicilina, ya que el vector contiene el gen de resistencia a la misma, permitiendo así la selección de colonias recombinantes. Las colonias se mantuvieron en la estufa a 37°C durante toda la noche.

Para determinar si las colonias eran positivas, es decir, si presentaban el plásmido, se llevó a cabo se llevó a cabo una PCR de colonias (**Anexo III**) con los cebadores M13 del vector, siguiendo un programa estándar con una temperatura de hibridación de 56°C. Se empleó el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) para extraer el ADN plasmídico de las colonias recombinantes que fueran de interés. Este ADN se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). Aquéllas que resultaron positivas se secuenciaron por Sanger, con los cebadores M13R y M13F (información de los *primers* en **Anexo III**).

## 4. RESULTADOS

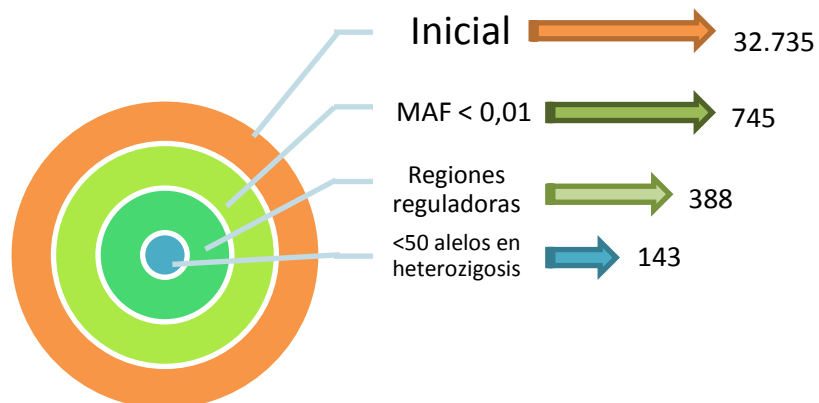
### 4.1. Análisis mediante panel de genes AtxSPG-365

Tal y como se ha indicado en Material y Métodos, el estudio se llevó a cabo mediante un panel de diseño propio AtxSPG-365 cuyos datos se filtraron haciendo uso de un *pipeline* propio.

La media de la cobertura de las regiones de este estudio fue >400x y el porcentaje de bases cubiertas por más de 20 lecturas fue de 99,8%.

El análisis de CNVs (*copy number variations*) reveló dos casos que podrían sugerir que existían variaciones de dosis génicas: en el probando SGT-1335, en la región genómica ChrX: 193.354.959-193.355.095 (GRCh37/hg19) coincidiendo con el exón 1 del gen *OPA1* (NM\_130837) y en el probando SGT-1338, en la región cromosómica ChrX: 146.993.673-146.993.773 (GRCh37/hg19) correspondiente al exón 1 del gen *FMR1* (NM\_002024). En ambos casos, el patrón alterado sería indicativo de una duplicación de cada una de las regiones indicadas.

La representación gráfica de la **figura 10** muestra el número de variantes filtradas durante el análisis de los datos informáticos obtenidos tras la secuenciación masiva de las 19 muestras estudiadas mediante el panel de genes ATxSPG-365.



**Figura 10.** Filtros aplicados hasta la selección final de variantes. MAF: Frecuencia del alelo menos común (*minor allele frequency*).

De un total de 32.735 variantes detectadas inicialmente, se seleccionaron 745 que presentaban una MAF < 0,01, además de localizarse en región codificante (*protein coding*) y estar descrita en un transcrito canónico. De éstas se seleccionaron 388 variantes porque eran cambios que conducían a codón de parada, cambios de pauta de lectura (*frameshift*), cambios de aminoácido (*missense*) y sinónimos, pequeñas deleciones y/o inserciones, o localizado en región flanqueante de *splicing*. Por último, de éstas se eligieron 143 mutaciones porque su frecuencia era baja, inferior a 50 alelos en población control (gnomAD).

De los 19 probandos iniciales, en 7 no se encontraron mutaciones puntuales de interés que se pudieran estudiar, aunque en uno de ellos, como ya se ha comentado anteriormente, hay una CNV. En los restantes 12 pacientes, se seleccionaron una serie de variantes (22 variantes en total), todas ellas detectadas en heterocigosis (**Tabla 8**).

En dos pacientes (2/19; 10,5%) se identificaron cambios previamente descritos como patológicos (Di Fabio *et al.*, 2014; Goizet *et al.*, 2009; Jacquemin *et al.*, 2012) (individuos SGT-1343 (Jacquemin *et al.*, 2012) y SGT-1425 (Di Fabio *et al.*, 2014; Goizet *et al.*, 2009); **Tabla 8**). En ambos casos, los cambios se detectaron en heterocigosis cuando la herencia asociada a estos genes, *ATM* y *CYP7B1*, es autosómica recesiva, por lo que en ambos pacientes para estas dos variantes son portadores sanos.

Otra de las variantes encontradas (en el probando SGT-1420) se trataría de un cambio probablemente patológico, y el resto de cambios se clasificaron como variantes de significado incierto (VUS, *variant of uncertain significance*), siguiendo los criterios establecidos por la ACMG (*American College of Medical Genetics and Genomics*) y la AMP (*Association for Molecular Pathology*) (Richards *et al.*, 2015).

En todos los casos las variantes (**Tabla 8**) fueron validadas en la muestra del probando y se confirmaron todas ellas, excepto el cambio en SGT-1428 que resultó ser un falso positivo. En cuatro casos, SGT-1420, SGT-1426, SGT-1427 y SGT-1437, la disponibilidad de muestras de familiares permitió la realización de análisis de segregación.

Los electroferogramas correspondientes a la secuenciación de las muestras de las familias de estudio se encuentran disponibles en el **Anexo V**.



**Tabla 8.** Cambios de interés detectados con el panel AtxSPG-365 en doce casos.

Probando	Cuadro Clínico	Gen (RefSeq) <sup>a</sup>	Cambio cDNA <sup>b</sup> Cambio proteína	Novedad	Predictores <i>in silico</i>		
					SIFT	PolyPhen-2	Mutation Taster
SGT-1322	Ataxia	<i>ATN1</i> (NM_001007026)	c.2074G>A p.V692M	Novel	T	PP	PM
SGT-1341	Atrofia cerebello	<i>WASHC5</i> (NM_014846)	c.3089A>G p.Y1030C	Novel	D	PP	DC
		<i>PNPLA6</i> (NM_001166111)	c.1835T>C p.F612S	Novel	D	PP	DC
		<i>PRKCG</i> (NM_002739)	c.2056C>T p.R686C	rs770722155	D	PP	DC
SGT-1343	Ataxia	<i>ATM</i> (NM_000051)	c.7879T>C p.Y2627H	CM121259 <sup>c</sup>	D	PP	DC
		<i>PEX6</i> (NM_000287)	c.302C>T p.P101L	rs774813175	D	PP	DC
SGT-1344	HSP	<i>CACNA1A</i> (NM_000068)	c.7432C>G p.P2478A	Novel	T	B	DC
		<i>KIF1A</i> (NM_001244008)	c.5261T>A p.L1754Q	Novel	D	PP	DC
		<i>TMEM67</i> (NM_153704)	c.2879C>T p.A960V	rs777286963	T	B	DC
SGT-1420	HSP	<i>SPAST</i> (NM_014946)	c.1235C>T p.T412I	Novel	D	PP	DC
SGT-1425	HSP	<i>CYP7B1</i> (NM_004820)	c.889A>G p.T297A	rs587777222	D	PP	DC
		<i>KIF1C</i> (NM_006612)	c.1786C>T p.R596C	rs77162806	D	PP	DC
		<i>LAMA1</i> (NM_005559)	c.4072C>T p.L1358F	Novel	T	B	DC
		<i>SACS</i> (NM_014363)	c.9749T>G p.F3250C	Novel	D	PP	DC
SGT-1427	HSP	<i>SPTBN2</i> (NM_006946)	c.4166C>T p.A1389V	Novel	T	B	DC
SGT-1428	HSP	<i>MECP2</i> (NM_001110792)	c.4G>A p.A2T	Novel	D	B	DC
SGT-1434	Ataxia	<i>CACNA1G</i> (NM_001256334)	c.6892C>T p.P2298S	rs755917885	T	B	PM
		<i>SLC46A1</i> (NM_080669)	c.953G>A p.S318N	rs782516390	D	PP	DC
SGT-1437	Ataxia	<i>KCND3</i> (NM_004980)	c.1117A>G p.M373V	Novel	D	B	DC
Probando	Cuadro Clínico	Gen (RefSeq)	HGVS	Novedad	Predictores <i>in silico</i>		
					NNSplice	HSF	NetGene2
SGT-1338	Ataxia	<i>WASHC5</i> (NM_014846)	c.2672_2673insT p.L892Pfs*37	rs1360803396	Activación de un sitio aceptor nuevo	Activación de un sitio dador críptico exónico.	Pérdida de dos sitios aceptores
SGT-1426	HSP	<i>FAT2</i> (NM_001447)	c.11906-5C>T	Novel	SC	SC	SC
		<i>ATAD3A</i> (NM_018188)	c.515-6G>T	rs61777882	SC	NA	SC

<sup>a</sup>Secuencia de referencia. <sup>b</sup>Todos los cambios se detectaron en heterocigosis. <sup>c</sup>Cambio anotado en HGMD. rs: referencia de acceso en la base de datos dbSNP; T: tolerable; B: benigno; PP: probablemente patológico; D: deletéreo; DC: causante de enfermedad; PM: polimorfismo; SC: sin cambios; NA: no aplicable.

A continuación, se detallan los resultados obtenidos para cada familia:

**fATX-168:** En el paciente SGT\_1437 (**Fig. 5**) se ha detectado un cambio *missense* en heterocigosis en el gen *KCND3*, c.1117A>G (p.M373V), en el exón 2. Esta variante no está descrita en ninguna de las bases de datos consultadas (gnomAD, HGMD), por lo que sería novel. Sin embargo, en HGMD, base de datos de mutaciones descritas como patológicas, sí está anotada p.M373I, que afecta a la misma posición. Valina e isoleucina son aminoácidos no polares y alifáticos con una cadena lateral muy parecida en residuos y tamaño. Este residuo M373 se localiza en el canal del poro de la proteína *KCND3*. Los algoritmos de patogenicidad muestran resultados divergentes, SIFT y Mutation Taster indican que sería patológico, mientras que PolyPhen-2 lo muestra como benigno (**Tabla 8**). Con la secuenciación muestras de ADN de las muestras de ADN disponibles de familiares (**Fig. 5**), se pudo determinar que ni la madre ni el hermano eran portadores de *KCND3* c.1117A>G (**Tabla 9**). La variante, por tanto, podría cosegregarse con la enfermedad.

**Tabla 9.** Análisis de segregación de *KCND3* c.1117A>G en la familia fATX-168.

SGT	Muestra	Fenotipo	Resultado
1437	Probando	Enfermo	Heterocigoto
1500	Madre	Sana	Negativo
1501	Hermano	Sano	Negativo

**fATX-169:** En el paciente SGT\_1420 (**Fig. 6; Tabla 8**) se ha detectado un cambio de aminoácido en heterocigosis en el exón 9 del gen *SPAST*: c.1235C>T (p.T412I). Esta variante no está descrita en las bases de datos consultadas (HGMD, Ensembl), y se trata, por tanto, de una variante novel. Los algoritmos de predicción *in silico* predicen que es deletérea (**Tabla 8**). Con la secuenciación de las muestras de ADN disponibles de familiares (**Fig. 6**), se estableció que sólo los hijos enfermos tenían el cambio *SPAST* c.1235C>T (**Tabla 10**). La variante, por tanto, cosegrega con la enfermedad. Además, es una variante *de novo*, en tanto que los padres del probando no la tienen.

**Tabla 10.** Análisis de segregación de *SPAST* c.1235C>T en la familia fATX-169.

SGT	Muestra	Fenotipo	Resultado
1420	Probando	Enfermo	Heterocigoto
1421	Hijo	Enfermo	Heterocigoto
1422	Hijo	Enfermo	Heterocigoto
1507	Hermano	Sano	Negativo
1508	Madre	Sana	Negativo
1509	Padre	Sano	Negativo

**fATX-173:** En el paciente SGT\_1426 (**Fig. 7; Tabla 8**) se ha detectado un cambio en heterocigosis localizado en secuencia consenso de *splicing* en el intrón 20 del gen *FAT2*: c.11906-5C>T. Esta variante no está descrita en las bases de datos consultadas (HGMD, Ensembl). Se trata, por tanto, de una variante novel. De acuerdo con Mutation Taster el cambio podría ser dañino, y según los predictores para mutaciones de *splicing*, esta variante no afectaría al procesado del mRNA (**Tabla 8**). Con la secuenciación de las muestras de ADN disponibles de familiares (**Fig. 7**), se estableció que además del probando, su madre y su hermana, ambas sanas, eran portadoras heterocigotas para *FAT2* c.11906-5C>T (**Tabla 11**). Consecuentemente, es posible concluir que esta variante no cosegrega con la enfermedad.

**Tabla 11.** Análisis de segregación de *FAT2* c.11906-5C>T en la familia fATX-173.

SGT	Muestra	Fenotipo	Resultado
1426	Probando	Enfermo	Heterozigoto
1522	Padre	Sano	Negativo
1523	Madre	Sana	Heterozigoto
1524	Hermano	Sano	Negativo
1525	Hermana	Sana	Heterozigoto

**fATX-174:** En el paciente SGT\_1427 (**Fig. 8; Tabla 8**) se ha detectado un cambio de aminoácido en heterozigosis en el exón 21 del gen *SPTBN2*: c.4166C>T (p.A1389V). Es una variante novel, ya que no está anotada en las bases de datos consultadas (HGMD, Ensembl). Los programas de predicción de patogenicidad han rendido resultados controvertidos, dos de ellos predicen que se trataría de una mutación benigna, y uno de ellos que causaría enfermedad (**Tabla 8**). Pese a sólo disponer de muestra de una hermana (SGT-1521), ha sido posible descartar el cambio *SPTBN2* c.4166C>T como patológico porque es heterozigota para éste (**Tabla 12**).

**Tabla 12.** Análisis de segregación de *SPTBN2* c.4166C>T en la familia fATX-174.

SGT	Muestra	Fenotipo	Resultado
1427	Paciente	Enfermo	Heterozigoto
1521	Hermana	Sana	Heterozigoto

#### 4.2. Estudio de los cambios c.2921+1G>A y c.1899-11C>G del gen *ATM*

El análisis de segregación realizado con las mutaciones c.2921+1G>A y c.1899-11C>G del gen *ATM*, identificadas en el caso índice de la familia fATX-165 (**Fig. 9**), reveló que las mutaciones cosegregan con la enfermedad (**Tabla 13**). Menos una hermana sana de la probando (SGT-1454), el resto de miembros sanos de la familia son portadores heterocigotos de alguna de las mutaciones, y los pacientes son heterocigotos compuestos.

**Tabla 13.** Análisis de segregación de *ATM* c.2921+1G>A/c.1899-11C>G en la familia fATX-165.

SGT	Muestra	Fenotipo	Resultado cambios <i>ATM</i>	
			c.2921+1G>A	c. 1899-11C>G
1191	Probando	Enfermo	Heterozigoto	Heterozigoto
1449	Padre	Sano	Negativo	Heterozigoto
1450	Madre	Sana	Heterozigoto	Negativo
1451	Hermano	Enfermo	Heterozigoto	Heterozigoto
1452	Hermano	Sano	Negativo	Heterozigoto
1453	Hermana	Sana	Heterozigoto	Negativo
1454	Hermana	Sana	Negativo	Negativo
1455	Hermano	Sano	Negativo	Heterozigoto

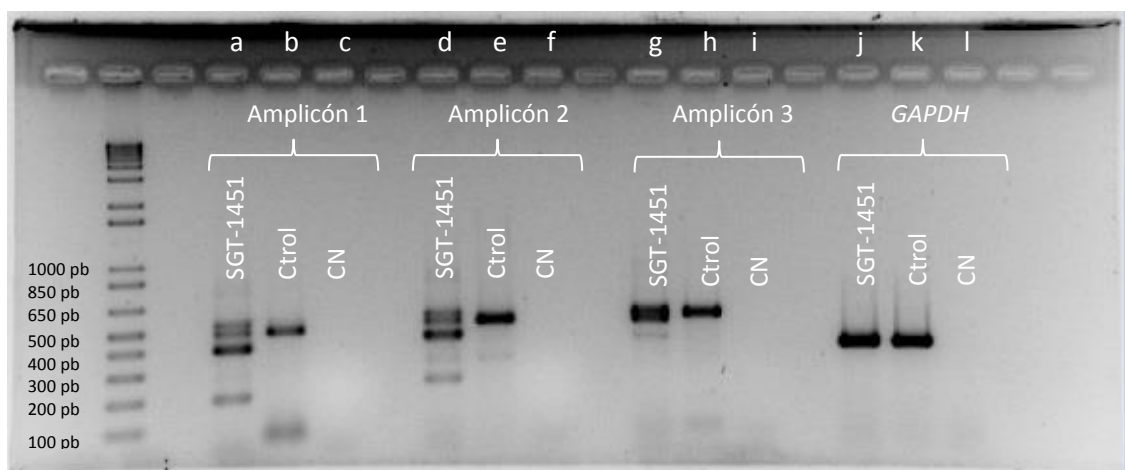
Para el cambio c.2921+1G>A, los predictores utilizados muestran que se podría producir una alteración en el sitio *donor* del WT, que afectaría al *splicing*. Si se empleara el nuevo sitio críptico, habría una reducción de 92 pb en la longitud del exón (**Anexo IV**).

Para el cambio c.1899-11C>G, el predictor HSF indica que se está produciendo una activación de un sitio aceptor intrónico críptico, que causaría un aumento de 10 pb en la longitud del exón (**Anexo IV**). Este nuevo sitio creado por la mutación se utilizaría con una probabilidad del 70,37% frente al 41,43% respecto al WT.

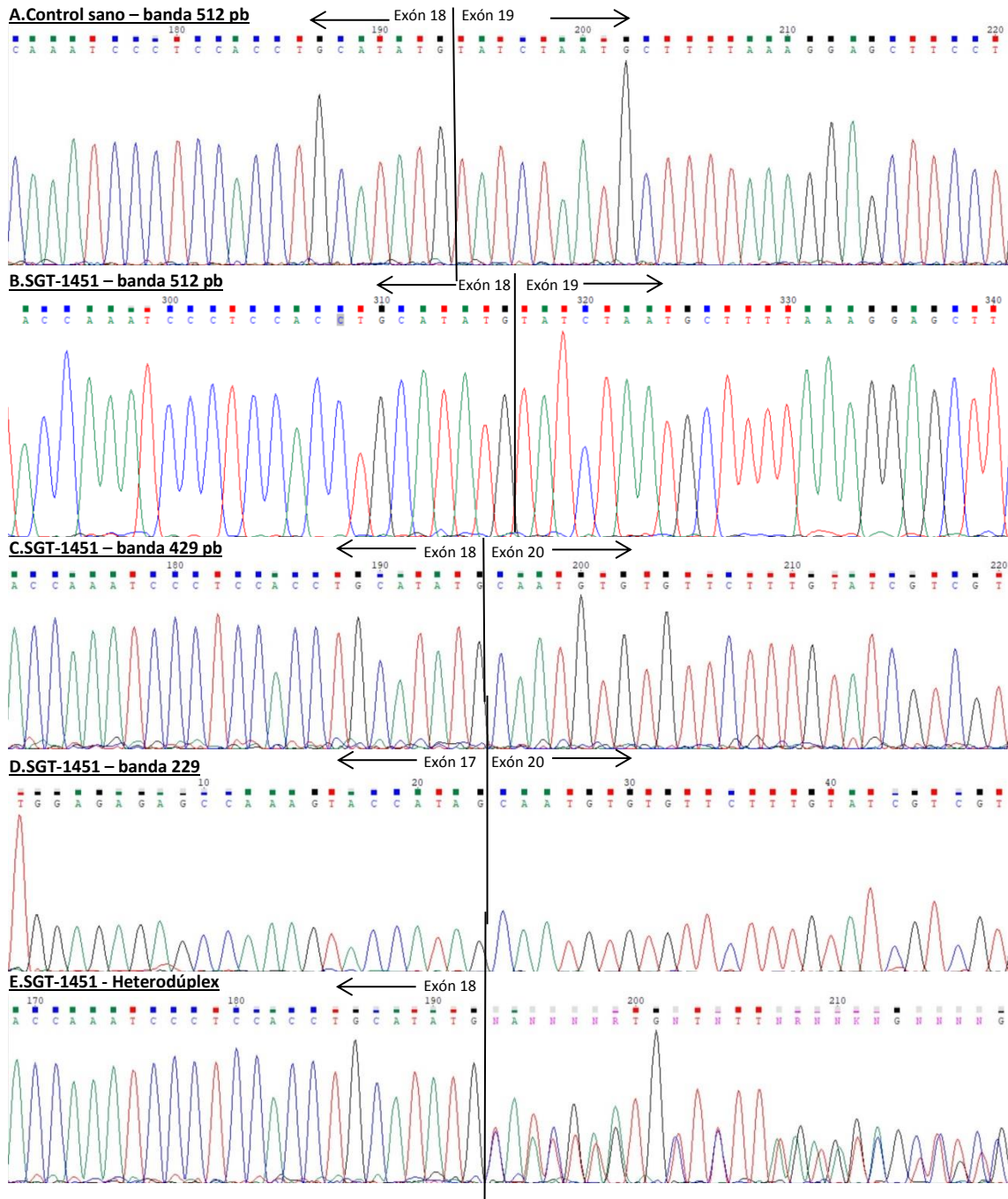
Teniendo como guía el análisis *in silico* predicho, se investigó *in vitro* cómo afectaban estas dos mutaciones al *splicing* analizando cDNA de la paciente. Además de *GAPDH*, se testó la PCR para los tres amplicones de *ATM* (**Tabla 7**), de forma que los amplicones 1 y 2 son para el estudio de la mutación c.2921+1G>A, y el amplicón 3 para el cambio c.1899-11C>G.

Para la mutación c.2921+1G>A en el amplicón 1 se observan cuatro bandas (**Fig. 11**). Cada una de ellas se cortaron y secuenciaron, de forma que en la carrera de SGT-1451 se aprecia una banda del tamaño del control sano (Ctrol) que corresponde a la secuencia canónica de 512 pb; una banda de 429 pb que es la consecuencia de una delección en el exón 19; y una banda de 229 pb que es causada por una delección que abarca los exones 18 y 19 (**Fig. 12**). La banda de mayor tamaño corresponde a un heterodúplex entre las dos primeras bandas aquí indicadas. La próxima de las bandas en el testado de agarosa hizo imposible cortar sólo la banda correspondiente a la secuencia canónica, por lo que se secuenció previa clonación con el *TOPO® TA Cloning® Kit*.

Para comprobar que esto era correcto y que no estábamos teniendo una contaminación del cDNA con ADN genómico, se diseñó un *primer* que se encontrara solapando entre los exones 20 y 21 (*ATM\_cDNA\_Exón20\_21\_r*; **Tabla 7**) que corresponde al amplicón 2 y se repitió todo el procedimiento ya explicado, obteniendo los mismos resultados que para los *primers* anteriormente citados (**Fig. 13**) con la salvedad de los tamaños de los amplicones según los primers utilizados. En este caso (amplicón 2) se obtiene una banda de 470 pb que corresponde a la secuencia canónica; una banda de 387 pb causada por la delección en el exón 19; y una banda de 187 pb correspondiente a una delección que abarca los exones 18 y 19, además de la banda mayor del heterodúplex formado.

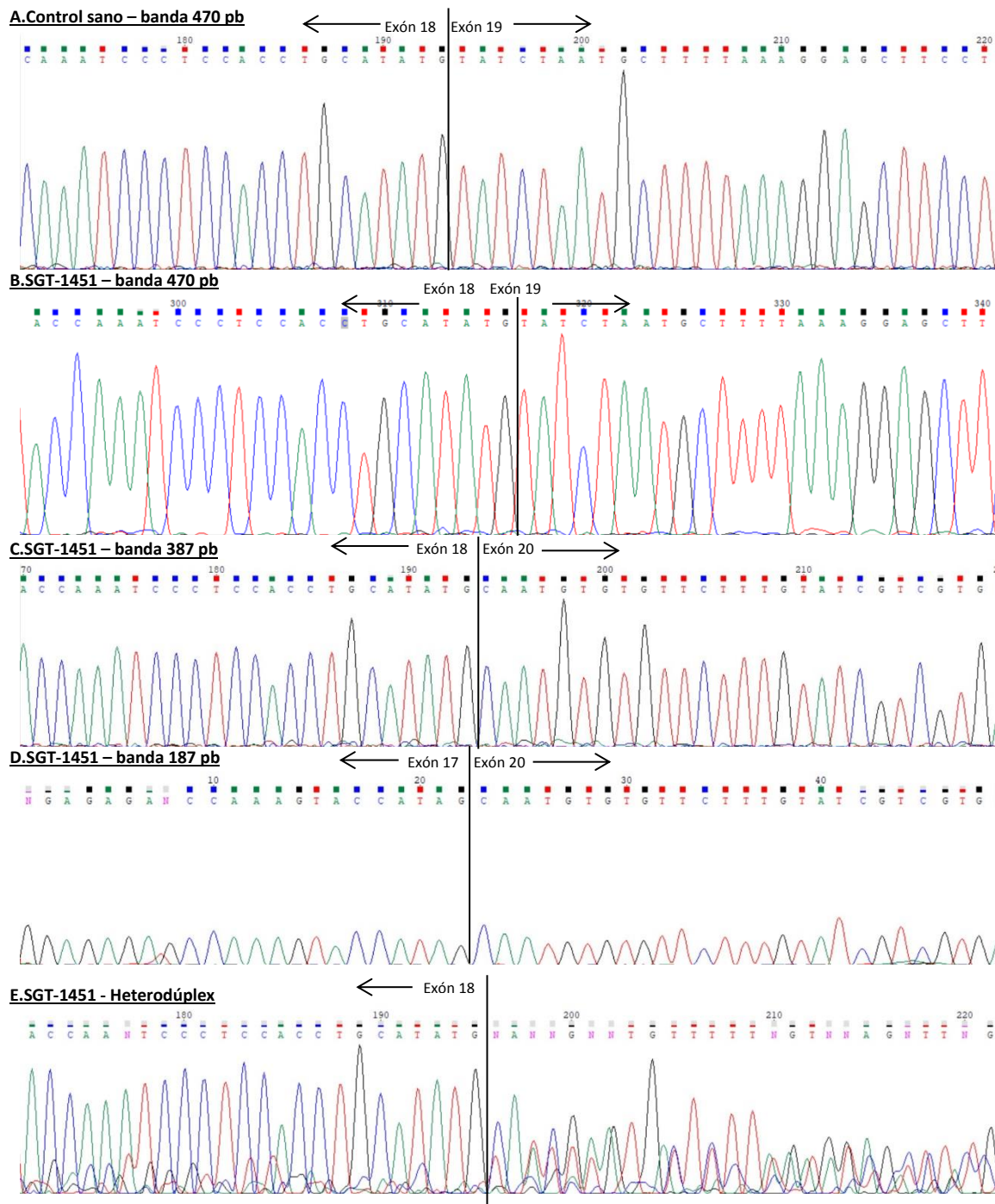


**Figura 11.** Electroforesis de los productos de PCR, testados en agarosa al 2% y peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; para (a), (b) y (c) amplicón 1 con cDNA del paciente (SGT-1451) y de un control sano, y sin cDNA (CN), respectivamente. (d), (e) y (f) Repetición de las carreras anteriores utilizando el primer reverso *ATM\_cDNA\_Exón20\_21\_r*. (g), (h) y (i) amplicón 3 con cDNA del paciente y de un control, y sin CDNA, respectivamente. (j), (k) y (l) *GAPDH* con cDNA del paciente y de un control, y sin cDNA, respectivamente.



**Figura 12.** Secuenciación de las bandas purificadas para el amplicón 1. (A) Muestra control (banda de 512 pb). (B) Banda de 512 que corresponde a la secuencia consenso. (C) Banda de 429 pb, que coincide con una delección del exón 19. (D) Banda de 229 pb que corresponde con una delección de los exones 18 y 19. (E) Heterodúplex entre las bandas (B) y (C).





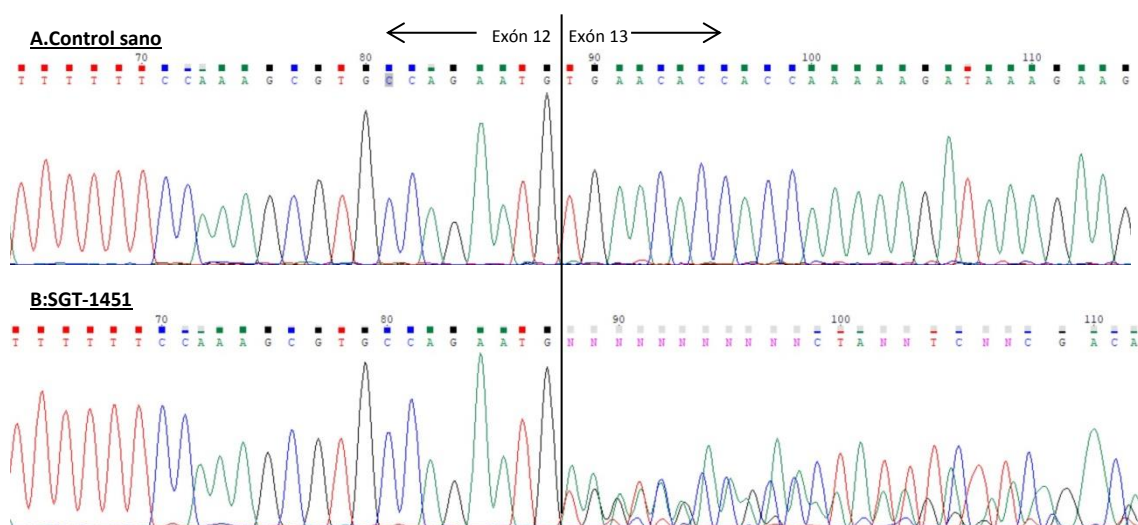
**Figura 13.** Secuenciación de las bandas purificadas para el amplicón 2. (A) Muestra control (banda de 470 pb). (B) Banda de 470 que corresponde a la secuencia consenso. (C) Banda de 387 pb, que coincide con una delección del exón 19. (D) Banda de 187 pb que corresponde con una delección de los exones 18 y 19. (E) Heterodúplex entre las bandas (B) y (C).

Por lo tanto, el cambio c.2921+1G>A produce un cambio en el *splicing* del gen *ATM*, correspondiente a dos transcritos distintos: uno con una delección del exón 19 y otro con delección de los exones 18 y 19.

Sabiendo el cambio en el *splicing* que se produce a raíz de esta mutación, se tradujeron los mensajeros que se generaron y, al ser comparados con la proteína *wild type*, se observó que, cuando se deleciona el exón 19, se produce una proteína de 954 aminoácidos, frente a los 3056 aminoácidos

de la proteína *wild type*. Ésta sufre un cambio de pauta a partir de la posición 947 y se nombraría como NP\_000042.3:p.Y947Qfs\*8, generando un codón de parada prematura ocho aminoácidos después. En el transcrito en el que se delecionan los exones 18 y 19, la proteína que se traduce tendría 914 aminoácidos, sufriendo un *frameshift* y generándose un codón STOP prematuro 18 residuos después, nombrándose como NP\_000042.3:p.G897Afs\*18.

En cuanto a c.1899-11C>G, testando la PCR se distinguía una banda con tamaño correspondiente a la secuencia consenso del amplicón (578 pb); no se apreciaban diferencias con el control (Fig. 11). Por lo tanto, se enviaron a secuenciar tanto el producto de PCR para el cDNA del paciente como el control. Sin embargo, a pesar de dar la impresión de que solo había una banda, se observa un doble producto en la PCR del paciente, ya que se observa un cambio en la pauta de lectura a partir del final del exón 12 o principio del exón 13 (Fig. 14).

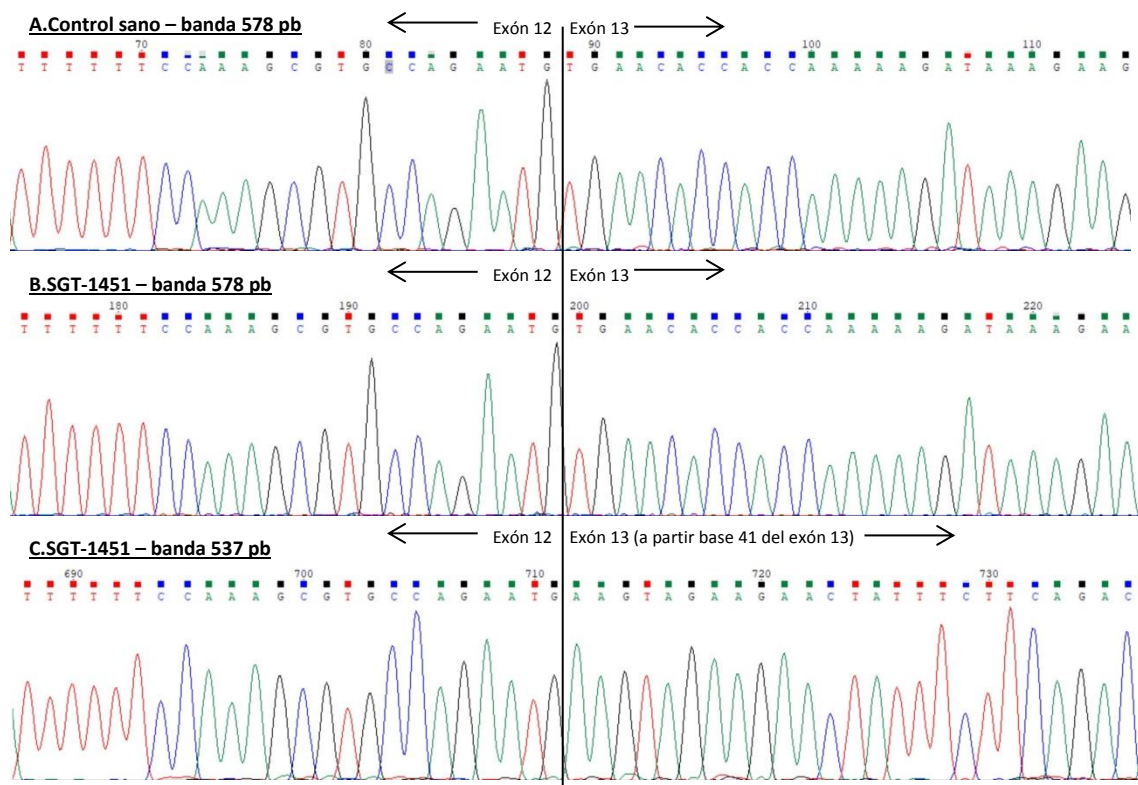


**Figura 14.** Secuenciación de las bandas purificadas para el amplicón 3. (A) Banda de 578 pb que es del tamaño esperado del amplicón secuenciada en el control y corresponde a la secuencia consenso. (B) Secuenciación del paciente en la que se aprecia que hay un cambio en la pauta de lectura, teniendo una secuencia del exón 12 limpia.

Para poder obtener el doble producto por separado se optó por clonar el fragmento de interés con el Kit TOPO® TA Cloning®. La PCR de 18 de las colonias obtenidas fue testada (Fig. 15), y según lo observado en los predictores *in silico* y la doble lectura anteriormente mencionada, se secuenciaron los plásmidos de las colonias 6, 7, 12, 13, 14 y 15. El fragmento de la secuencia consenso, se obtuvo en las colonias 6, 12, 13 y 15, mientras que el fragmento con delección se veía en las colonias 7 y 14 (Fig. 16).



**Figura 15.** Testado en agarosa al 1% de los productos de PCR de 18 colonias y el control negativo tras la clonación por TOPO® TA Cloning®. Peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder.



**Figura 16.** Secuenciación de las clonaciones. (A) Control sano (banda de 578 pb). (B) Colonia 6, que corresponde al fragmento wild type. (C) Colonia 7, que corresponde al fragmento con la delección. La línea negra marca el final del exón 12 y el principio del exón 13, que en el caso de (C) es distinto debido a la delección.

Si comparamos con la secuencia consenso de los exones 12 y 13 (**Fig. 17**), se observa que la delección se produce al principio del exón 13 y que se alarga a lo largo de 41 bp. Por lo tanto, el cambio *ATM* c.1899-11C>G produce un cambio en el *splicing* de su gen, correspondiente a una delección de 41 pb.

```
TAATTTTCCTCATCTTGTACTGGAGAAAATTCTTGTGAGTCTCACTATGAAAAACTGTAAAGCTGCAATGAATTTTTTCCAAA
GCGTGCCAGAATGTGAACACCACCAAAAAGATAAAGAAGAAGCTTTCATCTCAGAAGTAGAAGAAGTATTTCTTCAGACAAGT
TTTGACAAGATGGACTTTTTAACCATTGTGAGAGAATGTGGTATAGAAAAGCACCAGTCCAGTATTGGCTTCTCTGTCCACCA
GAATCTCAAGGAATCACTGGATCGCTGTCTTCTGGGATTATCAGAACAGCTTCTGAATAATTACTCATCTGAG
```

**Figura 17.** Secuencia consenso de los exones 12 (en negro) y 13 (en rojo y azul) del gen *ATM* (NCBI). La secuencia en rojo de 41 bases es la delecionada.

El transcrito mutante de c.1899-11C>G produciría una proteína de 632 aminoácidos frente a la *wild type* de 3056 aminoácidos, la cual es idéntica a la *wild type*, pero se produce un codón de stop en la posición 633, por lo que se nombraría como NP\_000042.3:p.C633\*.



## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Análisis mediante panel de genes AtxSPG-365

En este TFG se ha hecho uso de un panel de 365 genes relacionados con ataxias y paraparesias con el fin de establecer las bases genéticas de 19 pacientes.

Identificar la causa genética de este tipo de patologías es difícil debido a la gran heterogeneidad genética que tienen y a la gran variedad de formas clínicas que existen, las cuales comparten características fenotípicas y genotípicas entre sí. El testado por panel de genes permite, mediante un único experimento, analizar cientos de genes simultáneamente, con una alta cobertura y, por tanto, se trata de una herramienta coste-efectiva muy interesante. El presente trabajo ha permitido identificar variantes en hasta 20 genes distintos, lo que habría supuesto un enorme gasto si se hubiera analizado cada uno de los genes por separado mediante secuenciación por *Sanger*, además de un extraordinario consumo de tiempo.

En su conjunto, se han validado 17 variantes en 8 probandos y se han llevado a cabo análisis de segregación de 4 variantes. Además, en dos pacientes se identificaron CNVs (uno de los cuales en los que ya se había validado una mutación puntual). Se han identificado dos variantes patológicas en los probandos SGT-1343 y SGT-1425, pero, al tratarse de genes con herencia autosómica recesiva, no hemos logrado el diagnóstico genético. Se ha identificado otra variante (en SGT-1420) que es probablemente patológica. El resto se ha clasificado como variantes de significado incierto. Sin embargo, como ya hemos comentado, la variante identificada en SGT-1437, a pesar de clasificarse como VUS, identificaría la causa genética del paciente, por lo que el porcentaje de pacientes en los que se ha logrado el diagnóstico genético es de 10,5% (2/19). Es evidente que el número de casos resueltos en el marco de este TFG es bajo.

Este valor se puede comparar con los resultados obtenidos en otros estudios donde se utiliza panel de genes para el estudio de pacientes con ataxia y/o paraparesia espástica, en los que la tasa de éxito en el diagnóstico es del 18% (Németh *et al.*, 2013) o 14,3% (Coutelier *et al.*, 2017). Pero, para poder comparar entre paneles distintos, hay que tener en cuenta una serie de criterios, como puede ser el número de genes o los pacientes del estudio. En el primer ejemplo (Németh *et al.*, 2013), se utilizó un panel de 117 genes y se reclutaron 50 pacientes ingleses sin diagnóstico molecular, con ataxia como principal característica clínica y con antecedentes familiares de ataxia o una edad de inicio de la enfermedad por debajo de los 50 años. En el segundo (Coutelier *et al.*, 2017), se empleó un panel de 65 genes en 412 pacientes a través de SPATAX (<https://spatax.wordpress.com/>), clasificados según sus características clínicas, con herencia AD. Parece, por tanto, que la selección de los pacientes, en estos casos es crucial para alcanzar una tasa de diagnóstico alta.

Técnicamente, el panel AtxSPG-365 se compone de 365 genes implicados en ataxias hereditarias y paraparesias espásticas familiares, donde se agrupan todos los genes asociados a mecanismos fisiopatológicos similares o comunes, y consecuentemente a fenotipos solapantes, el cual proporciona un diagnóstico más resolutivo, y asimismo ayuda a entender mejor la correlación genotipo-fenotipo para estas enfermedades. Los pacientes fueron, en su mayoría, casos esporádicos con diagnóstico clínico de ataxias y paraparesias. Al no haber mayor especificidad en el diagnóstico previo de los pacientes con los que se ha hecho el panel, hace que el resultado de este pueda haber sido menor de lo esperado.

Una de las razones del resultado variable de los paneles de genes se debe a que son diseñados de manera propia e individual por los laboratorios y/o grupos de investigación, los cuales consideran unos u otros genes de estudio, y consecuentemente, la selección de genes puede resultar más o menos apropiada. Pero indudablemente, los pacientes estudiados son una variable muy importante a tener en cuenta. Si éstos tienen un diagnóstico claro sabremos mejor orientar el estudio genético. Cuando, sin embargo, la clínica es compleja, lograr establecer las causas genéticas puede ser una auténtica odisea.

Mejorar el resultado se podría hacer siguiendo con el estudio de otras variantes que, a pesar de haber sido consideradas de poco interés en un primer momento, pudieran darnos mayor información y resultados que aumentarían el porcentaje del rendimiento. Esto se podría realizar, por ejemplo, filtrando con una MAF > 0,01 y buscando otros cambios en heterocigosis en genes con herencia AR de los que sí se hubiera encontrado un cambio de interés.

Otra solución podría ser llevar a cabo un estudio por exoma de los pacientes en los que no se ha obtenido resultado concluyente o éste es incierto. La interpretación posterior de una WES (es decir, el análisis bioinformático y posterior filtrado de variantes) es un poco más complicada, debido a que se estudian todas las regiones codificantes conocidas del genoma. Sin embargo, la WES puede resultar una herramienta mucho más eficiente. En una serie clínica de pacientes con ataxia cerebelosa (Fogel *et al.*, 2014) lograron identificar la mutación clínica en un 21% de los casos, y en un 61% de los casos tenían cambios candidatos a ser la mutación causal, si bien eran preciso estudios adicionales para llegar a establecer con certeza que estas variantes eran realmente causales.

El estudio de segregación ha ayudado a proporcionar un diagnóstico genético concluyente en 2 familias:

El probando SGT-1437 (**fATX-168**) era portador del cambio novel *KCND3* c.1117A>G (p.M373V) en heterocigosis. El gen *KCND3* se encuentra en el cromosoma 1 y forma parte de un canal de potasio controlado por voltaje, concretamente el miembro 3 de la subfamilia D (Gaudet *et al.*, 2011). No solo se encarga del transporte de potasio a través de la membrana, sino que también participa en procesos de regulación cardíaca (Giudicessi *et al.*, 2011). Mutaciones en este gen están asociadas con ataxia, concretamente se había descrito otro cambio en la misma posición en la proteína pero en otro aminoácido (p.M373I), que está relacionado con SCA19 (Duarri *et al.*, 2012, 2015). El paciente cursa con ataxia, por lo que la correlación genotipo-fenotipo es acertada. El modo de herencia también concordaría, ya que se encuentra en heterocigosis para una enfermedad AD, como es la SCA19. Además, se ha visto que el cambio cosegrega con la enfermedad en la familia de estudio (**Tabla 9**), por lo sería una causa probable de producir la ataxia, a pesar de que se había clasificado inicialmente como VUS por tener información *in silico* contradictoria sobre el efecto que podía producir en la enfermedad.

El probando SGT-1420 (**fATX-169**) era portador del cambio novel *SPAST* c.1235C>T (p.T412I) en heterocigosis. El gen *SPAST* está en el cromosoma 2 y produce la proteína *espastina*. Se trata de una proteína de corte de microtúbulos ATP-dependiente, que reconoce y corta específicamente microtúbulos que están poliglutaminados (Errico *et al.*, 2002). Mutaciones en este gen están asociadas con paraparesias espásticas de herencia AD, por lo que la correlación genotipo-fenotipo sería la adecuada. Igualmente, la variante cosegrega con la enfermedad en la familia de estudio (**Tabla 10**), por lo sería una causa probable de la enfermedad. De ahí que esta variante se haya clasificado como probablemente patológica.

En otros dos individuos y los estudios en sus familias, no se ha llegado a un resultado concluyente con el estudio de segregación:

El probando SGT-1426 (**fATX-173**) era portador del cambio *FAT2* c.11906-5G>A en heterocigosis, el cual era novel para este gen. El gen *FAT2* se encuentra en el cromosoma 5 y participa en la regulación de la migración celular. Puede participar en la mediación de la organización de las fibras paralelas de las células granulares durante el desarrollo del cerebelo (Matsui *et al.*, 2008). Mutaciones en heterocigosis en este gen están asociadas a ataxia, aunque solo hay un caso descrito que presenta una mutación de *splicing* relacionada con el síndrome de piernas inquietas (Weissbach *et al.*, 2012). Ahora bien, en tanto que el cambio no cosegrega con la enfermedad en la familia de estudio (**Tabla 11**), no puede ser la mutación primaria causante de la enfermedad.

El paciente SGT-1426 tiene, además, un cambio intrónico en el gen *ATAD3A* c.515-6G>T, que estaba ya descrito en gnomAD en esa posición, pero G>A. Se trataría de un cambio en heterocigosis anotado (rs61777882) en un gen con herencia dominante que está relacionado con paraparesia espástica (H. M. Cooper *et al.*, 2017). El análisis de esta variante intrónica en las familias del probando está pendiente de realización.

El probando SGT-1427 (**fATX-174**) era portador del cambio novel *SPTBN2* c.4166C>T (p.A1389V). El gen *SPTBN2* se encuentra en el cromosoma 11 y la proteína que codifica se llama *spectrin beta non-erythrocytic 2* o *beta-III spectrin*. Se encarga de regular la vía de señalización del glutamato estabilizando el transportador de glutamato *EAAT4* en la superficie de la membrana plasmática (Perkins *et al.*, 2016). Mutaciones en este gen están asociadas a ataxia, mientras que el fenotipo del paciente es de paraparesia espástica, por lo que, en principio, no parece que la variante detectada contribuya al fenotipo clínico. El modo de herencia asociado a *EAAT4* es AD y, por tanto, es el indicado al tratarse de una mutación en heterocigosis, se ha podido establecer que no cosegrega con la enfermedad y consecuentemente se puede descartar como cambio patológico (**Tabla 12**).

En este caso, se podrían seguir estudiando otros cambios filtrados en el panel, como *CYP7B1* c.1234-3C>T. *CYP7B1* está implicado en paraparesia espástica. En HGMD (consultado 25/03/2019), hay descritas mutaciones en secuencias consenso de *splicing* tales como c.122+2T>C (Kara *et al.*, 2016); c.259+2T>C (Cao *et al.*, 2011) y c.850+1G>A (Schöls *et al.*, 2017). Sin embargo, al tratarse de un cambio en heterocigosis en un gen con herencia AR, aun siendo patológica la mutación identificada en SGT-1427, faltaría un cambio para presentar el fenotipo clínico asociado.

## 5.2. Estudio de los cambios c.2921+1G>A y c.1899-11C>G del gen *ATM*

Se ha llevado a cabo el estudio de dos mutaciones en el gen *ATM* que se detectaron en la paciente SGT-1191. Estas mutaciones, *ATM* c.2921+1G>A/c.1899-11C>G, modificarían el *splicing* correcto del gen, tanto en los estudios *in silico* como en los ensayos realizados en el laboratorio.

El cambio *ATM* c.2921+1G>A, según los programas *in silico*, producía una pérdida en uno de los sitios *donor* del WT, concretamente un cambio de 92 pb en el mensajero, según el predictor HSF. En cambio, al hacer los ensayos en el laboratorio, se observaron tres bandas distintas (además del heterodúplex): la *wild type*, la secuencia con delección del exón 19 y la secuencia con delección en los exones 18 y 19. Es decir, como consecuencia de esta mutación se generan dos transcritos distintos.

Para que esto ocurra, el *spliceosome* debe utilizar el sitio dador del exón 18 y el aceptor del exón 20; de esta forma, el exón 19 resultaría deleciónado y esto correspondería con el transcrito mayoritario (banda de 429 pb). Y alternativamente, el *spliceosome* podría emplear el sitio dador del exón 17 y el sitio aceptor del exón 20; en este caso, la deleción incluiría tanto el exón 18 como el exón 19 (banda de 229 pb). Gilad y colegas (Gilad *et al.*, 1996) observaron en la secuenciación del cDNA obtenido por RT-PCR de fibroblastos de un paciente portador de *ATM* c.2921+1G>A, que se habían deleciónado 83 pb que atribuyeron al exón 21. La secuencia de *ATM* que ellos emplearon, al igual que la actualmente vigente, tiene un tamaño de 9168 pb (Savitsky *et al.*, 1995), y el exón 21 con la nomenclatura actual tiene un tamaño de 76 pb, mientras que el exón 19 tiene 83 pb. Consecuentemente, entendemos que al paciente descrito en el trabajo de Gilad y colaboradores (Gilad *et al.*, 1996) le sucede lo mismo que a nuestro probando SGT-1451, la pérdida del exón 19 que es de 83 pb.

El hecho que se produzcan dos productos de *splicing* en el probando se podría explicar dado que, a pesar de que mutaciones en secuencias canónicas de *splicing* conducen, en la mayor parte de los casos, al *skipping* de un único exón (Wimmer *et al.*, 2007), puede ocurrir como en el caso de la mutación c.925-2A>G en el gen *COL5A2*, implicado en el síndrome de Ehlers-Danlos (Symoens *et al.*, 2011), que genera varios transcritos. La mutación en el sitio aceptor del *splicing* produce un transcrito donde se elimina el exón 7 y otro donde el *skipping* se produce en los exones 6 y 7. Esto se explica porque la mutación interfiere con el proceso normal de *splicing* y lleva a un cambio en la estructura secundaria del pre-ARNm alrededor del sitio aceptor del exón 7, lo que conduce a producir esos tres transcritos distintos. Dependiendo de qué intrón se elimine primero, en mutaciones de *splicing* en los genes *COL5A1* y *COL5A2*, el siguiente paso en el *splicing* será distinto. Por ejemplo, si la mutación está en el sitio aceptor del exón 5, si se elimina primero el intrón 5, a continuación se produciría el *skipping* de los exones 5 y 6; mientras que, si se elimina el intrón 6, lo siguiente que ocurriría sería que se diera el *skipping* del exón 5 a este intrón (Takahara *et al.*, 2002).

Por lo tanto, el cambio *ATM* c.2921+1G>A podría llevar a cabo un efecto parecido a los ejemplos expuestos: la mutación produce la activación de un sitio *donor* distinto al canónico que lleva un cambio en la estructura secundaria del pre-ARNm, conduciendo a un transcrito WT, uno con la deleción del exón 19 y otro transcrito donde se delecionan los exones 18 y 19.

Por su parte, el cambio *ATM* c.1899-11C>G, según los programas *in silico*, producía una activación de un sitio aceptor intrónico críptico, que causaría la inclusión de 10 pb en el exón 13. Sin embargo, experimentalmente comprobamos que se obtenían dos productos, el transcrito WT y el mutado que presentaba una deleción de las primeras 41 pb del exón 13. Este transcrito alternativo sería la consecuencia de la eliminación del sitio aceptor del exón 13.

Esta mutación en *ATM* seguiría el patrón descrito previamente en el que se ve activado un sitio críptico de *splicing* dentro de la secuencia del exón que afecta al pre-ARNm. Al ser más fuerte que el canónico causaría la pérdida de un fragmento de dicho exón. Este patrón de *splicing* es seguido, normalmente, por mutaciones exónicas, como en el caso de la mutación *ATM* c.513C>T que produce una deleción de los primeros 22 nucleótidos del exón 8 (Eng *et al.*, 2004). Sin embargo, también se habían descrito previamente cambios en *ATM* como c.3403-12T>A, el cual produce una deleción de 174 nucleótidos en el exón 26 (Stankovic *et al.*, 1998).

Por lo tanto, la mutación *ATM* c.1899-11C>G podría llevar a cabo este tipo de variación en el *splicing*: la activación de un sitio de *splicing* más fuerte que el sitio canónico que conduciría a que no se

utilizara el sitio aceptor del exón 13, sino uno nuevo que produciría una delección de las 41 primeras pares de bases del exón anteriormente citado.

Las proteínas mutadas resultantes para cada una de las mutaciones aquí descritas serían más cortas ya que en ambos casos, se generarían codones de parada prematuros: para ATM c.2921+1G>A se producirían dos posibles proteínas según el transcrito de 954 aas y de 914 aas, y para ATM c.1899-11C>G, la proteína tendría un tamaño de 632 aas. En todos los casos, la proteína carecería de los dominios que se encuentran en el extremo carboxilo-terminal de la proteína, FAT, fosfatidilinositol kinasa y FATC (Bosotti *et al.*, 2000), y por ende, se trataría de una proteína con actividad anómala o no funcional. Podría también ocurrir, que el ARNm no llegara a traducirse estando sometido al mecanismo de protección NMD (*non-sense mediated decay*) que evita la producción de proteínas truncadas con necesariamente efectos deletéreos (Hug *et al.*, 2015). Desde un punto de vista clínico, un proceso NMD juega un papel importante en la modulación del fenotipo de enfermedades genéticas causadas por mutaciones de parada prematura (Miller & Pearce, 2014). Un ejemplo ampliamente conocido son las enfermedades alélicas distrofia muscular de Duchenne (DMD) y distrofia muscular de Becker (DMB) causadas por defectos en el gen de la distrofina (Kerr *et al.*, 2001; Pillers *et al.*, 1999). Los transcritos que contienen mutaciones de parada prematura al ser eliminados por NMD, causan la ausencia de la proteína dando lugar a DMD cuya clínica es mucho más grave que la característica de DMB. Sin embargo, si existe algo de actividad de distrofina, aunque anómala, la clínica resultante es más leve, dando lugar a DMB. Estudios adicionales son precisos para llegar a establecer qué está realmente ocurriendo con las mutaciones de *splicing* investigadas en el presente TFG.

## 6. CONCLUSIONES

Partiendo de las hipótesis y los objetivos planteados en este TFG podemos establecer las siguientes conclusiones:

1. Los paneles de genes son una herramienta diagnóstica útil para pacientes con ataxia y paraparesia espástica, y en líneas generales, para enfermedades mendelianas con heterogeneidad genética, ya que es posible el análisis simultáneo de muchos genes. En el presente TFG se han investigado 19 pacientes con el panel AtxSPG-365 de diseño propio. En 7 de ellos no se ha identificado ningún cambio de interés y, en los 12 restantes se han detectado un total de 22 variantes que podrían ser patológicas.
2. Es importante la validación posterior con secuenciación Sanger de los cambios detectados mediante secuenciación NGS, en tanto que es posible que existan falsos positivos, tal y como ocurrió con *MECP2* c.4G>A (p.A2T) detectada en SGT\_1428.
3. Se ha logrado el diagnóstico genético en 2 de 19 probandos investigados empleando un panel que contiene 395 genes implicados en ataxias y paraparesias espásticas. En el probando SGT\_1437 (fATX-168) se identificó el cambio novel *KCND3* c.1117A>G (p.M373V) y en SGT\_1420 (fATX-169) se detectó la variante novel *SPAST* c.1235c>T (p.T412I).
4. El análisis de segregación es una aproximación que permite descartar cambios como posibles mutaciones clínicas de una forma sencilla. Así, se afianzó el resultado en el caso de los probandos SGT\_1437 y SGT\_1420, y se desechó la posibilidad de que los cambios detectados en SGT\_1426 y SGT\_1427 estuvieran implicados en la enfermedad.
5. Respecto al resto de casos con variantes de interés, estudios adicionales son precisos para indagar si realmente estos cambios son mutaciones patológicas, además de que el gen debe estar implicado en un cuadro clínico próximo al del probando que se estudia, y evidentemente, la herencia cuadrar con éste.
6. Las mutaciones *ATM* c.2921+1G>A/c.1899-11C>G, identificadas en el probando SGT\_1191 de la familia fATX\_165, *in silico* fueron predichas como deletéreas y se estableció que cosegregaban con la enfermedad, además de que el cuadro clínico era el que los pacientes de esta familia presentaban.
7. Se ha demostrado mediante el estudio del RNAm del caso índice que ambas mutaciones alteran el *splicing* correcto: c.2921+1G>A conduciría a la creación de dos transcritos (en uno de ellos se ha delecionado el exón 19 y en el otro los exones 18 y 19), y c.1899-11C>G causaría una delección de 41 pb del exón 13.
8. Las mutaciones c.2921+1G>A y c.1899-11C>G originarían una proteína más corta que no podría ejercer su función con normalidad, o incluso podría estar sometida a un proceso de *non-sense mediated decay*.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Aparisi, M. J.; Aller, E.; Fuster-García, C.; García-García, G.; Rodrigo, R.; Vázquez-Manrique, R. P.; ... Millán, J. M. (2014). Targeted next generation sequencing for molecular diagnosis of usher syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 9, 168.
- Bird, T. D. (1998). Hereditary Ataxia Overview. In M. Adam, H. Ardinger, R. Pagon, & E. Al. (Eds.), *GeneReviews® [Internet]*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019.
- Bis-Brewer, D. M.; & Züchner, S. (2018). Perspectives on the genomics of HSP beyond mendelian inheritance. *Frontiers in Neurology*, 9, 958.
- Bosotti, R.; Isacchi, A. & Sonnhammer, E. L. L. . (2000). FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(5), 225–227.
- Cao, L.; Fei, Q.-Z.; Tang, W.-G.; Liu, J.-R.; Zheng, L.; Xiao, Q.; ... Chen, S. D. (2011). Novel mutations in the CYP7B1 gene cause hereditary spastic paraplegia. *Movement Disorders*, 26(7), 1354–1356.
- Cooper, D. N.; Chen, J. M.; Ball, E. V.; Howells, K.; Mort, M.; Phillips, A. D.; ... Stenson, P. D. (2010). Genes, mutations, and human inherited disease at the dawn of the age of personalized genomics. *Human Mutation*, 31(6), 631–655.
- Cooper, H. M.; Yang, Y.; Ylikallio, E.; Khairullin, R.; Woldegebriel, R.; Lin, K. L.; ... Tynjismaa, H. (2017). ATPase-deficient mitochondrial inner membrane protein ATAD3a disturbs mitochondrial dynamics in dominant hereditary spastic paraplegia. *Human Molecular Genetics*, 26(8), 1432–1443.
- Coutelier, M.; Coarelli, G.; Monin, M. L.; Konop, J.; Davoine, C. S.; Tesson, C.; ... Durr, A. (2017). A panel study on patients with dominant cerebellar ataxia highlights the frequency of channelopathies. *Brain*, 140(6), 1579–1594.
- Coutelier, M.; Stevanin, G.; Monin, M. L.; Hammer, M. B. ain.; Davoine, C. S.; Mochel, F.; ... Wood, N. (2018). Efficacy of exome-targeted capture sequencing to detect mutations in known cerebellar ataxia genes. *JAMA Neurology*, 75(5), 591–599.
- D'Amore, A.; Tessa, A.; Casali, C.; Dotti, M. T.; Filla, A.; Silvestri, G.; ... Santorelli, F. M. (2018). Next Generation Molecular Diagnosis of Hereditary Spastic Paraplegias: An Italian Cross-Sectional Study. *Frontiers in Neurology*, 9:981, 1–13.
- Di Fabio, R.; Marcotulli, C.; Tessa, A.; Leonardi, L.; Storti, E.; Pierelli, F.; ... Casali, C. (2014). Sensory ataxia as a prominent clinical presentation in three families with mutations in CYP7B1. *Journal of Neurology*, 261(4), 747–751.
- Duarri, A.; Jezierska, J.; Fokkens, M.; Meijer, M.; Schelhaas, H. J.; den Dunnen, W. F. A.; ... Verbeek, D. S. (2012). Mutations in potassium channel *kcnd3* cause spinocerebellar ataxia type 19. *Annals of Neurology*, 72(6), 870–880.
- Duarri, A.; Lin, M. C. A.; Fokkens, M. R.; Meijer, M.; Smeets, C. J. L. M.; Nibbeling, E. A. R.; ... Verbeek, D. S. (2015). Spinocerebellar ataxia type 19/22 mutations alter heterocomplex Kv4.3 channel function and gating in a dominant manner. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(17), 3387–3399.
- Easton, D. F. (1994). Cancer risks in A-T heterozygotes. *International Journal of Radiation Biology*, 66(sup6), 177–182.

- Elert-Dobkowska, E.; Stepniak, I.; Krysa, W.; Ziora-Jakutowicz, K.; Rakowicz, M.; Sobanska, A.; ... Sulek, A. (2019). Next-generation sequencing study reveals the broader variant spectrum of hereditary spastic paraplegia and related phenotypes. *Neurogenetics*, 20(1), 27–38.
- Eng, L.; Coutinho, G.; Nahas, S.; Yeo, G.; Tanouye, R.; Babaei, M.; ... Gatti, R. A. (2004). Nonclassical Splicing Mutations in the Coding and Noncoding Regions of the ATM Gene: Maximum Entropy Estimates of Splice Junction Strengths. *Human Mutation*, 23(1), 67–76.
- Errico, A.; Ballabio, A.; & Rugarli, E. I. (2002). Spastin, the protein mutated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, is involved in microtubule dynamics. *Human Molecular Genetics*, 11(2), 153–163.
- Fogel, B.; Lee, H.; Deignan, J.; Storm, S.; Kantarci, S.; Wang, X.; ... Nelson, S. (2014). Exome Sequencing in the Clinical Diagnosis of Sporadic or Familial Cerebellar Ataxia. *JAMA Neurology*, 71(10), 1237–1246.
- Galatolo, D.; Tessa, A.; Filla, A. & Santorelli, F. M. (2018). Clinical application of next generation sequencing in hereditary spinocerebellar ataxia: increasing the diagnostic yield and broadening the ataxia-spasticity spectrum. A retrospective analysis. *Neurogenetics*, 19(1), 1–8.
- Gaudet, P.; Livstone, M. S.; Lewis, S. E. & Thomas, P. D. (2011). Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Briefings in Bioinformatics*, 12(5), 449–462.
- Gilad, S.; Khosravi, R.; Shkedy, D.; Uziel, T.; Ziv, Y.; Savitsky, K.; ... Bar-Shira, A. (1996). Predominance of null mutations in ataxia-telangiectasia. *Human Molecular Genetics*, 5(4), 433–439.
- Giudicessi, J. R.; Ye, D.; Tester, D. J.; Crotti, L.; Mugione, A.; Nesterenko, V. V.; ... Ackerman, M. J. (2011). Transient outward current (I<sub>to</sub>) gain-of-function mutations in the KCND3-encoded Kv4.3 potassium channel and Brugada syndrome. *Heart Rhythm*, 8(7), 1024–1032.
- Goizet, C.; Boukhris, A.; Durr, A.; Beetz, C.; Truchetto, J.; Tesson, C.; ... Stevanin, G. (2009). CYP7B1 mutations in pure and complex forms of hereditary spastic paraplegia type 5. *Brain*, 132(6), 1589–1600.
- Hug, N.; Longman, D.; & Cáceres, J. F. (2015). Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic Acids Research*, 44(4), 1483–1495.
- Jacquemin, V.; Rieunier, G.; Jacob, S.; Bellanger, D.; D’Enghien, C. D.; Laugé, A.; ... Stern, M. H. (2012). Underexpression and abnormal localization of ATM products in ataxia telangiectasia patients bearing ATM missense mutations. *European Journal of Human Genetics*, 20(3), 305–312.
- Kara, E.; Tucci, A.; Manzoni, C.; Lynch, D. S.; Elpidorou, M.; Bettencourt, C.; ... Houlden, H. (2016). Genetic and phenotypic characterization of complex hereditary spastic paraplegia. *Brain*, 139(7), 1904–1918.
- Kerr, T. P.; Sewry, C. A.; Robb, S. A.; & Roberts, R. G. (2001). Long mutant dystrophins and variable phenotypes: Evasion of nonsense-mediated decay? *Human Genetics*, 109(4), 402–407.
- Klebe, S.; Stevanin, G.; & Depienne, C. (2015). Clinical and genetic heterogeneity in hereditary spastic paraplegias: From SPG1 to SPG72 and still counting. *Revue Neurologique*, 171(6–7), 505–530.
- Kovacs, G. G. (2017). Concepts and classification of neurodegenerative diseases. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed.) 145, 301-307.



- Kurian, M. A.; Morgan, N. V.; MacPherson, L.; Foster, K.; Peake, D.; Gupta, R.; ... Maher, E. R. (2008). Phenotypic spectrum of neurodegeneration associated with mutations in the PLA2G6 gene (PLAN). *Neurology*, 70(18), 1623–1629.
- Matsui, S.; Takahashi, K.; Mukoyama, Y.; Miyachi, Y.; & Matsuyoshi, N. (2008). Knockdown of Fat2 by siRNA inhibits the migration of human squamous carcinoma cells. *Journal of Dermatological Science*, 51(3), 207–210.
- Meienberg, J.; Bruggmann, R.; Oexle, K.; & Matyas, G. (2016). Clinical sequencing: is WGS the better WES? *Human Genetics*, 135(3), 359–362.
- Miller, J. N. & Pearce, D. A. (2014). Nonsense-mediated decay in genetic disease: Friend or foe? *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 762, 52–64.
- Németh, A. H.; Kwasniewska, A. C.; Lise, S.; Parolin Schnekenberg, R.; Becker, E. B. E.; Bera, K. D.; ... Ragoussis, J. (2013). Next generation sequencing for molecular diagnosis of neurological disorders using ataxias as a model. *Brain*, 136(10), 3106–3118.
- Newman, W. G. & Black, G. C. (2014). Delivery of a clinical genomics service. *Genes*, 5(4), 1001–1017.
- Nibbeling, E. A. R.; Delnoozb, C. C. S.; de Koninga, T. J.; Sinkea, R. J.; Jinnah, H. A.; Tijssen, M. A. J.; & Verbeek, D. S. (2016). Using the shared genetics of dystonia and ataxia to unravel their pathogenesis. *Neurosci Biobehav Rev.*, 75, 22-39.
- Olgati, S.; Quadri, M.; & Bonifati, V. (2016). Genetics of movement disorders in the next-generation sequencing era. *Movement Disorders*, 31(4), 458–470.
- Ouahchi, K.; Makoto, A.; Kayden, H.; Hentati, F.; Hamida, M. B.; Sokol, R.; ... Koenig, M. (1995). Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the alfa-tocopherol transfer protein. *Nature Genetics*, 9(2), 141–145.
- Ozes, B.; Karagoz, N.; Schüle, R.; Rebelo, A.; Harmuth, F.; Synofzik, M.; ... Ordóñez-ugalde, A. (2017). PLA2G6 mutations associated with a continuous clinical spectrum from neuroaxonal dystrophy to hereditary spastic paraplegia. *Clin Genet.*, 92(5), 534–539.
- Pagon, R. A.; Bird, T. D.; Detter, J. C. & Pierce, I. (2008). Hereditary sideroblastic anaemia and ataxia: an X linked recessive disorder. *Journal of Medical Genetics*, 22(4), 267–273.
- Parodi, L.; Coarelli, G.; Stevanin, G.; Brice, A.; & Durr, A. (2018). Hereditary ataxias and paraparesias: Clinical and genetic update. *Current Opinion in Neurology*, 31(4), 462–471.
- Perkins, E. M.; Suminaite, D.; Clarkson, Y. L.; Lee, S. K.; Lyndon, A. R.; Rothstein, J. D.; ... Jackson, M. (2016). Posterior cerebellar Purkinje cells in an SCA5/SPARCA1 mouse model are especially vulnerable to the synergistic effect of loss of  $\beta$ -III spectrin and GLAST. *Human Molecular Genetics*, 25(20), 4448-4461.
- Pillers, D. A. M.; Fitzgerald, K. M.; Duncan, N. M.; Rash, S. M.; White, R. A.; Dwinnell, S. J.; ... Weleber, R. G. (1999). Duchenne/Becker muscular dystrophy: Correlation of phenotype by electroretinography with sites of dystrophin mutations. *Human Genetics*, 105(1–2), 2–9.
- Prodosmo, A.; Buffone, A.; Mattioni, M.; Barnabei, A.; Persichetti, A.; De Leo, A.; ... Soddu, S. (2016). Detection of ATM germline variants by the p53 mitotic centrosomal localization test in BRCA1/2-negative patients with early-onset breast cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 35(1), 135.

- Raraigh, K. S.; Han, S. T.; Davis, E.; Evans, T. A.; Pellicore, M. J.; McCague, A. F.; ... Cutting, G. R. (2018). Functional Assays Are Essential for Interpretation of Missense Variants Associated with Variable Expressivity. *American Journal of Human Genetics*, 102(6), 1062–1077.
- Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; ... Rehm, H. L. (2015). Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–424.
- Rothblum-Oviatt, C.; Wright, J.; Lefton-Greif, M. A.; McGrath-Morrow, S. A.; Crawford, T. O. & Lederman, H. M. (2016). Ataxia-telangiectasia: A review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 11(1), 159.
- Ruano, L.; Melo, C.; Silva, M. C.; & Coutinho, P. (2014). The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: A systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology*, 42(3), 174–183.
- Savitsky, K.; Sfez, S.; Tagle, D. A.; Ziv, Y.; Sartiell, A.; Collins, F. S.; ... Rotman, G. (1995). The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Human Molecular Genetics*, 4(11), 2025–2032.
- Schöls, L.; Rattay, T. W.; Martus, P.; Meisner, C.; Baets, J.; Fischer, I.; ... Schüle, R. (2017). Hereditary spastic paraplegia type 5: Natural history, biomarkers and a randomized controlled trial. *Brain*, 140(12), 3112–3127.
- Sevilla, T.; Lupo, V.; Sivera, R.; Marco-Marín, C.; Martínez-Rubio, D.; Rivas, E.; ... Espinós, C. (2011). Congenital hypomyelinating neuropathy due to a novel MPZ mutation. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 16(4), 347–352.
- Sevilla, T.; Sivera, R.; Martínez-Rubio, D.; Lupo, V.; Chumillas, M. J.; Calpena, E.; ... Espinós, C. (2015). The EGR2 gene is involved in axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *European Journal of Neurology*, 22(12), 1548–1555.
- Stankovic, T.; Kidd, A. M. J.; Sutcliffe, A.; McGuire, G. M.; Robinson, P.; Weber, P.; ... Taylor, A. M. R. (1998). ATM Mutations and Phenotypes in Ataxia-Telangiectasia Families in the British Isles: Expression of Mutant ATM and the Risk of Leukemia, Lymphoma, and Breast Cancer. *The American Journal of Human Genetics*, 62(2), 334–345.
- Starita, L. M.; Ahituv, N.; Dunham, M. J.; Kitzman, J. O.; Roth, F. P.; Seelig, G.; ... Fowler, D. M. (2017). Variant Interpretation: Functional Assays to the Rescue. *American Journal of Human Genetics*, 101(3), 315–325.
- Symoens, S.; Malfait, F.; Vlummens, P.; Hermanns-Lê, T.; Syx, D. & de Paepe, A. (2011). A novel splice variant in the N-propeptide of COL5A1 causes an EDS phenotype with severe kyphoscoliosis and eye involvement. *PLoS ONE*, 6(5), e20121.
- Takahara, K.; Schwarze, U.; Imamura, Y.; Hoffman, G. G.; Toriello, H.; Smith, L. T.; ... Greenspan, D. S. (2002). Order of Intron Removal Influences Multiple Splice Outcomes, Including a Two-Exon Skip, in a COL5A1 Acceptor-Site Mutation That Results in Abnormal Pro- $\alpha$ 1(V) N-Propeptides and Ehlers-Danlos Syndrome Type I. *The American Journal of Human Genetics*, 71(3), 451–465.
- Telatar, M.; Teraoka, S.; Wang, Z.; Chun, H. H.; Liang, T.; Castellvi-Bel, S.; ... Gatti, R. A. (1998). Ataxia-Telangiectasia: Identification and Detection of Founder-Effect Mutations in the ATM Gene in Ethnic Populations. *The American Journal of Human Genetics*, 62(1), 86–97.

- Weile, J.; & Roth, F. P. (2018). Multiplexed assays of variant effects contribute to a growing genotype–phenotype atlas. *Human Genetics*, *137*(9), 665–678.
- Weissbach, A.; Siegesmund, K.; Brüggemann, N.; Schmidt, A.; Kasten, M.; Pichler, I.; ... Lohmann, K. (2012). Exome sequencing in a family with restless legs syndrome. *Movement Disorders*, *27*(13), 1686–1689.
- Wimmer, K.; Roca, X.; Beiglbösch, H.; Callens, T.; Etzler, J.; Rao, A. R.; ... Messiaen, L. (2007). Extensive In Silico Analysis of NF1 Splicing Defects Uncovers Determinants for Splicing Outcome Upon 50 Splice-Site Disruption. *Human Mutation*, *28*(6), 599–612.
- Wright, C. F.; FitzPatrick, D. R.; & Firth, H. V. (2018). Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children. *Nature Reviews. Genetics*, *19*(5), 253–268.
- Xiong, H. Y.; Alipanahi, B.; Lee, L. J.; Bretschneider, H.; Merico, D.; Yuen, R. K. C.; ... Frey, B. J. (2015). RNA splicing. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science*, *347*(6218), 86–114.
- Xue, Y.; Ankala, A.; Wilcox, W. R.; & Hegde, M. R. (2015). Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing: Single-gene, gene panel, or exome/genome sequencing. *Genetics in Medicine*, *17*(6), 444–451.