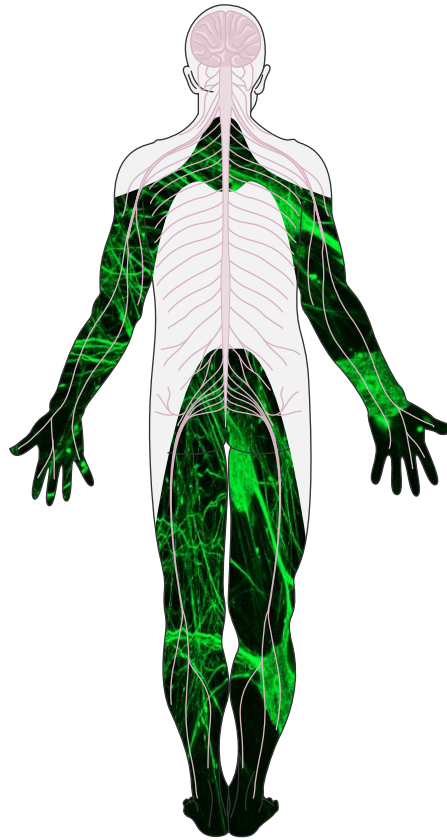


TESIS DOCTORAL

**COMPLEJIDAD GENÉTICA Y
FISIOPATOLOGÍA DE NEUROPATÍAS
HEREDITARIAS SENSITIVO Y/O MOTORAS**

Paula Sancho Salmerón



Dirigida por Carmen Espinós y Vincenzo Lupo

DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA

Junio, 2019



**VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA**



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

Dña. Carmen Espinós Armero, Doctora en Ciencias Biológicas, Investigadora Jefa, y **D. Vincenzo Lupo**, Doctor en Farmacia, Investigador, en la Unidad de Genética y Genómica de Enfermedades Neuromusculares y Neurodegenerativas del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) y **Dña. Elena González Biosca**, Doctora en Ciencias Biológicas y Catedrática de Microbiología de la Universitat de València,

CERTIFICAN:

Que **Dña. Paula Sancho Salmerón**, graduada en Bioquímica y Ciencias Biomédicas por la Universitat de València, ha realizado bajo la codirección de la Dra. Espinós y el Dr. Lupo el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título “Complejidad genética y fisiopatología de neuropatías hereditarias sensitivo y/o motoras”.

Revisado el presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el tribunal correspondiente, para la obtención del grado de Doctor.

En Valencia, a 25 de junio de 2019

Dra. Carmen Espinós Armero

Dr. Vincenzo Lupo

Dña. Paula Sancho Salmerón

Durante la realización de la presente Tesis Doctoral, la autora ha disfrutado de un contrato en el marco del proyecto TREAT-CMT (Ref. IR11/TREAT-CMT), de una beca para Personal Investigador en Formación con Carácter Predoctoral del Programa ValI+D de la Generalitat Valenciana (Ref. ACIF/2015/123) y de una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) (Ref. FPU15/00964) concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Además, la autora ha contado con una beca de Movilidad para Estancias Breves dentro del programa FPU (Ref. EST16/00105) y una ayuda para la Incentivación de la Investigación y la Formación Sanitaria de la Generalitat Valenciana (Ref. APER-03/17), mediante las cuales realizó una estancia de cinco meses en el laboratorio del Dr. Roman Chrast en el Karolinska Institutet (Estocolmo).

Asimismo, el trabajo se ha enmarcado dentro de los siguientes proyectos de investigación:

- “De genes a terapia en enfermedades neurodegenerativas y neuromusculares” (Generalitat Valenciana, Programa Prometeo para grupos de investigación de excelencia; Ref. PROMETEO/2018/135). Consorcio de cinco IPs: Federico V. Pallardó (coordinador), José M. Millán, Teresa Sevilla, Pascual Sanz, Máximo Ibo Galindo y Carmen Espinós.
- “An integrative approach to develop cellular models and characterize disease mechanisms implicated in CMT2Z, a newly described axonal form of neuropathy”, (AFM-Téléthon; Ref. AFM/21500). IP: Carmen Espinós; Co-IP: Roman Chrast.
- “Whole exome sequencing for clarification of rare causes of axonal Charcot-Marie-Tooth disease” (2016 BBMRI-LPC Whole Exome Sequencing Call). IP: Carmen Espinós; Co-IP: Pavel Seeman.
- “Caracterización de MORC2, nexo de unión de neuropatías hereditarias sensitivo-motoras” (Fundación Ramón Areces; Ref. CIVP17A2810). IP: Carmen Espinós.
- “Avanzar en el diagnóstico, la prognosis y la terapia de enfermedades neurodegenerativas raras” (Instituto de Salud Carlos III; Ref. PI15/00187). IP: Carmen Espinós.
- “Investigación traslacional y mecanismos de enfermedad en neuropatías periféricas hereditarias” (Instituto de Salud Carlos III; Ref. PI12/00453). IP: Carmen Espinós.
- “TREAT-CMT: Translational Research, Experimental Medicine and Therapeutics on Charcot-Marie-Tooth disease” (Instituto de Salud Carlos III & International Rare Diseases Research Consortium (IRDIRC); Ref. IR11/TREAT-CMT). Consorcio de 12 grupos coordinado por Francesc Palau; Partner: Carmen Espinós.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, mis amigos y mis compañeros de trabajo por haberme aguantado en mis peores días y por haberme dado razones por las que continuar en este viaje.

- **A mis directores, Carmina y Vincenzo.** Carmina, gracias por confiar en mí desde aquel día de octubre de 2012, cuando dejamos la ciencia para mover muebles. Te he conocido en momentos de gloria y en momentos de flaqueza, y éstos últimos me han hecho darme cuenta que aunque las relaciones madre-hija nunca son fáciles, no cambio a mi madre científica por ninguna otra. Vincenzo, gracias por compartir conmigo esos momentos de delirio científico desenfundado y por enseñarme a no tirar la toalla en los viernes de desilusiones experimentales.

- **A mi compañera y amiga, Lola.** Has sido mi consejera científica y terapeuta favorita. No eres consciente del bien que me hace tenerte cerca. Gracias por aguantarme.

- **A la meua amiga, Ana D.** Per ser la meua companya favorita de patiments tòxics. Gràcies per donar-me les forces que no tenia als pitjors moments.

- **A mis amigas Paloma, Paula y Sandra.** Por inspirarme sin imponerme, por motivarme sin ahogarme, por removerme sin anularme, por impulsarme sin empujarme. En definitiva, por enseñarme el verdadero significado de la palabra amistad.

- **A mi amiga, Inma.** Juntas empezamos a escribir este camino allá por 2009 y juntas lo acabaremos 10 años después. La vida no te está poniendo el camino fácil pero tú siempre sacas lo bueno de todo. Gracias por no soltarme nunca de la mano.

- **A la meua padrina, M. José.** Per fer de mi una persona millor. Per ensenyar-me que malgrat el que vinga, un somriure sempre és el millor complement.

- **A mi tía, Magda.** Por ti he aprendido a amar la ciencia y los gatos. Me has ayudado a ver el lado irónico de la vida, a analizar pausadamente las situaciones y a respirar ante las adversidades. Gracias por ser mi pilar cuando todo se derrumba.

- **A Ángeles, Noelia y Jose.** Por acogerme como a una más, quererme y apoyarme siempre.

- **A mis hermanos, Rober y Àlex.** Por ser mi (mejor) pesadilla.

- **A mon pare.** Em donares dues grans premisses, la primera hui no és ahir ni és demà, per tant, fes que hui compte. La segon, eres lliure d'elegir per tu mateixa. Ara entenc que aquestes dos no tenen sentit sense una tercera: aprendràs quan t'equivoques. Malgrat que el temps passe ràpid, per a mi no deixes de ser l'home que em cantava "*A esa muchacha que fue piel de manzana*" de Serrat cada nit.

- **Y a ti, Josema.** En tu caso me resulta fácil escribir ya que a tu lado he aprendido lo más importante; AMAR LA VIDA ES AMARTE A TI. Gracias por ser, por estar, por compartir, por soñar a mi lado. Y ésto no acaba más que empezar.

"I som on som; més val saber-ho i dir-ho i assentar els peus en terra i proclamar-nos hereus d'un temps de dubtes i renúncies en què els sorolls ofeguen les paraules i amb molts miralls mig estrefem la vida. De res no ens val l'enyor o la complanta, ni el toc de displicent malenconia que ens posem per jersei o per corbata quan sortim al carrer. Tenim a penes el que tenim i prou: l'espai d'història concreta que ens pertoca, i un minúscul territori per viure-la. Posem-nos dempeus altra vegada i que se sentí la veu de tots solemnement i clara. Cridem qui som i que tothom ho escolti. I en acabat, que cadascú es vesteixi com bonament li plagui, i via fora!, que tot està per fer i tot és possible."

[Miquel Martí i Pol]

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	1
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN GENERAL	5
I.1. Neuropatías periféricas hereditarias	7
I.2. Fisiopatología y heterogeneidad genética asociada a los genes CMT	11
CAPÍTULO 1: “DE LA CLÍNICA A LA MUTACIÓN: BASES GENÉTICAS DE NEUROPATÍAS PERIFÉRICAS HEREDITARIAS”	19
C1.1. Introducción	21
C1.1.1. Diagnóstico genético de neuropatías periféricas hereditarias	21
C1.1.2. Mutaciones descritas en el gen <i>AIFM1</i>	24
C1.1.3. Mutaciones descritas en el gen <i>MME</i>	26
C1.2. Hipótesis y objetivos	29
C1.3. Resultados	31
C1.3.1. Bases genéticas de familias CMT/NMHD	31
C1.3.1-1. Familia fCMT_376	31
C1.3.1-2. Familia fCMT_433	35
C1.3.1-3. Familia fCMT_436	40
C1.3.1-4. Familia fCMT_441	42
C1.3.1-5. Familia fCMT_443	45
C1.3.2. Análisis <i>in vitro</i> de la mutación novel <i>AIFM1</i> c.629T>C (p.F210S)	47
C1.3.2-1. Modelado de la estructura 3D de AIF p.F210S	47
C1.3.2-2. Caracterización de fibroblastos derivados del paciente SGT_361	48
C1.3.2-2A. Estudio de la ultraestructura celular	48
C1.3.2-2B. Estudio de localización e integridad proteica de AIF	49
C1.3.2-2C. Ensayo de supervivencia: viabilidad y apoptosis	50
C1.3.2-2D. Caracterización cuantitativa y cualitativa mitocondrial	52
C1.3.3. Análisis <i>in vitro</i> de mutaciones en el gen <i>MME</i>	54
C1.3.3-1. Estudio de localización subcelular de neprilisina	54
C1.3.3-2. Ensayo de la función proteolítica de neprilisina	56
C1.4. Discusión	58
C1.4.1. Complejidad del diagnóstico genético de neuropatías periféricas	58
C1.4.2. Estudio funcional de <i>AIFM1</i> c.629T>C (p.F210S) en cultivo de fibroblastos de paciente	66
C1.4.3. Mutaciones en el gen <i>MME</i>: localización y funcionalidad de neprilisina	69
C1.5. Conclusiones	73
CAPÍTULO 2: “DE LAS BASES MOLECULARES AL FENOTIPO CELULAR Y BIOQUÍMICO: FISIOPATOLOGÍA DE CMT2Z”	75
C2.1. Introducción	77
C2.1.1. <i>MORC2</i> y CMT2Z	77
C2.1.2. Funciones de las proteínas MORC	79

C2.1.2-1. Funciones de MORC1, MORC3 y MORC4.....	79
C2.1.2-2. Funciones de MORC2.....	80
C2.2. Hipótesis y objetivos.....	82
C2.3. Resultados.....	83
C2.3.1. Cribado mutacional de <i>MORC2</i>	83
C2.3.2. Análisis de las isoformas transcripcionales del gen <i>MORC2</i>	86
C2.3.3. Estudio del efecto de la variante <i>MORC2</i> c.754C>T sobre el procesamiento del mRNA.....	88
C2.3.4. Estudio de expresión espacio-temporal de <i>Morc2/MORC2</i>	91
C2.3.4-1. Tejidos murinos.....	91
C2.3.4-2. Biopsia de piel.....	93
C2.3.5. Análisis de la localización subcelular de MORC2.....	95
C2.3.6. Ensayo ATPasa de MORC2.....	99
C2.3.7. Perfiles transcriptómicos asociados a CMT2Z.....	100
C2.3.7-1. Transcriptómica de fibroblastos derivados de pacientes.....	100
C2.3.7-2. Transcriptómica de neuronas sensoriales de rata.....	104
C2.4. Discusión.....	110
C2.4.1. Espectro genético de CMT2Z.....	110
C2.4.2. Expresión de MORC2 en tejido nervioso.....	111
C2.4.3. Las mutaciones p.S87L y p.R252W y la localización subcelular de MORC2.....	113
C2.4.4. Las mutaciones p.S87L y p.R252W y la disminución de actividad ATPasa..	114
C2.4.5. La mutación p.S87L y la inflamación axonal.....	115
C2.4.6. Las mutaciones p.S87L y p.R252W y la alteración del transcriptoma	117
C2.4.7. Fisiopatología CMT2Z: modelos propuestos.....	119
C2.5. Conclusiones.....	123
MATERIAL Y MÉTODOS.....	125
M1. Material biológico.....	127
M1.1. <i>Escherichia coli</i> DH5 α	127
M1.2. Órganos, tejidos y extractos de ratón.....	127
M1.3. DRGs y neuronas sensoriales de rata.....	128
M1.4. Vectores lentivirales.....	129
M1.5. Líneas celulares.....	129
M1.6. Biopsias de piel humana.....	129
M1.7. Cultivo de fibroblastos y cortes histológicos derivados de biopsia de piel.....	131
M1.8. RNA humano derivado de DRGs y médula espinal.....	131
M2. Métodos moleculares.....	132
M2.1. Extracción y purificación de DNA plasmídico.....	132
M2.2. Extracción de DNA genómico.....	132
M2.3. Cuantificación de DNA genómico y plasmídico.....	132
M2.4. Amplificación de DNA mediante PCR.....	133
M2.5. Extracción y cuantificación de RNA.....	133

M2.6. Síntesis de cDNA.....	134
M2.7. PCR cuantitativa.....	134
M2.8. Vectores, subclonaciones y mutagénesis dirigida.....	134
M2.9. Transfecciones transitorias y líneas celulares.....	135
M2.10. Silenciamiento génico mediante si-RNA.....	136
M2.11. Ensayos de inmunofluorescencia.....	136
M2.12. Obtención de extractos proteicos totales.....	137
M2.13. Obtención de extractos proteicos nucleares.....	138
M2.14. Cuantificación de extractos proteicos, SDS-PAGE y WB.....	138
M3. Análisis de genes/proteínas mutadas.....	139
M3.1. Análisis de viabilidad celular y apoptosis en fibroblastos.....	139
M3.2. Estudio de la morfología mitocondrial en fibroblastos.....	139
M3.3. Ensayo de la actividad proteolítica de neprilisina.....	140
M3.4. Análisis genético de <i>MORC2</i> en pacientes CMT2 sin diagnóstico.....	141
M3.5. Análisis de las isoformas transcripcionales del gen <i>MORC2</i>	141
M3.6. Estudio del efecto de la variante <i>MORC2</i> c.754C>T sobre el procesamiento del mRNA mediante ensayo de minigenes.....	141
M3.7. Ensayo ATPasa de <i>MORC2</i>	142
M3.8. Análisis de inflamación axonal causada por mutaciones en <i>MORC2</i>	143
M3.9. Análisis estadístico empleado en los ensayos funcionales.....	143
M4. Estudios ómicos.....	143
M4.1. Filtrado de resultados derivados de secuenciación de exoma.....	143
M4.2. Análisis del transcriptoma asociado a la fisiopatología de CMT2Z.....	144
ANEXOS	145
APÉNDICE	173
BIBLIOGRAFÍA	175

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

aa	Aminoácido
AChE	<i>Acetylcholinesterase</i>
AD	Autosómico dominante
AED	Atrofia espinal distal
AG	Aparato de Golgi
AME	Atrofia muscular espinal
AMPc	AMP cíclico
AR	Autosómico recesivo
BSA	Albúmina de suero bovino
CC	<i>Coiled-coil</i>
CD	Cromo-dominio
cDNA	DNA complementario
CMT	Charcot-Marie-Tooth
CNV	<i>Copy number variation</i>
cRNA	RNA complementario
C-ter	Carboxi-terminal
CW	<i>Zinc binding</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
gDNA	DNA genómico
pDNA	DNA plasmídico
DRG	<i>Dorsal root ganglion</i>
EA1	<i>Episodic ataxia type 1</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGA	<i>European genome-phenome archive</i>
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
ET	Endosomas tempranos
EX	Día embrionario X
FC	<i>Fold change</i>
FrdU	Fluorodeoxiuridina
GABA	<i>Gamma-aminobutyric acid</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GHL	<i>Gyrase B, Hsp90, MutL</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptors</i>
H3K9me3	Trimetilación en la lisina 9 de la histona 3
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HS	<i>Horse serum</i>
HUSH	<i>Human silencing hub</i>
IMS	<i>Mitochondrial intermembrane signal</i>
kb	Kilobase
KO	<i>Knock-out</i>
LB	Luria Bertani
MAF	<i>Minor allele frequency</i>
MGC	<i>Mammalian gene collection</i>
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MLS	<i>Mitochondrial localization signal</i>
MP	Membrana plasmática
mRNA	RNA mensajero
nAChR	<i>Nicotinic acetylcholine receptor</i>
NBB	<i>Netherlands Brain Bank</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NDR1	<i>National Disease Research Interchange</i>
NEP	Neprilisina
NFH	Neurofilamento pesado
NFL	Neurofilamento ligero

NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NM	Neuromiotonía
NMH	Neuropatía motora hereditaria
NMHd	Neuropatía motora hereditaria distal
NPHs	Neuropatías periféricas hereditarias
NS	No significativo
NSAH	Neuropatía sensitivo-autonómica hereditaria
NSH	Neuropatía sensitiva hereditaria
NSMH	Neuropatía sensitivo-motora hereditaria
NSMHO	Neuropatía sensitivo-motora hereditaria de Okinawa
N-ter	Amino-terminal
OCT	<i>Optimal cutting temperature compound</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
OXPPOS	<i>Oxidative phosphorylation</i>
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCA	<i>Principal component analysis</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pen/Strep	<i>Penicillin/Streptomycin</i>
PFA	Paraformaldehído
PI	<i>Propidium iodide</i>
PNA	Péptido natriurético articular
PNMHH	<i>Peripheral neuropathy, myopathy, hoarseness, and hearing loss</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
PX	Día postnatal X
Pβ-A	Péptido β-ameloide
RBP	<i>RNA binding protein</i>
RE	Retículo endoplasmático
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RT-PCR	<i>Real time PCR</i>
SCAN2	Ataxia espinocerebelar con neuropatía asociada tipo 2
SGGT	Servicio de Genética y Genómica Traslacional
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SLC	<i>Solute carrier</i>
SN	Sistema nervioso
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SNS	Sistema nervioso somático
TA	Temperatura ambiente
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline and Tween 20</i>
TM	Transmembrana
TMEM	<i>Transmembrane member</i>
TTP	Tetraplejía
UTR	<i>Untranslated region</i>
v/v	Volumen/volumen
VCN	Velocidad de conducción nerviosa
WB	<i>Western blot</i>
WES	<i>Whole exome sequencing</i>
WGS	<i>Whole genome sequencing</i>
WLD	<i>Wallerian degeneration slow</i>
WT	<i>Wild type</i>
XD	Ligado al X dominante
XR	Ligado al X recesivo
ZNF	<i>Zinc finger</i>

RESUMEN

CAPÍTULO 1

“De la clínica a la mutación: Bases genéticas de neuropatías periféricas hereditarias”

Las neuropatías periféricas hereditarias comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades monogénicas degenerativas que afectan al sistema nervioso periférico y están producidas por mutaciones en más de 100 genes. El descubrimiento de nuevos genes y/o mutaciones es de vital importancia para comprender el mecanismo de enfermedad y con ello, lograr el desarrollo de estrategias terapéuticas. Mediante secuenciación de exoma, se han investigado las bases genéticas en cinco familias y hemos establecido la mutación causal en dos de ellas, atribuyendo un nuevo fenotipo clínico al gen *KCNA1* y asociando por primera vez el gen *CADM4* con enfermedad humana. En línea con esto, el desarrollo de ensayos experimentales es indispensable para confirmar o descartar el posible papel patológico de nuevas mutaciones. Hemos demostrado mediante estudios *in vitro* de fibroblastos de paciente, que la mutación novel c.629C>T (p.F210S) en el gen *AIFM1*, se asocia por primera vez a un fenotipo clínico de neuropatía hereditaria motora distal con inicio en la infancia, concluyendo que las células presentan una expresión disminuida de la proteína AIF, una morfología celular anómala y una red mitocondrial fragmentada. Adicionalmente, el estudio del impacto patológico causado por la sobreexpresión de mutaciones clínicas del gen *MME*, ha demostrado que la localización subcelular y la actividad enzimática son procesos dañados en la fisiopatología de la forma CMT2T.

CAPÍTULO 2

“De las bases moleculares al fenotipo celular y bioquímico: Fisiopatología de CMT2Z”

Mutaciones en el gen *MORC2* con herencia autosómica dominante causan una de las formas más comunes de CMT axonal, CMT2Z. A pesar de que las bases genéticas están claramente establecidas, el papel de *MORC2* en nervio periférico así como el efecto de las mutaciones clínicas, se desconoce. Respecto a la funcionalidad de *MORC2* en sistema nervioso periférico, hemos establecido cuál es la isoforma canónica en tejido nervioso humano; hemos indagado sobre la expresión diferencial de la proteína y el mRNA en tejidos murinos durante el desarrollo, observando una expresión regulada espacio-temporalmente; y hemos determinado su expresión en axón, células de Schwann y regiones ab-axonales en cortes de

nervio ciático. En cultivo de neuronas sensoriales de rata, hemos detectado que la presencia de *axonal swellings* para p.R252W, la mutación más frecuente, era similar al control, cuando para p.S87L era anormalmente elevada, lo que podría explicar la clínica más grave asociada a esta última mutación. En células HeLa, p.R252W muestra una disminución no significativa de la actividad ATPasa, mientras p.S87L presenta una pérdida drástica de actividad enzimática. Mediante estudios transcriptómicos en fibroblastos derivados de pacientes CMT2Z y en modelos neuronales murinos, hemos detectado la expresión alterada de genes *ZNF* y genes homeobox. Además, en el modelo murino, también la expresión de receptores de neurotransmisores estaba alterada. En su conjunto, el análisis de estos resultados, para las mutaciones p.R252W y p.S87L en particular y para la fisiopatología de CMT2Z en general, conduce por primera vez a la propuesta de dos vías de afectación neuronal: el transporte intracelular y la comunicación interneuronal.

INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. Neuropatías periféricas hereditarias

El sistema nervioso (SN) se divide en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). El SNC está formado por el cerebro y la médula espinal, mientras que el SNP está constituido por 12 nervios craneales y 31 pares nerviosos medulares que conectan la información que proviene del SNC con el resto del organismo. Asimismo, el SNP se subdivide en dos partes: el sistema nervioso autónomo (SNA) y el sistema nervioso somático (SNS). El SNA es el responsable de controlar las funciones corporales involuntarias y está formado por el sistema simpático que lleva a cabo las respuestas que requieren una acción inmediata y por el sistema parasimpático, encargado de mantener la homeostasis corporal en estados basales. El SNS es el encargado de enviar y recibir desde el SNC la información controlada por la voluntad. Dada la naturaleza bidireccional del SNS, éste está formado de neuronas eferentes o motoras (desde SNC hasta la fibra muscular), por neuronas aferentes o sensitivas (desde las terminaciones nerviosas de los nervios periféricos hasta el SNC) y por neuronas mixtas (motoras y sensitivas, bidireccionales) (Sousa *et al.*, 2017).

Atendiendo a la causa primaria, podemos distinguir entre neuronopatías cuando la afectación inicial ocurre en el soma neuronal, y neuropatías si se ve afectado inicialmente el axón neuronal (Barohn and Amato, 2013). Las neuronopatías suelen subdividirse en neuronopatías motoras (afectan a neuronas motoras) o neuronopatías sensitivas (también llamadas ganglionopatías, afectan a neuronas sensitivas), mientras que, las neuropatías se pueden subdividir entre mielinopatías, cuando afectan a la estructura y/u organización de las vainas de mielina, y axonopatías, cuando afectan exclusivamente al axón neuronal (**Figura I.1**).

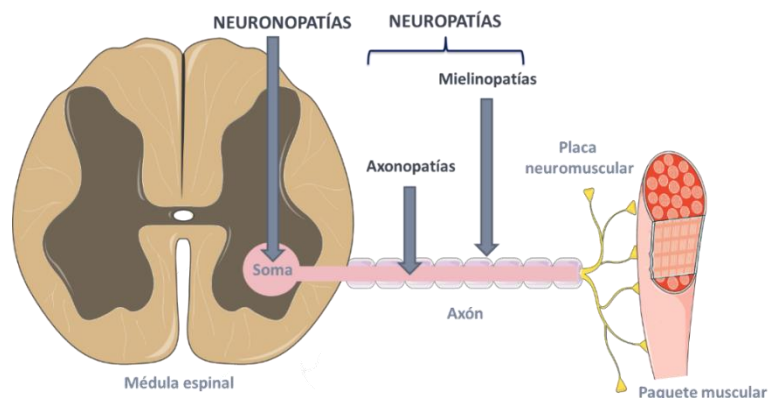


Figura I.1. Causa primaria de neuronopatías y neuropatías.

Las neuropatías periféricas son todas aquellas patologías de etiología genética (neuropatías periféricas hereditarias; NPHs) o adquirida que afectan al SNP. Las NPHs representan un grupo clínico y genéticamente muy heterogéneo de patologías degenerativas, pudiendo ser clasificadas en función de su base genética y/o sus características neurofisiológicas. En función de la naturaleza de los nervios implicados, una NPH puede subdividirse en: neuropatía sensitivo-autonómica hereditaria (NSAH, afectación de los nervios sensitivos del SNS y al SNA), neuropatía sensitiva hereditaria (NSH, afectación exclusiva de los nervios sensitivos del SNS), neuropatía motora hereditaria (NMH, afectación exclusiva de los nervios motores del SNS) y neuropatía sensitivo-motora hereditaria (NSMH, afectación tanto de los nervios motores como de los nervios sensitivos del SNS) (Dyck P and Lambert EH, 1968; Thomas and Harding, 1993).

La clasificación de las NPHs resulta compleja debido a que, a veces, el fenotipo de una NSMH de predominio motor se solapa con una forma distal puramente motora (NMHd), y en algunos casos también puede confundirse con algunas neuronopatías (AME, atrofia muscular espinal; ELA, esclerosis lateral amiotrófica) (Garg *et al.*, 2017). La diferencia entre estas cuatro entidades clínicas reside principalmente en el origen del daño:

- ELA: Neuronopatía monogénica u oligogénica. Habitualmente afecta a la primera o segunda motoneurona y cursa con una rápida progresión distal y proximal. Como signo característico, los pacientes pueden presentar alteraciones respiratorias y disfagia.
- AME: Neuronopatía monogénica. Afecta a la segunda motoneurona y cursa con una debilidad progresiva lenta de predominio proximal.
- NMHd: También conocida como atrofia espinal distal (AED), es una axonopatía monogénica. Afecta sólo a la segunda motoneurona produciendo debilidad lentamente progresiva y de predominio distal.
- NSMH: También conocida como neuropatía de Charcot-Marie-Tooth (CMT), constituye un grupo de patologías que incluye mielinopatías y/o axonopatías monogénicas. Afecta tanto a nervios motores como sensitivos, produciendo debilidad lentamente progresiva de predominio distal, y proximal en algunos casos.

Con una prevalencia mundial estimada entre 10 y 40 afectados de cada 100.000 individuos (Skre, 1994; Pareyson and Marchesi, 2009), la neuropatía de CMT constituye la forma más común de NPH. Fue descrita en 1886 de forma simultánea por los investigadores Jean-Martin Charcot y Pierre de Marie (París, Francia) y Howard Henry Tooth (Londres, Reino Unido). La patología suele comenzar antes de la segunda década de vida y generalmente, muestra una evolución lenta y progresiva. Clínicamente se caracteriza por una debilidad a nivel distal y/o proximal acompañada de atrofia de extremidades y pérdida muscular, arreflexia (ausencia de reflejo muscular), pérdida de equilibrio o alteraciones en la marcha. Habitualmente la afectación inicial es de predominio motor involucrando a las extremidades inferiores, por lo que entre los primeros signos clínicos está la debilidad de la musculatura en piernas y deformidades en los pies (**Figura I.2**). De forma gradual, en algunas formas de CMT, las extremidades superiores se ven también afectadas, primero la parte más distal (manos en garra) y finalmente, la parte más proximal (antebrazos y, a veces, hombros). Con la progresión de la enfermedad, los nervios sensitivos resultan también dañados, provocando dolor muscular y pérdida de sensibilidad de las extremidades (vibración, tacto y dolor). Los pacientes pueden llegar a tener incapacidad de la marcha y necesitar sillas de rueda o cirugía ortopédica para mejorar su calidad de vida.

En ocasiones, además, la pérdida sensorial propioceptiva puede agravarse en una ataxia sensorial (Pareyson and Marchesi, 2009; Saporta *et al.*, 2011; Rossor *et al.*, 2012).



Figura I.2. Deformaciones esqueléticas en pacientes CMT. [Adaptación de Pareyson and Marchesi, *The lancet neurology*; 2009]. (A, B) Pérdida muscular en las piernas. (C, D, E) Deformaciones de los pies, incluyendo pies cavos (C), dedos en martillo (D) y callosidades en la planta del pie (E). (F) Atrofia de manos (manos en garra).

Desde el punto de vista electrofisiológico e histopatológico, la neuropatía de CMT se clasifica en dos grupos principales: CMT1 o desmielinizante, y CMT2 o axonal. La velocidad de conducción nerviosa (VCN) en personas sanas oscila entre 50 y 60 m/s. Así, CMT1 se caracteriza por VCNs sumamente reducidas (< 38 m/s) mientras que CMT2 cursa con VCNs normales o levemente disminuidas (> 38 m/s). Por otro lado, la biopsia de nervio sural en pacientes con CMT1 muestra procesos de desmielinización y remielinización que provocan la generación de estructuras anómalas conocidas como “bulbos de cebolla”, mientras que pacientes con CMT2 presentan pérdida importante del número de axones (**Figura I.3**) (Dyck P and Lambert EH, 1968; Thomas, 1980; Thomas and Harding, 1993; Pareyson and Marchesi, 2009; Saporta *et al.*, 2011). A pesar de que los “bulbos de cebolla” son estructuras clásicas de biopsias de nervio de pacientes CMT1, también se han identificado en algunos pacientes CMT2 (Sevilla *et al.*, 2016). Además, se considera un tercer subtipo con características comunes a CMT1 y CMT2: CMT intermedio (CMTI). En pacientes CMTI, electrofisiológicamente se detectan VCNs intermedias entre CMT1 y CMT2 (de entre 25 y 45 m/s), e histopatológicamente se identifican tanto alteraciones en la mielinización (CMT1), como pérdida axonal (CMT2) (Liu and Zhang, 2014; Berciano *et al.*, 2017). Desde el punto de vista de prevalencia, CMT1 afecta a ~18-30 de cada 100.000 individuos, mientras que CMT2 afecta a ~7-10 de cada 100.000 individuos. En cambio, CMTI es extraordinariamente raro y sólo se identifica en un 1-2% de pacientes CMT (Berciano *et al.*, 2017).

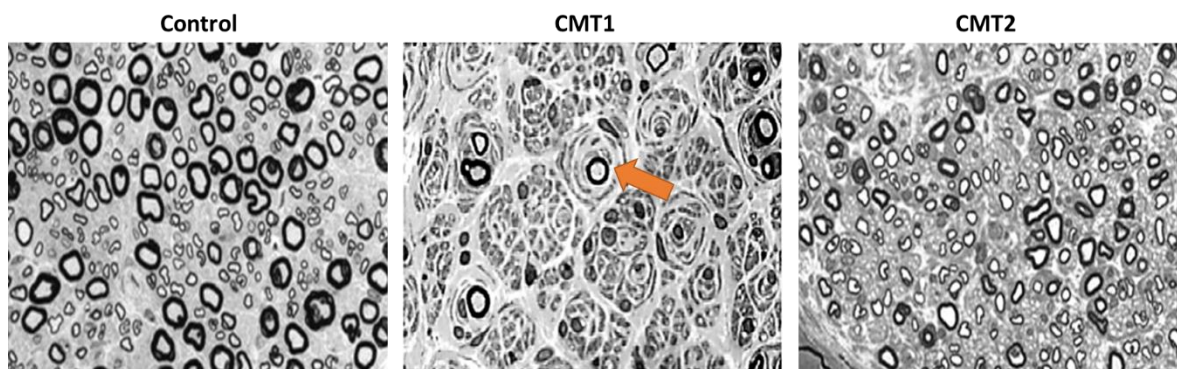


Figura I.3. Estudio histopatológico de nervio sural en pacientes CMT. Biopsia de nervio sural de paciente CMT1 con duplicación del gen *PMP22* [Adaptación de Wтила and Balarabe, *Journal of neurological sciences*; 2015] y de paciente CMT2 con mutación en el gen *IGHMBP2* [Adaptación de Cottenie *et al.*, *American journal of human genetics*; 2014]. La flecha señala una anomalía de la mielina conocida como “bulbo de cebolla”.

I.2. Fisiopatología y heterogeneidad genética asociada a los genes CMT

En las neuronas existen diferentes procesos bioquímicos que controlan el funcionamiento de los nervios periféricos, entre ellos: la regulación de canales iónicos de naturaleza excitatoria/inhibitoria, la liberación de neurotransmisores a nivel presináptico o el control de la densidad de receptores postsinápticos (Yin and Yuan, 2015). El papel de las células de Schwann en el SNP, no sólo queda restringido a la protección y al aislamiento de los axones periféricos en un estado basal, sino que ejercen importantes funciones en los procesos de regeneración tras daño, tales como: control de la respuesta inflamatoria o impulso del crecimiento y la supervivencia de axones regenerados (Arthur-Farraj *et al.*, 2012; Fontana *et al.*, 2012; Stierli *et al.*, 2018). Además, existen otros mecanismos de regulación previos que están implicados en el control de la homeostasis del nervio periférico, como por ejemplo, la respiración y dinámica mitocondrial, el tráfico y reciclaje de receptores de membrana o el metabolismo del DNA/RNA y de las proteínas.

La patogenicidad subyacente a CMT está relacionada con la alteración de diferentes mecanismos y rutas importantes para el mantenimiento del SNP, puesto que los genes implicados son muchos y codifican para proteínas con funciones diversas. Del mismo modo, se han identificado mutaciones en genes que se expresan tanto en el soma neuronal y axones como en células de Schwann (Patzkó and Shy, 2011; Rossor *et al.*, 2013; Harel and Lupski, 2014).

De entre las funciones celulares en las cuales se han identificado mutaciones en genes que conducen a CMT se encuentran: dinámica mitocondrial (**Tabla I.1**), estructura y regulación de la mielina (**Tabla I.2**), procesamiento de proteínas (**Tabla I.3**) y de mRNA (**Tabla I.4**), transporte axonal (**Tabla I.5**), metabolismo lipídico (**Tabla I.6**), control de canales iónicos y metabolismo de calcio (**Tabla I.7**), regulación del citoesqueleto (**Tabla I.8**), transmisión sináptica (**Tabla I.9**) o señalización celular y tráfico endosomal (**Tabla I.10**). A pesar de que la mayoría de genes están clasificados dentro de una ruta fisiopatológica específica, todavía quedan algunos de los cuales se desconoce su función en nervio periférico, como por ejemplo: *MORC2*, cuyas mutaciones causan CMT2Z (MIM 616688); *MME*, cuyas mutaciones causan CMT2T (MIM 617017); *NAGLU*, cuyas mutaciones causan CMT2V (MIM 616491) o el gen *SPG11*, cuyas mutaciones causan CMT2X (MIM 616668), ELA juvenil subtipo 5 (MIM 602099) o paraplejia espástica subtipo 11 (MIM 604360).

Tabla I.1. Genes, patrones de herencia y fenotipos clínicos asociados a proteínas implicadas en dinámica mitocondrial.

Gen	Herencia	Proteína	Fenotipo clínico
<i>AIFM1</i>	XR	<i>Apoptosis-inducing factor</i>	<i>Cowchock syndrome</i>
<i>COX6A1</i>	AR	<i>Cytochrome C oxidase subunit 6-A1</i>	CMT1
<i>DHTKD1</i>	AD	<i>Dehydrogenase E1 and transketolase domains-containing protein 1</i>	CMT2
<i>GDAP1</i>	AR/AD	<i>Ganglioside induced differentiation-associated protein 1</i>	CMT1/CMT2 /CMT1
<i>HK1</i>	AR	<i>Hexokinase 1</i>	CMT1
<i>MFN2</i>	AD/AR	<i>Mitofusin 2</i>	CMT2/NMHd
<i>PDK3</i>	XD	<i>Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 3</i>	CMT1
<i>SLC25A46</i>	AR	<i>Solute carrier family 25 member 46</i>	NMHd
<i>SURF1</i>	AR	<i>Surfeit 1</i>	CMT1

XR: herencia recesiva ligada al X; AR: herencia autosómica recesiva; AD: herencia autosómica dominante; CMT1/2/I: Charcot-Marie-Tooth desmielinizante, axonal o intermedio; NMHd: neuropatía motora hereditaria distal.

Tabla I.2. Genes, patrones de herencia y fenotipos clínicos asociados a proteínas implicadas en estructura y regulación de la mielina.

Gen	Herencia	Proteína	Fenotipo clínico
<i>DRP2</i>	XR	<i>Dystrophin 2</i>	CMT1
<i>EGR2</i>	AD	<i>Early growth response 2</i>	CMT1
<i>MPZ</i>	AD/AR	<i>Myelin protein zero</i>	CMT1/CMT2/CMTI
<i>PMP2</i>	AD	<i>Peripheral myelin protein 2</i>	CMT1
<i>PMP22</i>	AD	<i>Peripheral myelin protein 22</i>	CMT1

XR: herencia recesiva ligada al X; AR: herencia autosómica recesiva; AD: herencia autosómica dominante; CMT1/2/I: Charcot-Marie-Tooth desmielinizante, axonal o intermedio.

Tabla I.3. Genes, patrones de herencia y fenotipos clínicos asociados a proteínas implicadas en el procesamiento de proteínas.

Gen	Herencia	Proteína	Fenotipo clínico
<i>BSCL2</i>	AD	<i>Seipin</i>	NMHd
<i>CCT5</i>	AR	<i>Chaperonin containing T-complex polypeptide 1 subunit 5</i>	NSH + paraplegia espástica
<i>DNAJB2</i>	AR	<i>DNA-J/Hsp40 homolog, subfamily B, member 2</i>	CMT2/NMHd
<i>HSPB1</i>	AD	<i>Heat shock protein beta 1</i>	CMT2/NMHd
<i>HSPB3</i>	AD	<i>Heat shock protein beta 3</i>	NMHd
<i>HSPB8</i>	AD	<i>Heat shock protein beta 8</i>	CMT2/NMHd
<i>LITAF/SIMPLE</i>	AD	<i>Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha</i>	CMT1
<i>LRSAM1</i>	AR/AD	<i>Leucine-rich repeat and sterile alpha motif containing 1</i>	CMT2
<i>MPZ</i>	AD/AR	<i>Myelin protein zero</i>	CMT1/CMT2/CMTI
<i>PMP22</i>	AD	<i>Peripheral myelin protein 22</i>	CMT1
<i>REEP1</i>	AD	<i>Receptor expression-enhancing protein 1</i>	NMHd
<i>TRIM2</i>	AR	<i>Tripartite motif-containing protein 2</i>	CMT2
<i>VCP</i>	AD	<i>Valosin-containing protein</i>	CMT2/ELA

AR: herencia autosómica recesiva; AD: herencia autosómica dominante; CMT1/2/I: Charcot-Marie-Tooth desmielinizante, axonal o intermedio; NMHd: neuropatía motora hereditaria distal; AME: atrofia muscular espinal; NSH: neuropatía sensitiva hereditaria; ELA: esclerosis lateral amiotrófica.

Tabla I.4. Genes, patrones de herencia y fenotipos clínicos asociados a proteínas implicadas en el procesamiento del mRNA.

Gen	Herencia	Proteína	Fenotipo clínico
<i>AARS</i>	AD	<i>Alanyl-tRNA synthetase</i>	CMT2
<i>DNMT1</i>	AD	<i>DNA methyltransferase 1</i>	NMHd
<i>GARS</i>	AD	<i>Glycyl-tRNA synthetase</i>	CMT2/NMHd
<i>HARS</i>	AD	<i>Histidyl-tRNA synthetase</i>	CMT2
<i>HINT1</i>	AR	<i>Histidine triad nucleotide-binding protein 1</i>	CMT2
<i>IGHMBP2</i>	AR	<i>Immunoglobulin mu-binding protein 2</i>	CMT2/NMHd
<i>KARS</i>	AR	<i>Lysyl-tRNA synthetase</i>	CMTI
<i>LMNA</i>	AR	<i>Lamin A/C</i>	CMT2
<i>MARS</i>	AD	<i>Methionyl-tRNA synthetase</i>	CMT2
<i>MED25</i>	AR	<i>Mediator complex subunit 25</i>	CMT2
<i>PLEKHG5</i>	AR	<i>Pleckstrin homology domain and RhoGEF domain- containing protein G5</i>	CMTI/AME
<i>PRPS1</i>	XR	<i>Phosphoribosylpyrophosphate synthetase 1</i>	CMT2
<i>SETX</i>	AR/AD	<i>Senataxin</i>	SCAN2/ELA
<i>TFG</i>	AD	<i>TRK-fused gene</i>	NSMHO
<i>YARS</i>	AD	<i>Tyrosyl-tRNA synthetase</i>	CMTI

XR: herencia recesiva ligada al X; AR: herencia autosómica recesiva; AD: herencia autosómica dominante; CMT1/2/I: Charcot-Marie-Tooth desmielinizante, axonal o intermedio; NMHd: neuropatía motora hereditaria distal; AME: atrofia muscular espinal; SCAN2: ataxia espino-cerebelar con neuropatía asociada tipo 2; ELA: esclerosis lateral amiotrófica; NSMHO: neuropatía motora y sensitiva hereditaria de Okinawa.

Tabla I.5. Genes, patrones de herencia y fenotipos clínicos asociados a proteínas implicadas en transporte axonal.

Gen	Herencia	Proteína	Fenotipo clínico
<i>DCTN1</i>	AD	<i>Dynactin 1</i>	NMHd
<i>DCTN2</i>	AD	<i>Dynactin 2</i>	CMTI
<i>DYNC1H1</i>	AD	<i>Dynein, cytoplasmic 1, heavy chain 1</i>	CMT2/AME
<i>HSPB1</i>	AD	<i>Heat shock protein beta 1</i>	CMT2/NMHd
<i>HSPB3</i>	AD	<i>Heat shock protein beta 3</i>	NMHd
<i>HSPB8</i>	AD	<i>Heat shock protein beta 8</i>	CMT2/NMHd
<i>KIF1A</i>	AR	<i>Kinesin family member 1B</i>	NMHd
<i>KIF1B</i>	AD	<i>Kinesin family member 1A</i>	CMT2
<i>MYH14</i>	AD	<i>Myosin heavy chain 14</i>	PNMHH
<i>NEFH</i>	AD	<i>Neurofilament protein, heavy polypeptide</i>	CMT2
<i>NEFL</i>	AR/AD	<i>Neurofilament protein, light polypeptide</i>	CMT1/CMT2/CMTI

AR: herencia autosómica recesiva; AD: herencia autosómica dominante; CMT1/2/I: Charcot-Marie-Tooth desmielinizante, axonal o intermedio; NMHd: neuropatía motora hereditaria distal; AME: atrofia muscular espinal; PNMHH: *peripheral neuropathy, myopathy, hoarseness, and hearing loss*.

Tabla I.6. Genes, patrones de herencia y fenotipos clínicos asociados a proteínas implicadas en metabolismo de lípidos.

Gen	Herencia	Proteína	Fenotipo clínico
<i>ARHGEF10</i>	AD	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor 10</i>	CMT1
<i>DGAT2</i>	AD	<i>Diacylglycerol acyltransferase 2</i>	CMT2

AD: herencia autosómica dominante; CMT1/2/I: Charcot-Marie-Tooth desmielinizante o axonal.

Tabla I.7. Genes, patrones de herencia y fenotipos clínicos asociados a proteínas implicadas en el control de canales iónicos y el metabolismo del calcio.

Gen	Herencia	Proteína	Fenotipo clínico
<i>GDAP1</i>	AR/AD	<i>Ganglioside induced differentiation-associated protein 1</i>	CMT1/CMT2 /CMTI
<i>GJB1</i>	XD	<i>Gap junction protein beta 1/ Connexin 32</i>	CMT2z
<i>GJB3</i>	AR	<i>Gap junction protein beta 3/ Connexin 31</i>	NSH + sordera
<i>TRPV4</i>	AD	<i>Transient receptor potential cation channel, subfamily 5, member 4</i>	NMHd/AME

XD: herencia dominante ligada al X; AR: herencia autosómica recesiva; AD: herencia autosómica dominante; CMT1/2/I: Charcot-Marie-Tooth desmielinizante, axonal o intermedio; NSH: neuropatía sensitiva hereditaria; NMHd: neuropatía motora hereditaria distal; AME: atrofia muscular espinal.

Tabla I.8. Genes, patrones de herencia y fenotipos clínicos asociados a proteínas implicadas en la organización del citoesqueleto.

Gen	Herencia	Proteína	Fenotipo clínico
<i>FBLN5</i>	AD	<i>Fibulin 5</i>	CMT1
<i>FGD4</i>	AR	<i>Frabin</i>	CMT1
<i>INF2</i>	AD	<i>Inverted formin 2</i>	CMTI
<i>NEFH</i>	AD	<i>Neurofilament protein, heavy polypeptide</i>	CMT2
<i>NEFL</i>	AR/AD	<i>Neurofilament protein, light polypeptide</i>	CMT1/CMT2/CMTI
<i>PRX</i>	AR	<i>Periaxin</i>	CMT1

AR: herencia autosómica recesiva; AD: herencia autosómica dominante; CMT1/2/I: Charcot-Marie-Tooth desmielinizante, axonal o intermedio.

Tabla I.9. Genes, patrones de herencia y fenotipos clínicos asociados a proteínas implicadas en la transmisión sináptica.

Gen	Herencia	Proteína	Fenotipo clínico
<i>DCTN1</i>	AD	<i>Dynactin 1</i>	NMHd
<i>DCTN2</i>	AD	<i>Dynactin 2</i>	CMTI
<i>SLC5A7</i>	AD	<i>Solute carrier family 5 (choline transporter) member 7</i>	NMHd

AD: herencia autosómica dominante; CMTI: Charcot-Marie-Tooth intermedio; NMHd: neuropatía motora hereditaria distal.

Tabla I.10. Genes, patrones de herencia y fenotipos clínicos asociados a proteínas implicadas en señalización celular y tráfico endosomal.

Gen	Herencia	Proteína	Fenotipo clínico
<i>DNM2</i>	AD	<i>Dynamin 2</i>	CMT2/CMTI
<i>FIG4</i>	AR/AD	FIG4	CMT1/ELA
<i>GNB4</i>	AD	<i>Guanine nucleotide-binding protein, beta 4</i>	CMTI
<i>LITAF/SIMPLE</i>	AD	<i>Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha</i>	CMT1
<i>MTMR2</i>	AR	<i>Myotubularin-related protein 2</i>	CMT1
<i>NDRG1</i>	AR	<i>Nmyc downstream-regulated gene 1</i>	CMT1
<i>RAB7A</i>	AD	<i>RAS-associated protein 7A</i>	CMT2
<i>SBF1</i>	AR	<i>SET-binding factor 1</i>	CMT1
<i>SBF2</i>	AR	<i>SET-binding factor 2</i>	CMT1
<i>SH3TC2</i>	AR	<i>SH3 domain and tetratricopeptide repeat domain 2</i>	CMT1
<i>SIGMAR1</i>	AR	<i>Sigma nonopioid intracellular receptor 1</i>	NMHd/ELA

AR: herencia autosómica recesiva; AD: herencia autosómica dominante; CMT1/2/I: Charcot-Marie-Tooth desmielinizante, axonal o intermedio; NMHd: neuropatía motora hereditaria distal; ELA: esclerosis lateral amiotrófica.

Dentro de las neuropatías, los genes asociados a las formas CMT2 de predominio motor son los que mayoritariamente contribuyen también a la clínica de NMHd. En menor medida, estas formas motoras puras se pueden solapar también con algunas formas de neuronopatías como AME o ELA, resaltando la complejidad inherente a este tipo de enfermedades y dificultando enormemente la clasificación clínica y el posterior diagnóstico genético. El solapamiento genético y fenotípico de este grupo de trastornos sugiere que podrían compartir procesos patológicos comunes, pudiendo estar relacionados con la autofagia y el metabolismo mitocondrial (Lee *et al.*, 2012; Pareyson *et al.*, 2015; Bermúdez-Guzmán and Leal, 2019).

El control de la degradación de proteínas mal plegadas por parte de orgánulos celulares como el proteasoma o los autofagosomas son mecanismos vitales para la supervivencia celular en general y para la homeostasis de las células de Schwann en particular, donde una pérdida de estos procesos supone una mielinización aberrante (Lee *et al.*, 2012). En la enfermedad de CMT, principalmente en la forma desmielinizante, existen diferentes ejemplos de mutaciones que inducen un plegamiento proteínico incorrecto y una activación de la maquinaria de degradación celular. El subtipo CMT1C, causado por mutaciones en el gen *LITAF/SIMPLE*, provoca una acumulación anómala de la proteína mal plegada en el citoplasma de las células de Schwann (Lee *et al.*, 2011). También, en los subtipos más frecuentes de CMT1, CMT1A (mutaciones en *PMP22*) y CMT1B (mutaciones en *MPZ*), se ha identificado una deslocalización de las proteínas sintetizadas generando

gránulos citoplasmáticos en las células de Schwann (Fontanini *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). En el caso de las proteínas LITAF, PMP22 y MPZ, el incorrecto plegamiento inducido por las mutaciones clínicas, provoca la activación de las chaperonas del retículo endoplásmico donde intentarán corregir la estructura tridimensional de las mismas. La imposibilidad de enmendar el error por parte de las chaperonas, provoca una salida de las proteínas al citoplasma donde el proteasoma se encargará de degradarlas cuando se encuentren en forma monomérica. No obstante, la funcionalidad del proteasoma puede verse afectada por exceso de proteínas mal plegadas, acumulándose las mismas en oligómeros tóxicos citoplasmáticos e induciendo un descenso de la mielinización llevada a cabo por las células de Schwann (Fortun *et al.*, 2005). Pero no sólo en este punto se ve afectada la funcionalidad de las células de Schwann, ya que PMP22, LITAF o MPZ acumuladas en el citoplasma, son incluidas en autofosomas donde se induce su degradación por la vía autofágica lisosomal. El excesivo funcionamiento de esta vía de degradación, puede producir la muerte de las células de Schwann (Lee *et al.*, 2012). A pesar de haberse estudiado el mecanismo de acción de este tipo de aberraciones estructurales en CMT1, también se han reportado casos de proteínas que actúan en estos procesos que cuando están mutadas causan diferentes subtipos de CMT2 o NMHd. Ejemplo de ello, mutaciones en *heat shock proteins* (HSPs) que participan en el plegamiento de las proteínas, como HSPB1, HSPB3, HSPB8 o DNAJB2, o mutaciones en la chaperona CCT5 (**Tabla I.3**). Todo esto apoya el papel vital del control de la dinámica estructural de proteínas en la fisiopatología de estas enfermedades.

Por otro lado, la homeostasis del nervio periférico requiere de una cantidad exacerbada de energía focalizada en diversas regiones subaxonales, tales como los conos de crecimiento o los terminales sinápticos (Sajic *et al.*, 2013), por lo que la alteración del metabolismo energético y la localización de las mitocondrias parecen ser procesos clave en la neurodegeneración subyacente a este grupo de patologías (Pareyson *et al.*, 2015; Bermúdez-Guzmán and Leal, 2019). De hecho, se han identificado mutaciones responsables de varios tipos de CMT implicadas en el control de la dinámica mitocondrial (proceso de fusión-fisión controlada), en el transporte de las mismas desde el soma hasta la sinapsis o en enzimas responsables del metabolismo energético. De entre los ejemplos más comunes; genes que orquestan la dinámica mitocondrial (*MFN2*, *GDAP1*), genes responsables del transporte anterógrado (*KIF1A*, *KIF1B*) o retrógrado (*DYNC1H1*), genes que contribuyen al funcionamiento de la respiración mitocondrial durante la obtención de ATP (*AIFM1*, *COX6A1*, *DHTKD1*, *HK1*, *PDK3*), así como genes implicados en la arquitectura del citoesqueleto en el transporte mitocondrial (*NEFH*, *NEFL*, *HSPB1*, *HSPB8*, *HSPB3*,

DNAJB2) (Bermúdez-Guzmán and Leal, 2019). Aunque la causa primaria sea la deficiencia metabólica ocasionada por la alteración mitocondrial, las consecuencias celulares posteriores son diversas, incluyendo citotoxicidad por calcio intracelular, daño oxidativo o apoptosis (Sheng and Cai, 2012). Todo esto refuerza la hipótesis del deterioro mitocondrial como vía primordial en el mantenimiento del nervio periférico y su implicación en este grupo de patologías.

CAPÍTULO 1

“DE LA CLÍNICA A LA MUTACIÓN: BASES GENÉTICAS DE NEUROPATÍAS PERIFÉRICAS HEREDITARIAS”

C1.1. Introducción

C1.1.1. Diagnóstico genético de neuropatías periféricas hereditarias

Desde la secuenciación completa del genoma humano (Craig Venter *et al.*, 2001; Lander *et al.*, 2001), el desarrollo de las tecnologías de secuenciación masiva (NGS; *next generation sequencing*), tales como la secuenciación del genoma completo (WGS; *whole genome sequencing*) o el exoma (WES; *whole exome sequencing*), ha permitido identificar las variantes genéticas responsables de muchas patologías humanas (Ng *et al.*, 2010 *a, b*). Previamente al desarrollo de las técnicas de NGS, la causa genética subyacente a las NPHs se investigaba mediante aproximaciones clásicas como estudios de ligamiento y cartografiado genómico, clonación posicional o análisis de gen candidato. De esta manera, se estableció el locus para la mutación más frecuente en CMT, que consiste en una duplicación de 1,5 Mb en el cromosoma 17p12-p11.2 que contiene el gen *PMP22* y es la causa principal de la forma CMT1A (MIM 118220) (Lupski *et al.*, 1991; Hoogendijk *et al.*, 1992). Gracias a los avances en los estudios genéticos mediante el desarrollo de tecnologías NGS, en la actualidad se han identificado mutaciones en más de 100 genes como causantes de NPHs (*Neuromuscular Disease Center*; <https://neuromuscular.wustl.edu/>). Respecto al tipo de variantes genéticas asociadas a estas neuropatías, se han descrito mutaciones puntuales que provocan cambios de aminoácido (*missense*) o generan codones de parada (*nonsense*), pequeñas deleciones e inserciones que pueden producir alteraciones en la secuencia aminoacídica con cambio en la pauta de lectura (*frameshift*) o sin él (*inframe del/ins*). También se han descrito variantes sinónimas en los exones codificantes y cambios intrónicos que pueden afectar el procesamiento transcripcional del RNA mensajero (mRNA) (*splicing*). Adicionalmente, alteraciones del número de copias (CNVs, *copy number variations*) se han identificado en genes CMT, destacando la mutación más frecuente en esta neuropatía, la duplicación CMT1A (Lupski *et al.*, 1991; Hoogendijk *et al.*, 1992).

La heterogeneidad clínica de las NPHs es muy amplia y esto es debido a que existen mecanismos patológicos que son comunes a los genes asociados a las distintas formas de esta enfermedad. Por ello, durante el diagnóstico diferencial algunas formas de NMHd o algunos tipos axonales de CMT (CMT2) de predominio motor se solapan con neuronopatías como AME o ELA, cuando hay presencia de signos piramidales u otros que involucran al SNC. En particular, las dos patologías que presentan mayor similitud clínica y además, comparten un número notable de genes, son CMT2 y NMHd (Rossor *et al.*, 2012; Bansagi

et al., 2017). A modo de ejemplo, mutaciones en el gen *HSPB1* causan CMT2F (MIM 606595) y NMHd IIB (MIM 608634), mutaciones en *IGHMBP2* causan CMT2S (MIM 616155) y NMHd VI (MIM 604320), o mutaciones en el gen *GARS* son responsables de CMT2D (MIM 601472) y de NMHd VA (MIM 600794). En particular, la sintomatología referida a pacientes CMT2 comienza prácticamente en todos los casos con afectación motora y con el progreso de la neurodegeneración se ven involucrados los nervios sensitivos, lo que es un rasgo distintivo entre CMT2 y NMHd. No obstante, también se han descrito pacientes de una misma familia, y por tanto con idéntica mutación causal, que cursan indistintamente con clínica CMT2 o NMHd (Dierick *et al.*, 2008; Frasquet *et al.*, 2016). Por ello, pese a las diferencias clínicas o de pronóstico que se pudieran observar, en cuanto al diagnóstico genético, ambas entidades deberían ser consideradas como un único grupo CMT2/NMHd (Bansagi *et al.*, 2017; Garg *et al.*, 2017).

Respecto al porcentaje de éxito diagnóstico, en una serie americana de 530 pacientes CMT (434 CMT1 y 96 CMT2) se obtuvo el diagnóstico molecular en 426 pacientes CMT1 (98,2%) y en 33 CMT2 (34,4%) (Saporta *et al.*, 2011). Resultados similares se obtuvieron en una serie inglesa compuesta por 417 pacientes CMT (240 CMT1, 115 CMT2 y 62 CMTI); en este último caso, se logró el diagnóstico molecular en 193 pacientes CMT1 (80,4%), 29 CMT2 (25,2%) y 37 CMTI (59,7%) (Murphy *et al.*, 2012). Por último, en una serie española compuesta por 438 pacientes CMT (275 CMT1 y 163 CMT2), se halló la mutación causal en 267 pacientes CMT1 (97%) y en 102 CMT2 (63%) (Sivera *et al.*, 2013). Así, de forma global, entre un 80% y un 98,2% de pacientes CMT1 han sido diagnosticados genéticamente (Saporta *et al.*, 2011; Murphy *et al.*, 2012; Sivera *et al.*, 2013). En cambio, en las tres grandes series clínicas de CMT publicadas sólo se ha identificado la mutación causal entre 25,2 y un 63% de casos CMT2 (Saporta *et al.*, 2011; Murphy *et al.*, 2012; Sivera *et al.*, 2013). Aún más acusado es el número de pacientes NMHd que permanecen sin diagnóstico genético, ya que en las dos series publicadas el éxito en el diagnóstico ha sido de 20% (Rossor *et al.*, 2012) y 32,5% (Bansagi *et al.*, 2017). Todo esto resalta la necesidad de profundizar en la caracterización de las bases moleculares subyacentes a CMT2/NMHd, con el objetivo de conseguir completar el puzle de genes implicados en este grupo de patologías.

Las aproximaciones de NGS mayoritariamente utilizadas en el diagnóstico molecular son tres: panel de genes, WES y WGS. Los paneles de genes han proporcionado una cobertura más alta suponiendo un menor coste económico en comparación con las técnicas WES y WGS. Hoy en día, sin embargo, la reducción de costes económicos y las mejoras

tecnológicas, hacen que estas herramientas comiencen a ser equiparables. La ventaja fundamental de los paneles de genes es la menor complejidad en el tratamiento informático de los datos brutos, pudiendo lograr un diagnóstico genético de forma relativamente rápida. Obviamente, la limitación de los paneles de genes radica en la imposibilidad de detectar cambios en nuevos genes que pudieran ser causantes de la patología en cuestión. En el caso de enfermedades con una alta heterogeneidad genética, como las NPHs, en ocasiones los resultados obtenidos mediante paneles de genes no son concluyentes a la hora de establecer un diagnóstico genético. En este caso, el análisis por WES es una herramienta potente que permite analizar todas las bases exónicas codificantes del genoma, asociadas y no asociadas a patología. Cada vez más, hay una tendencia a sustituir el estudio de panel de genes por WES, en cuyo diseño se enriquece la cobertura de los genes de interés. A pesar de que la WES abarca sólo el 1-2% del genoma humano, es de destacar que, los exones codificantes albergan el 90% de las mutaciones patológicas (Cooper *et al.*, 2010). Las limitaciones del empleo de la WES en el diagnóstico genético de NPHs, básicamente son tres: aumento de complejidad en el tratamiento de datos, desigualdad de cobertura intragénica, e imposibilidad de detectar grandes reordenamientos génicos y mutaciones en secuencias no codificantes. El aumento de secuencias leídas (respecto al panel de genes), va acompañado de un incremento en la complejidad informática, alargando los tiempos de análisis. Además, a pesar de la mejora global de cobertura, existe todavía una desigualdad de cobertura base-dependiente (los primeros exones codificantes pueden verse afectados por su alto porcentaje en bases nucleotídicas pirimidínicas). Otras de las limitaciones de la WES están relacionadas directamente con los fundamentos de su técnica, ya que no permite identificar variantes intrónicas profundas o en secuencias promotoras/reguladoras no codificantes que pudieran ser responsables de la patología en cuestión. Por todo ello, la WGS se consideraría una herramienta de NGS más informativa que la WES (Meienberg *et al.*, 2016), pero hoy en día todavía muy costosa para ser implementada en los laboratorios como prueba diagnóstica de rutina. Consecuentemente, en el diagnóstico molecular de NPHs y en general en enfermedades mendelianas con heterogeneidad genética, se suele primero llevar a cabo el análisis genético mediante panel de genes o directamente WES enriquecido en los genes asociados. En el caso de que no se obtengan resultados concluyentes, se puede hacer un estudio más exhaustivo mediante WES completo o incluso, WGS.

En el análisis de resultados de WES, el establecimiento de un diagrama de flujo para llegar a tener un filtrado óptimo es complicado. De entre las pautas a seguir en el filtrado de

variantes candidatas se encuentran: establecer la novedad del cambio contrastando la información con bases de datos de WES/WGS poblacionales; identificar niveles de expresión del gen en SN y su relación con enfermedad humana; analizar mediante herramientas *in silico* la patogenicidad de la variante en la estructura proteica y/o en el *splicing*; y lo que es imprescindible, realizar análisis de segregación. Tras este proceso, son necesarios estudios funcionales complementarios que avalen la implicación del gen y/o la variante con la enfermedad cuando se trata de una mutación novel.

C1.1.2. Mutaciones descritas en el gen *AIFM1*

La familia fCMT_437, supervisada en el Hospital U. La Paz de Madrid, consta de dos hermanos que padecen NMHd (**Figura C1.II**). En el probando (SGT_361) identificamos en hemizigosis la mutación novel c.629C>T (p.F210S) en el gen *AIFM1*, mediante un panel de genes de diseño propio dirigido al estudio de pacientes con CMT y NMHd (panel Neuro_104, **Anexo 1**). El análisis de segregación mostró que tanto la madre (SGT_364) como el hermano (SGT_362) son portadores del cambio en heterozigosis y hemizigosis, respectivamente, mientras que el padre (SGT_363) no lo tiene; es decir, la variante *AIFM1* c.629C>T cosegrega con la enfermedad con una herencia recesiva ligada al cromosoma X (XR).

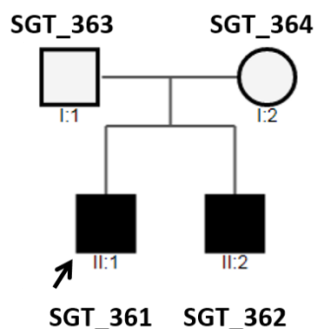


Figura C1.II. Árbol genealógico de la familia fCMT_437. La flecha señala el probando.

Mutaciones en el gen *AIFM1* han sido previamente asociadas a diferentes patologías con herencia XR, tales como; deficiencia combinada de la fosforilación oxidativa (MIM 300816), sordera tipo 5 (MIM 300614) o síndrome de Cowchock, también llamado CMTX4 (MIM 310490). Dentro del espectro clínico causado por mutaciones en *AIFM1*, la sintomatología, la edad de aparición, la gravedad y la progresión, varían en función de la mutación (Ghezzi *et al.*, 2010; Berger *et al.*, 2011; Kettwig *et al.*, 2015; Zong *et al.*, 2015; Sevrioukova, 2016). Respecto a la clínica asociada a CMTX4, los pacientes cursan con neuropatía motora, sordera y deterioro cognitivo (Cowchock *et al.*, 1985; Rinaldi *et al.*, 2012). En el caso aquí reportado, los hermanos de la familia fCMT_437 no presentaban sordera ni alteraciones en el SNC, describiéndose un nuevo fenotipo asociado a mutaciones en el gen *AIFM1*. Recientemente, se han publicado dos mutaciones más cuya clínica tampoco involucra al SNC: c.630C>G (p.P210L) y c.513G>A (p.M171I) (Hu *et al.*, 2017;

Wang *et al.*, 2018). La mutación p.P210L se localiza en el mismo aminoácido que la identificada en la familia fCMT_437 pero induce un cambio a leucina, en vez de a serina. En este caso, el paciente presentaba una NSMH de inicio tardío, diferenciándose de nuestra familia en el debut de la sintomatología y en la afectación sensitiva (Hu *et al.*, 2017). A la mutación p.M171I, se le atribuye un fenotipo de neuropatía sensitivo-motora de progresión lenta e inicio en la primera década de vida (Wang *et al.*, 2018).

El gen *AIFM1* codifica la oxidorreductasa AIF dependiente del cofactor FAD que interviene en la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y en la inducción de la apoptosis independiente de caspasas. En este último proceso, tras un estímulo apoptótico, AIF se desplaza desde la mitocondria al núcleo donde provoca la condensación de la cromatina y la degradación del DNA (Susin *et al.*, 1996; Daugas *et al.*, 2000; Bidere *et al.*, 2003; Yacoub *et al.*, 2006; Diodato *et al.*, 2015). La proteína AIF, de 613 aminoácidos, contiene cuatro tipos de dominios funcionales: MLS (*mitochondrial localization signal*), IMS (*mitochondrial intermembrane signal*), FAD y NADH (**Figura C1.I2**). Los dominios de interacción con FAD (contenidos entre los residuos aminoacídicos 128-262 y 400-480) y el dominio de interacción con NADH (262-400 aminoácidos) son utilizados para llevar a cabo su función apoptótica y se asocian además, con el mantenimiento oxidativo mitocondrial. La mutación p.F210S afecta el residuo aminoacídico fenilalanina en la posición 210 (F210) de la proteína, dentro del primer dominio de interacción con el cofactor FAD (**Figura C1.I2**).

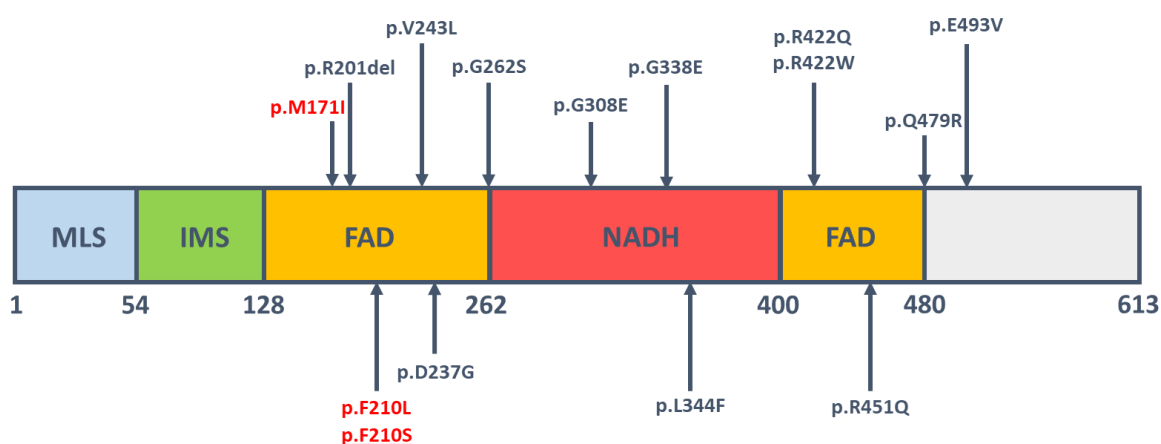


Figura C1.I2. Representación esquemática de la estructura proteica de AIF y distribución de las mutaciones descritas en pacientes con neuropatías. En rojo, las mutaciones descritas en pacientes con afectación exclusiva de SNP, y subrayada, la mutación identificada en la familia fCMT_437.

C1.1.3. Mutaciones descritas en el gen *MME*

Mutaciones bialélicas en el gen *MME* han sido identificadas en una cohorte de 10 familias japonesas con diagnóstico clínico de CMT2 de inicio tardío con herencia autosómica recesiva (AR) (Higuchi *et al.*, 2016). En una serie de pacientes con fenotipo variable de inicio tardío (CMT2, AME y ataxia sensorial) se identificaron 12 mutaciones en el gen *MME* en 28 familias (Auer-Grumbach *et al.*, 2016). Sin embargo, en este último trabajo, todas las variantes estaban en heterocigosis, sugiriendo un patrón de herencia autosómico dominante (AD). En su conjunto, el hallazgo de un número relevante de casos en diferentes poblaciones, estableció un nuevo tipo de CMT2 causado por mutaciones en el gen *MME* transmitidas tanto de forma AR como AD: CMT2T (MIM 617017). En paralelo, una nueva forma de ataxia espinocerebelosa con neuropatía (SCA43; MIM 617018) se describía asociada a mutaciones en *MME* con herencia AD (Depondt *et al.*, 2016). En nuestro laboratorio, el estudio mediante panel de genes dirigido al estudio de pacientes con CMT y NMHd (panel Neuro_111; **Anexo 1**) nos llevó a la identificación de 11 mutaciones distintas en homocigosis o heterocigosis compuesta, que segregaban con un modo de herencia AR en nueve familias con CMT2 de inicio tardío (**Anexo 2**, Lupo *et al.*, 2018). De los 11 cambios, cinco producirían un cambio de aminoácido (p.P556S, p.A658T, p.N689K, p.H712Y y p.R748W), mientras los otros seis conducían a la generación de un codón de parada prematuro (p.W24*, p.R448*, p.T77Lfs*, c.196+1G>A, p.P156Lfs* y p.W750Gfs*).

El gen *MME* codifica la metaloendopeptidasa neprilisina (NEP) perteneciente a la familia de las metaloproteasas M13 dependientes de zinc. La estructura proteica consta de tres dominios: uno transmembrana (TM) y dos peptidasa. Las mutaciones conocidas hasta la fecha están distribuidas a lo largo de toda la proteína (**Figura C1.I3**), lo que es sugestivo de una herencia AR. En general, la distribución aleatoria de las mutaciones en la estructura proteica se relaciona con herencia AR, mientras que la acumulación de mutaciones en un mismo dominio funcional, se atribuye a una pérdida de actividad y herencia AD (Sivley *et al.*, 2018).

NEP se ancla a membrana a través de su pequeño dominio TM situado en la región amino-terminal (N-ter) y generalmente se le atribuyen funciones extracelulares involucradas con la proteólisis de péptidos. La estructura tridimensional por cristalografía de rayos X ha establecido que el fragmento extracelular genera una cavidad con el motivo aminoacídico HEXXH, vital para la unión a zinc y para la proteólisis llevada a cabo por NEP (Moss *et al.*, 2018). La región extracelular, además incluye dos dominios proteasa que hidrolizan péptidos en regiones ricas en residuos hidrofóbicos (Hersh and Morihara, 1986). Se han descrito

múltiples sustratos de NEP, entre ellos; insulina, encefalina, sustancia P, bradiquinina, endotelina 1, péptido natriurético articular (PNA) ó péptido β -Amiloide (P β -A) (Skidgel *et al.*, 1984; Howell *et al.*, 1995; Kerr and Kenny, 2015).

La proteólisis del P β -A, establece una relación estrecha entre NEP y modelos murinos de Alzheimer, enfermedad caracterizada por acumulaciones anómalas de P β -A en cerebro. En dichos modelos, se establece que la proteólisis llevada a cabo por NEP es clave en la degradación del P β -A (Iwata *et al.*, 2000, 2005). Sin embargo, no se ha demostrado la relación directa de *MME* con Alzheimer en humanos, de hecho, todos los pacientes descritos en las series CMT2T japonesa y española no presentaban síntomas de la enfermedad (Higuchi *et al.*, 2016; Lupo *et al.*, 2018).

Por otro lado, y también en relación a patología humana, NEP juega un papel fundamental en el control de la homeostasis sanguínea, renal y pulmonar, ya que degrada proteínas como la sustancia P, encefalina o PNA. En este caso, la degradación de estos péptidos induce alteraciones en la presión sanguínea y/o desarrolla procesos inflamatorios (Kerr and Kenny, 2015). Por ello, la inhibición de la proteólisis mediada por NEP es diana farmacológica de agentes analgésicos y antihipertensivos (Venugopal, 2003; Oefner *et al.*, 2004; Sahli *et al.*, 2005).

Finalmente, NEP, también nombrada CD10, se ha visto involucrada en diferentes tipos de cáncer. De forma que, en melanoma se relaciona la sobreexpresión de CD10 con un aumento de velocidad en la progresión del tumor (Velazquez *et al.*, 2007). Además, la presencia de NEP (CD10+) es considerada como marcador positivo en el diagnóstico de algunos cánceres, como linfoma difuso de células B grandes (Xu *et al.*, 2001; Fabiani *et al.*, 2004) ó cáncer renal (Yasir *et al.*, 2012).

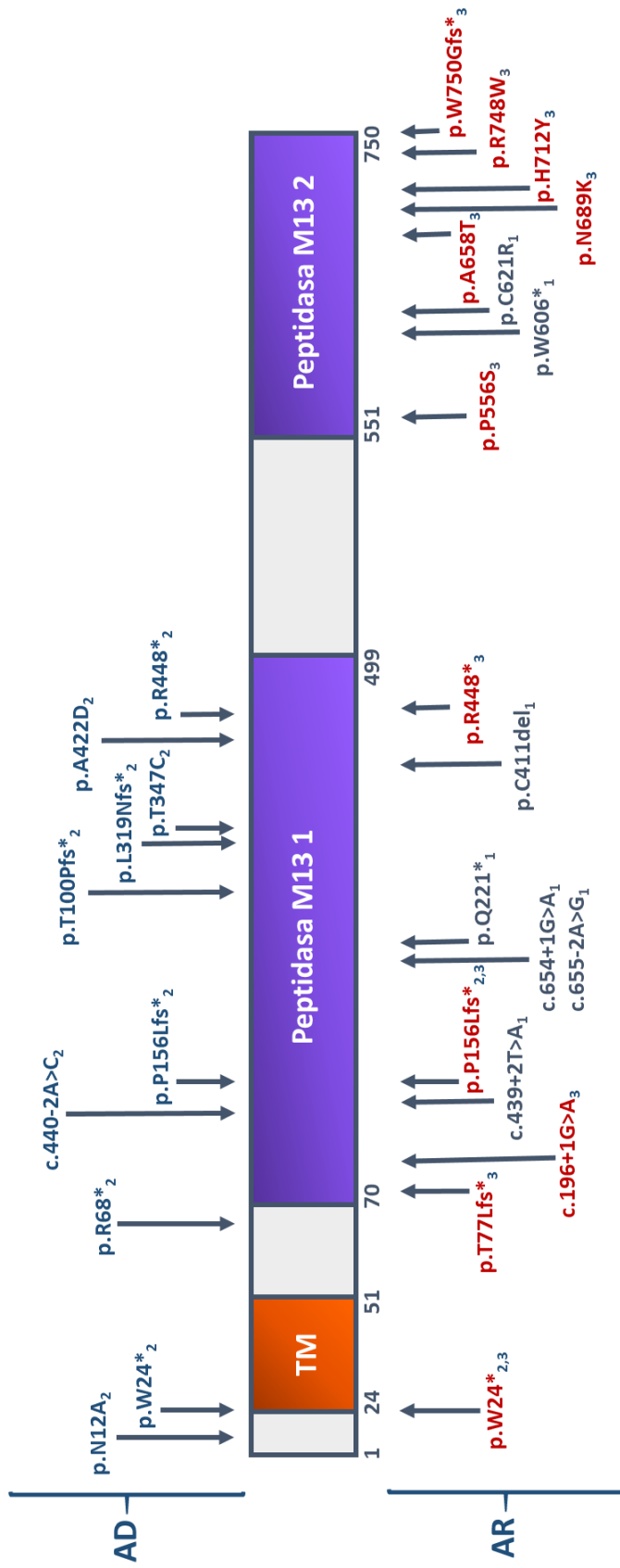


Figura C1.I3. Representación esquemática de la estructura proteica de neprilisina (NP_000893) y las mutaciones identificadas en pacientes CMT2T. TM: dominio transmembrana; Peptidasa M13 1 y 2: dominios peptidasa con homología a M13; AD: herencia autosómica dominante; AR: herencia autosómica recesiva. En rojo se destacan las mutaciones identificadas en nuestra serie clínica (Lupo *et al.*, 2018). Higuchi *et al.*, 2016; ₂Auer-Grumbach *et al.*, 2016; ₃Lupo *et al.*, 2018.

C1.2. Hipótesis y objetivos

Las herramientas de diagnóstico molecular basadas en NGS han supuesto un gran avance en el campo de la genética de enfermedades mendelianas, permitiendo secuenciar más y con mejor calidad. El desafío actualmente está en la interpretación de los resultados obtenidos. Por ello en ocasiones, es imprescindible el desarrollo de estudios adicionales para conseguir una anotación funcional correcta de las variantes identificadas. Este capítulo comprende dos bloques, uno centrado en el empleo de la secuenciación de exoma para establecer las causas genéticas en familias CMT2/NMHD, y un segundo bloque que comprende estudios *in vitro* para investigar la posible patogenicidad de mutaciones identificadas en los genes *AIFM1* y *MME*.

1.- Bases genéticas: El número tan elevado de genes implicados en neuropatías hereditarias complica enormemente la caracterización de sus bases genéticas. Habitualmente, los pacientes son estudiados mediante paneles de genes y si no se logra el diagnóstico, se suele emplear WES. Los paneles de genes permiten expandir el espectro de formas clínicas, ya que es posible asociar un cuadro clínico novel con un gen implicado previamente en enfermedad humana. La WES, adicionalmente, posibilita el descubrimiento de genes no asociados antes a enfermedad. Por ello, planteamos que la WES puede permitir el descubrimiento de formas clínicas genéticas inéditas y/o de nuevos genes. El **objetivo general** es caracterizar las causas genéticas de la enfermedad en los pacientes de cinco familias con CMT2 o NMHD. Los **objetivos específicos** son:

- 1.1.- Selección de variantes candidatas a ser la mutación causal mediante filtrado de datos y análisis *in silico* en muestras investigadas por WES.
- 1.2.- Validación de cambios y análisis de segregación para investigar si la variante cosegrega con la enfermedad.
- 1.3.- Correlación genotipo-fenotipo.

2.- Estudios funcionales: Determinar la patogenicidad de una mutación novel es difícil, y por ello, en ocasiones, es igualmente complicado llegar a un diagnóstico concluyente. Indiscutiblemente, la forma más robusta de establecer que una variante es patológica es la caracterización de una serie de pacientes con mutaciones

en el mismo gen y una sintomatología similar. Sin embargo, para la inmensa mayoría de enfermedades raras, esta circunstancia es extraordinaria, dada su baja casuística. Postulamos pues, que el estudio en modelos celulares de las consecuencias de las mutaciones permitiría ganar evidencias que clarifiquen si el cambio detectado altera la función correcta de la proteína resultante, mediante la realización de estudios diseñados *ad hoc* en base al mecanismo de acción del gen mutado. El **objetivo general** es investigar cómo mutaciones en *AIFM1* y *MME* alteran la correcta función de la proteína mediante aproximaciones *in vitro*. Los **objetivos específicos** son:

2.1.- Estudios funcionales en fibroblastos de paciente portador de la mutación novel c.629C>T (p.F210S) en el gen *AIFM1*: análisis de la ultraestructura celular; estudio de localización subcelular e integridad proteica de AIF; análisis de viabilidad celular y caracterización mitocondrial.

2.2.- Estudios funcionales de las mutaciones recesivas en *MME* identificadas en nuestra serie clínica CMT2T: estudio de colocalización subcelular con orgánulos específicos; y análisis de la función proteolítica de NEP.

C1.3. Resultados

C1.3.1. Bases genéticas de familias CMT2/NMHD

De entre las familias CMT2/NMHD de nuestra serie clínica en las que se habían descartado mutaciones en genes conocidos mediante paneles de genes de diseño propio (**Anexo 1**), se seleccionaron cinco (fCMT_376, fCMT_433, fCMT_436, fCMT_441 y fCMT_443) para continuar su estudio mediante WES. Mediante análisis *in silico* y de segregación, logramos identificar el cambio responsable de la patología en la familia fCMT_436 y probablemente, en la familia fCMT_433 (**Tabla C1.R1**). En dos familias, fCMT_441 y fCMT_443, se identificaron cambios candidatos potenciales a ser la mutación causal y finalmente, no se han logrado resultados concluyentes en la familia fCMT_376.

Tabla C1.R1. Genes y variantes candidatas identificadas mediante estudio de exoma.

Familia	Clínica	Herencia	Gen	Cambio DNA	Cambio proteína	Estado
fCMT_433	CMT2	AD	<i>CADM4</i>	c.206C>T	p.T69I	Heterozigosis
fCMT_436	CMT2+NM	AR	<i>KCNA1</i>	c.451C>T	p.R151C	Homozigosis
fCMT_441	CMT2	AD	<i>RBMS3</i>	c.775G>A	p.A259T	Heterozigosis
			<i>FRS3</i>	c.353T>G	p.I118S	
fCMT_443	CMT2+TTP	XR	<i>FHL1</i>	c.19T>G	p.S7P	Hemizigosis
		AD	<i>SIRT1</i>	c.403G>A	p.A135T	Heterozigosis

CMT2: Charcot-Marie-Tooth axonal; NM: neuromiotonía, TTP: tetraplejia, AR: herencia autosómica recesiva, AD: herencia autosómica dominante, XR: herencia recesiva ligada al X.

C1.3.1-1. Familia fCMT_376

La familia fCMT_376 pertenece a la serie clínica del Hospital U. i P. La Fe de Valencia (**Figura C1.R1**). Los pacientes presentaban una clínica NMHD muy similar: inicio en la segunda década de vida y debilidad de predominio motor en las extremidades inferiores. El probando, SGT_18, había sido previamente estudiado mediante el panel de genes Neuro_56 (Lupo *et al.*, 2016; **Anexo 1**), sin el hallazgo de cambios candidatos. Dada la disponibilidad de muestras de familiares (**Figura C1.R1**), se optó por secuenciar el exoma de los dos hermanos enfermos (SGT_18, SGT_800) y dos familiares sanos (SGT_678, SGT_682).

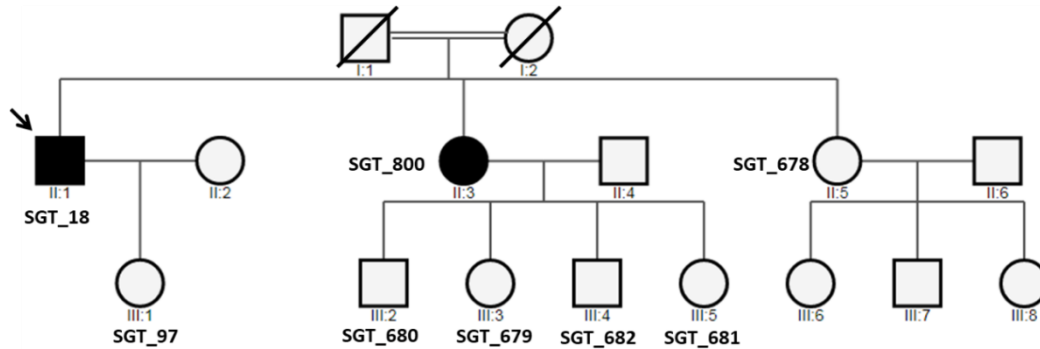


Figura C1.R1. Árbol genealógico de la familia fCMT_376. La flecha señala el probando.

En tanto que se apreciaba transmisión horizontal de la enfermedad y había consanguinidad en la primera generación, en la búsqueda de cambios candidatos a ser la mutación causal, se priorizaron las variantes en homocigosis en un primer análisis, y a continuación, en heterocigosis compuesta. Al no alcanzar ningún resultado positivo, se valoró la posibilidad de una herencia AD bajo la hipótesis de que alguno de los padres de los pacientes pudiera presentar algún signo de la enfermedad, dato que desconocíamos ya que ambos habían fallecido sin ninguna evaluación neurológica previa. En este análisis, se identificaron siete variantes (**Tabla C1.R2**), seis de las cuales producirían un cambio de aminoácido en la proteína sintetizada, y uno conduciría a un codón de parada prematuro.

Excepto los cambios localizados en *DUSP1* (MAF: 4,276e-6) y *HSD17B6* (MAF: 3,234e-5), el resto no habían sido descritos en la base de datos de exomas y genomas de población control gnomAD [último acceso 15/05/2019]. Ninguno de los genes de interés se había asociado previamente a enfermedad humana, excepto mutaciones en *DIS3L*, relacionadas con el síndrome de Perlman (MIM 267000), que cursa con herencia AR. No obstante, todos ellos presentaban expresión en SN (**Tabla C1.R3**). Los resultados de los predictores de patogenicidad (**Tabla C1.R4**) revelaron que las mutaciones identificadas en los genes *DUSP1* y *PEBP4* se consideraban deletéreas para tres y cuatro de los algoritmos utilizados, respectivamente. Por último, el análisis de segregación descartó que estas variantes pudieran ser la mutación causal, al no cosegregar con la enfermedad ninguna de ellas (**Tabla C1.R5**).

Tabla C1.R2. Cambios en heterozigosis en fCMT_376.

SGT_18	SGT_800	SGT_682	SGT_679	Gen	Posición genómica	Secuencia nucleotídica (NM)	Cambio DNA	Cambio proteína
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>DUSP1</i>	5:172195844	NM_004417.4	c.1025C>T	p.P342L
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>PEBP4</i>	8:22675208	NM_144962.3	c.299C>G	p.P100R
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>HSD17B6</i>	12:57167790	NM_003725.4	c.154C>T	p.R52*
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>TDAG51</i>	12:76424687	NM_007350.3	c.835C>A	p.Q279K
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>DIS3L</i>	15:66618507	NM_001143688.3	c.2006T>C	p.L669P
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>PRRI4</i>	16:30664105	NM_001320464.1	c.256G>A	p.V86I
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>SYDE1</i>	19:15223224	NM_033025.6	c.1445C>A	p.T482N

Columnas sombreadas refieren a los pacientes de la familia. 1/0: heterozigoto/a para el cambio; 0/0: no porta el cambio.

Tabla C1.R3. Familia fCMT_376: novedad del cambio y del gen, y expresión en SN.

Mutación	MAF ¹	Enfermedad ²	Expresión SN ³
<i>DUSP1</i> c.1025C>T (p.P342L)	4,276e-6	n.a.	Cerebro
<i>PEBP4</i> c.299C>G (p.P100R)	Novel	n.a.	Cerebro
<i>HSD17B6</i> c.154C>T (p.R52*)	3,234e-5	n.a.	Cerebro
<i>TDAG51</i> c.835C>A (p.Q279K)	Novel	n.a.	Cerebro y médula espinal
<i>DIS3L</i> c.2006T>C (p.L669P)	Novel	Síndrome de Perlman (MIM 267000)	Cerebro
<i>PRRI4</i> c.256G>A (p.V86I)	Novel	n.a.	Cerebro y cerebelo
<i>SYDE1</i> c.1445C>A (p.T482N)	Novel	n.a.	Cerebro, cerebelo y médula espinal

¹Base de datos consultada: gnomAD; ²Bases de datos consultadas: OMIM, HGMD; ³Base de datos consultada: *The human protein atlas*. SN: sistema nervioso; n.a.: no asociado.

Tabla C1.R4. Análisis de patogenicidad *in silico* de los cambios identificados en fCMT_376.

Mutación	<i>Mutation Taster</i>	<i>PolyPhen2</i>	<i>PROVEAN</i>	<i>SIFT</i>
DUSP1 c.1025C>T (p.P342L)	0,999 (Patológico)	1 (Probablemente patológico)	-3,484 (Deletéreo)	0,810 (Tolerado)
PEBP4 c.299C>G (p.P100R)	0,999 (Patológico)	1 (Probablemente patológico)	-8,715 (Deletéreo)	0,001 (No tolerado)
TDAG51 c.835C>A (p.Q279K)	0,992 (Patológico)	0,902 (Probablemente patológico)	-0,908 (Neutral)	0,180 (Tolerado)
DIS3L c.2006T>C (p.L669P)	0,999 (Patológico)	0,999 (Probablemente patológico)	-2,474 (Neutral)	0,130 (Tolerado)
PRR14 c.256G>A (p.V86I)	0,001 (Benigno)	0,001 (Benigno)	-0,125 (Neutral)	0,300 (Tolerado)
SYDE1 c.1445C>A (p.T482N)	1 (Patológico)	0,886 (Probablemente patológico)	-1,235 (Neutral)	0,120 (Tolerado)

Tabla C1.R5. Análisis de segregación de los cambios identificados en fCMT_376.

Mutación	SGT_18	SGT_800	SGT_97	SGT_678	SGT_679	SGT_680	SGT_681	SGT_682
DUSP1 c.1025C>T (p.P342L)	1/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0
PEBP4 c.299C>G (p.P100R)	1/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0
HSD17B6 c.154C>T (p.R52*)	1/0	1/0	1/0	0/0	0/0	1/0	1/0	0/0
TDAG51 c.835C>A (p.Q279K)	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	1/0	1/0	0/0
DIS3L c.2006T>C (p.L669P)	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0	0/0
PRR14 c.256G>A (p.V86I)	1/0	1/0	1/0	0/0	0/0	1/0	0/0	0/0
SYDE1 c.1445C>A (p.T482N)	1/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0

Columnas sombreadas refieren a los pacientes de la familia. 1/0: heterocigoto para el cambio; 0/0: no porta el cambio.

C1.3.1-2. Familia fCMT_433

La familia fCMT_433 pertenece a la serie del Hospital U. Virgen del Rocío de Sevilla (**Figura C1.R2**). Se trataba de pacientes con CMT2, con afectación sensitivo-motora de las extremidades inferiores y con un inicio a finales de la primera década de vida. Singularmente, la clínica era más acusada en los varones afectados (SGT_105 y SGT_779), en comparación con la mujer SGT_337. El probando, SGT_105, había sido previamente estudiado mediante el panel de genes Neuro_56 (Lupo *et al.*, 2015; **Anexo 1**), sin alcanzar un diagnóstico concluyente. Por este motivo, se procedió a la secuenciación de exoma de dos de los enfermos (SGT_337, SGT_779) y dos individuos sanos (SGT_349, SGT_345).

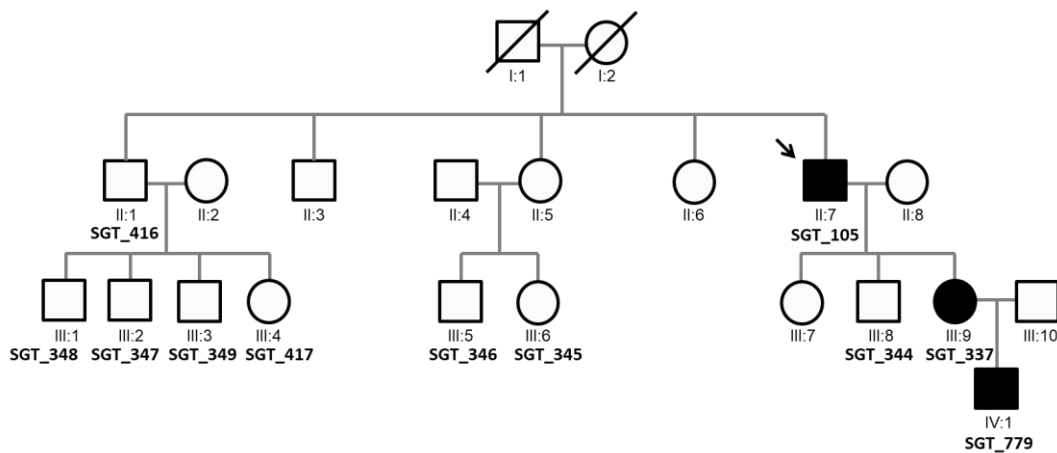


Figura C1.R2. Árbol genealógico de la familia fCMT_433. La flecha señala el probando.

Dada la diferencia en el fenotipo clínico entre los dos varones (SGT_105, SGT_779) y la mujer (SGT_337), en primer lugar tuvimos en cuenta una herencia dominante ligada al cromosoma X (XD), pero no se identificó ninguna variante de interés (novedad o $MAF < 0,001$ en gnomAD). A continuación, se trabajó con la hipótesis de una posible herencia AD, y se detectaron 20 cambios que eran novedades o con $MAF < 0,0001$ [último acceso gnomAD 15/05/2019] (**Tablas C1.R6, C1.R7**). La mayoría de genes presentaban expresión en SN (excepto *ADAM7*, *TNNT3*, *NXPE4*, *SPAG4* y *SMC1B*) y algunos estaban asociados a enfermedad humana, incluyendo neuropatías (**Tabla C1.R7**). Las variantes identificadas en los genes *HNMT*, *ELF2*, *SPAG4* y *DEPDC5* fueron predichas como deletéreas por los cuatro algoritmos empleados, mientras que el cambio detectado en *LSGI* era considerado patológico por tres de ellos (**Tabla C1.R8**).

Tabla C1.R6. Cambios en heterozigosis en fCMT_433.

SGT_337	SGT_779	SGT_345	SGT_349	Gen	Posición genómica	Secuencia nucleotídica (NM)	Cambio DNA	Cambio proteína
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>DPYD</i>	1:98015294	NM_000110.3	c.1346A>C	p.E449A
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>MSH6</i>	2:48033393	NM_000179.2	c.3697A>G	p.K1233E
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>HNMT</i>	2:138758559	NM_006895.3	c.262G>T	p.V88F
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>DGKD</i>	2:234357869	NM_152879.2	c.1735G>A	p.G579R
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>DNAH1</i>	3:52381988	NM_015512.4	c.2104A>G	p.K702E
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>LSGI</i>	3:194369440	NM_018385.3	c.5313A>G	p.T505A
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>MAPK10</i>	4:86985487	NM_138982.4	c.1042A>G	p.I348V
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>ELF2</i>	4:139994679	NM_201999.2	c.281A>C	p.K94T
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>ADAM7</i>	8:24339674	NM_003817.4	c.725T>C	p.I242T
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>KANK1</i>	9:730072	NM_001256876.2	c.2720G>A	p.C907Y
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>TNNT3</i>	11:1954985	NM_001042782.2	c.182T>C	p.M61T
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>NXPE4</i>	11:114442099	NM_001077639.2	c.1196G>C	p.C399S
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>SCAPER</i>	15:77064235	NM_020843.4	c.1096C>T	p.R366*
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>KIF22</i>	16:29810476	NM_001256269.1	c.730T>A	p.S244T
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>ZNF709</i>	19:44131801	NM_152601.4	c.572C>T	p.T191I
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>CADM4</i>	19:44131801	NM_145296.2	c.206C>T	p.T69I
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>SPAG4</i>	20:34207663	NM_003116.3	c.1072G>T	p.V358F
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>SLC24A3</i>	20:19665969	NM_020689.4	c.1288G>C	p.D340H
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>DEPDC5</i>	22:32211099	NM_001242896.2	c.1567G>A	p.D532N
1/0	1/0	0/0	0/0	<i>SMC1B</i>	22:45789621	NM_148674.5	c.1438A>G	p.I480V

Columnas sombreadas refieren a los pacientes de la familia. 1/0: heterocigoto para el cambio; 0/0: no porta el cambio.

Tabla C1.R7. Familia fCMT_433: novedad del cambio y del gen, y expresión en SN.

Mutación	MAF¹	Enfermedad²	Expresión SN³
<i>DPYD</i> c.1346A>C (p.E449A)	Novel	Deficiencia dihidropirimidina deshidrogenasa (MIM 274270)	Baja en cerebro
<i>MSH6</i> c.3697A>G (p.K1233E)	Novel	Cáncer (MIM 614350, 276300, 608089)	Cerebro y cerebelo
<i>HNMT</i> c.262G>T (p.V88F)	Novel	Retraso mental (MIM 616739)	Cerebro y cerebelo
<i>DGKD</i> c.1735G>A (p.G579R)	Novel	n.a.	Cerebro
<i>DNAH1</i> c.2104A>G (p.K702E)	Novel	Infertilidad (MIM 617577, 617576)	Cerebro
<i>LSG1</i> c.5313A>G (p.T505A)	8,125e-6	n.a.	Cerebro y cerebelo
<i>MAPK10</i> c.1042A>G (p.I348V)	4,062e-6	n.a.	Alta en SN central
<i>ELF2</i> c.281A>C (p.K94T)	Novel	Ataxia de cerebelo, neuropatía y arreflexia vestibular (CANVAS) (MIM 614575)	Cerebro y cerebelo
<i>ADAM7</i> c.725T>C (p.I242T)	4,526e-6	n.a.	No en SN
<i>KANK1</i> c.2720G>A (p.C907Y)	3,228e-5	Parálisis cerebral espástica (MIM 612900)	Alta en cerebro, especialmente en corteza cerebral
<i>TNNT3</i> c.182T>C (p.M61T)	3,23e-5	Artrogriposis distal 2B (MIM 601680)	No en SN
<i>NXPE4</i> c.1196G>C (p.C399S)	4,098e-6	n.a.	No en SN
<i>SCAPER</i> c.1096C>T (p.R366*)	4,078e-6	Retraso mental y retinitis pigmentosa (MIM 618195)	Cerebro y cerebelo
<i>KIF22</i> c.730T>A (p.S244T)	1,086e-5	Displasia espándilo-epifisiaria (MIM 603546)	Cerebro y cerebelo
<i>ZNF709</i> c.572C>T (p.T191I)	Novel	n.a.	Baja en SN
<i>CADM4</i> c.206C>T (p.T69I)	Novel	n.a.	Alta en SN, especialmente en corteza cerebral y cerebelo
<i>SPAG4</i> c.1072G>T (p.V358F)	4,11e-6	n.a.	No en SN
<i>SLC24A3</i> c.1288G>C (p.D340H)	Novel	n.a.	Cerebro
<i>DEPDC5</i> c.1567G>A (p.D532N)	4,062e-6	Epilepsia (MIM 604364)	Cerebro y cerebelo
<i>SMC1B</i> c.1438A>G (p.I480V)	Novel	n.a.	No en SN

¹Base de datos consultada: gnomAD; ²Bases de datos consultadas: OMIM, HGMD; ³Base de datos consultada: *The human protein atlas*. SN: sistema nervioso; n.a.: no asociado.

Tabla C1.R8. Análisis de patogenicidad *in silico* de los cambios identificados en fCMT_433.

Mutación	Mutation Taster	PolyPhen2	PROVEAN	SIFT
DPYD c.1346A>C (p.E449A)	0,999 (Patológico)	0 (Benigno)	-2,101 (Neutral)	0,05 (No tolerado)
MSH6 c.3697A>G (p.K1233E)	0,999 (Patológico)	0,014 (Benigno)	-0,444 (Neutral)	0,96 (Tolerado)
HNMT c.262G>T (p.V88F)	0,999 (Patológico)	1 (Probablemente patológico)	-3,916 (Deletéreo)	0 (No tolerado)
DGKD c.1735G>A (p.G579R)	0,999 (Patológico)	0,212 (Benigno)	-1,706 (Neutral)	0,13 (Tolerado)
DNAH1 c.2104A>G (p.K702E)	0,984 (Patológico)	0,380 (Benigno)	-1,598 (Neutral)	0,70 (Tolerado)
LSGI c.5313A>G (p.T505A)	0,634 (Patológico)	0,995 (Probablemente patológico)	-3,624 (Deletéreo)	0,29 (Tolerado)
MAPK10 c.1042A>G (p.I348V)	0,965 (Patológico)	0,672 (Posiblemente perjudicial)	-1,657 (Neutral)	0,44 (Tolerado)
ELF2 c.281A>C (p.K94T)	0,999 (Patológico)	0,996 (Probablemente patológico)	-2,693 (Deletéreo)	0,01 (No tolerado)
ADAM7 c.725T>C (p.I242T)	0,001 (Benigno)	0,993 (Probablemente patológico)	-2,531 (Deletéreo)	0,19 (Tolerado)
KANK1 c.2720G>A (p.C907Y)	0,999 (Patológico)	0,541 (Posiblemente perjudicial)	-1,135 (Neutral)	0 (No tolerado)
TNNT3 c.182T>C (p.M61T)	0,999 (Patológico)	0,007 (Benigno)	-0,417 (Neutral)	0,05 (Tolerado)
NXPE4 c.1196G>C (p.C399S)	0,001 (Benigno)	0,001 (Benigno)	-1,600 (Neutral)	0,64 (Tolerado)
KIF22 c.730T>A (p.S244T)	0,999 (Patológico)	0,879 (Posiblemente perjudicial)	-2,389 (Neutral)	0,01 (No tolerado)
ZNF709 c.572C>T (p.T191I)	0,001 (Benigno)	0,003 (Benigno)	-0,006 (Neutral)	0,89 (Tolerado)
CADM4 c.206C>T (p.T69I)	0,001 (Benigno)	0,972 (Probablemente patológico)	-1,642 (Neutral)	0,20 (Tolerado)
SPAG4 c.1072G>T (p.V358F)	0,999 (Patológico)	1 (Probablemente patológico)	-4,019 (Deletéreo)	0,01 (No tolerado)
SLC24A3 c.1288G>C (p.D340H)	0,999 (Patológico)	0,766 (Posiblemente perjudicial)	-2,108 (Neutral)	0,89 (Tolerado)
DEPDC5 c.1567G>A (p.D532N)	0,999 (Patológico)	0,999 (Probablemente patológico)	-3,215 (Deletéreo)	0,01 (No tolerado)
SMC1B c.1438A>G (p.I480V)	0,926 (Patológico)	0,010 (Benigno)	-0,022 (Neutral)	0,37 (Tolerado)

Para los estudios de segregación, en un primer momento y dado el número elevado de cambios por testar y la escasa cantidad de muestra SGT_105 disponible, se emplearon las muestras de DNA que habían sido previamente estudiadas con el fin de validar por

secuenciación *Sanger* los resultados de exoma (SGT_337, SGT_779, SGT_345 y SGT_349), así como de tres integrantes más de la familia (SGT_344, SGT_416 y SGT_346), con el objetivo de filtrar aquellas variantes que no estuvieran presentes en ningún individuo sano (**Tabla C1.R9**). En esta primera aproximación, de las 20 variantes identificadas por exoma, sólo seis (*DPYD*, *DNAH1*, *ELF2*, *TNNT3*, *CADM4* y *SPAG4*) estaban ausentes en todos los individuos sanos. Finalmente, los cambios candidatos se analizaron en el paciente SGT_105, cosegregando con la patología familiar únicamente las mutaciones identificadas en los genes *DNAH1* y *CADM4* (**Tabla C1.R9**).

Tabla C1.R9. Estudio de segregación mediante secuenciación *Sanger* de los cambios identificados en fCMT_433.

Mutación	SGT_105	SGT_337	SGT_779	SGT_344	SGT_345	SGT_346	SGT_349	SGT_416
<i>DPYD</i> c.1346A>C (p.E449A)	0/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>MSH6</i> c.3697A>G (p.K1233E)	-	1/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>HNMT</i> c.262G>T (p.V88F)	-	1/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>DGKD</i> c.1735G>A (p.G579R)	-	1/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>DNAH1</i> c.2104A>G (p.K702E)	1/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>LSGI</i> c.5313A>G (p.T505A)	-	1/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>MAPK10</i> c.1042A>G (p.I348V)	-	1/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>ELF2</i> c.281A>C (p.K94T)	0/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>ADAM7</i> c.725T>C (p.I242T)	-	1/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>KANK1</i> c.2720G>A (p.C907Y)	-	1/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>TNNT3</i> c.182T>C (p.M61T)	0/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>NXPE4</i> c.1196G>C (p.C399S)	-	1/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>SCAPER</i> c.1096C>T (p.R366*)	-	1/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>KIF22</i> c.730T>A (p.S244T)	-	1/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	1/0
<i>ZNF709</i> c.572C>T (p.T191I)	-	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
<i>CADM4</i> c.206C>T (p.T69I)	1/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>SPAG4</i> c.1072G>T (p.V358F)	0/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>SLC24A3</i> c.1288G>C (p.D340H)	-	1/0	1/0	0/0	0/0	1/0	0/0	1/0
<i>DEPDC5</i> c.1567G>A (p.D532N)	-	1/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>SMC1B</i> c.1438A>G (p.I480V)	-	1/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0

Columnas sombreadas refieren a los pacientes de la familia. -: no estudiado; 1/0: heterocigoto para el cambio; 0/0: no porta el cambio.

C1.3.1-3. Familia fCMT_436

En el Hospital U. de la Paz de Madrid, se diagnosticó al probando SGT_68 de la familia fCMT_436 de CMT2 congénito, con hipertonía y neuromiotonía (**Figura C1.R3**). El paciente había sido previamente estudiado mediante el panel de genes Neuro_104 (**Anexo 1**) con resultado negativo. Se trataba de un caso esporádico, de modo que para la secuenciación de exoma se remitieron las muestras tanto del probando (SGT_68) como de sus progenitores (SGT_317 y SGT_318) (**Figura C1.R3**).

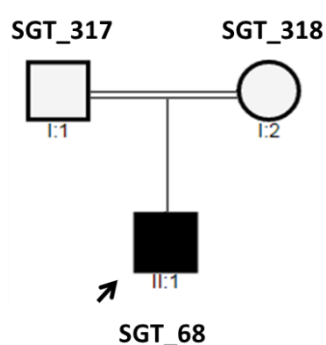


Figura C1.R3. Árbol genealógico de la familia fCMT_436. La flecha señala el probando.

Dada la consanguinidad familiar, se trabajó con la hipótesis de una posible herencia recesiva tanto autosómica (AR) como ligada al X (XR), siendo el sujeto afectado un varón. En tanto que se trataba de un caso esporádico, se consideró además la posibilidad de mutaciones *de novo*. Como resultado de estas aproximaciones, no se identificaron cambios *de novo*, pero sí se hallaron dos mutaciones en homocigosis en SGT_68 siendo los padres portadores heterocigotos de las mismas (**Tabla C1.R10**).

Tabla C1.R10. Cambios en homocigosis en el probando de fCMT_436.

SGT_68	SGT_317	SGT_318	Gen	Posición genómica	Secuencia nucleotídica (NM)	Cambio DNA	Cambio proteína
1/1	1/0	1/0	SLC2A5	1:9101940	NM_003039.3	c.475C>T	p.R159W
1/1	1/0	1/0	KCNA1	12:5020995	NM_000217.3	c.451C>T	p.R151C

Columna sombreada refiere al único paciente de la familia. 1/1: homocigoto para el cambio; 1/0: heterocigoto para el cambio.

Al consultar los cambios en gnomAD, se averiguó que la mutación *SLC2A5* c.475C>T presentaba una MAF de 3,617e-5, mientras que la sustitución *KCNA1* c.451C>T era novel [último acceso gnomAD 15/05/2019] (**Tabla C1.R11**). Ambos genes se expresan en SN, si bien sólo *KCNA1* ha sido asociado a enfermedad humana: ataxia episódica tipo 1 (EA1; MIM 160120) que cursa con una herencia AD (**Tabla C1.R11**). Los predictores de patogenicidad mostraron que tanto el cambio identificado en *SLC2A5* como el detectado en *KCNA1* podrían ser deletéreos (**Tabla C1.R12**). Por último, la

validación mediante secuenciación *Sanger* confirmó que el paciente era homocigoto para ambos cambios (*SLC2A5* c.475C>T, *KCNA1* c.451C>T), mientras que los padres del probando eran portadores heterocigotos (**Tabla C1.R13**).

Tabla C1.R11. Familia fCMT_436: novedad del cambio y del gen, y expresión en SN.

Mutación	MAF ¹	Enfermedad ²	Expresión SN ³
<i>SLC2A5</i> c.475C>T (p.R159W)	3,617e-5	n.a.	Expresión en cerebro, especialmente en corteza cerebral
<i>KCNA1</i> c.451C>T (p.R151C)	Novel	Ataxia episódica 1 (MIM 160120)	Expresión en cerebro y cerebelo

¹Base de datos consultada: gnomAD; ²Bases de datos consultadas: OMIM, HGMD; ³Base de datos consultada: *The human protein atlas*. SN: sistema nervioso; n.a.: no asociado.

Tabla C1.R12. Análisis de patogenicidad *in silico* de los cambios identificados en fCMT_436.

Mutación	<i>Mutation Taster</i>	<i>PolyPhen2</i>	<i>PROVEAN</i>	<i>SIFT</i>
<i>SLC2A5</i> c.475C>T (p.R159W)	1 (Patológico)	1 (Probablemente patológico)	-7,459 (Deletéreo)	0 (No tolerado)
<i>KCNA1</i> c.451C>T (p.R151C)	1 (Patológico)	0,999 (Probablemente patológico)	-6,516 (Deletéreo)	0 (No tolerado)

Tabla C1.R13. Validación mediante secuenciación *Sanger* de los cambios identificados en el probando de fCMT_436.

Mutación	SGT_68	SGT_317	SGT_318
<i>SLC2A5</i> c.475C>T (p.R159W)	1/1	1/0	1/0
<i>KCNA1</i> c.451C>T (p.R151C)	1/1	1/0	1/0

Columna sombreada refiere al único paciente de la familia. 1/1: homocigoto para el cambio; 1/0: heterocigoto para el cambio.

C1.3.1-4. Familia fCMT_441

En el Hospital U. Virgen del Rocío de Sevilla, se supervisaba a los pacientes de la familia fCMT_441 (**Figura C1.R4**), los cuales cursan con un fenotipo clásico de CMT2 con afectación motora inicial y sensitiva tardía, y debut en la segunda década de vida. Se secuenció el exoma de todos los pacientes de la familia de los cuales se disponían DNA (SGT_392, SGT_393, SGT_385 y SGT_386) (**Figura C1.R4**).

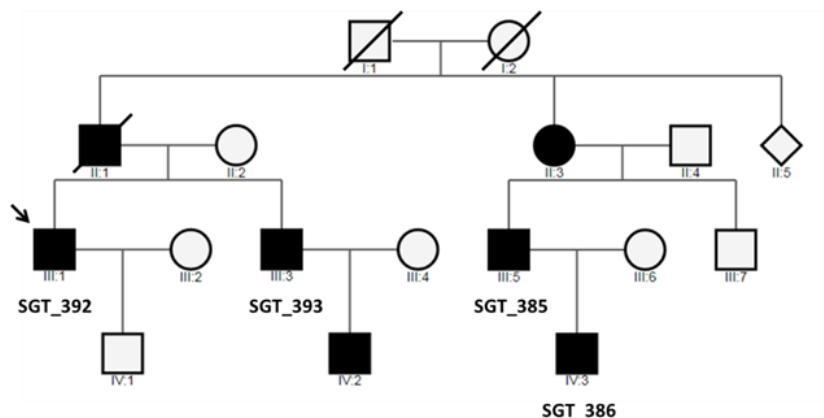


Figura C1.R4. Árbol genealógico de la familia fCMT_441. La flecha señala el probando.

En tanto que la presentación de la enfermedad en la familia fCMT_441 sugería una herencia AD, se priorizaron los cambios en heterozigosis en las cuatro muestras analizadas. Se detectaron seis variantes candidatas en los genes *RBMS3*, *DVL3*, *FRS3*, *C6ORF165*, *MYO3A* y *C18ORF63* (**Tabla C1.R14**). Todas las mutaciones eran novedades en bases de datos poblacionales [último acceso gnomAD 15/05/2019] (**Tabla C1.R15**). Cuatro de estos genes (*RBMS3*, *DVL3*, *FRS3* y *C6ORF165*) se expresan en tejido neural, especialmente *DVL3*. Además, dos de los seis genes se habían relacionado previamente con enfermedad humana: *DVL3* con síndrome Robinow (MIM 616894) y *MYO3A* con un tipo de sordera recesiva (MIM 607101) (**Tabla C1.R15**). El análisis *in silico* de patogenicidad de los cambios identificados indicaba que las mutaciones localizadas en *FRS3* y en *MYO3A* serían patológicas, mientras que para los otros cuatro cambios, el resultado no fue concluyente, con diferentes predicciones según los programas empleados (**Tabla C1.R16**). Finalmente, al no disponer de muestras de DNA de más integrantes de la familia, no fue posible llevar a cabo el análisis de segregación; no obstante, se confirmó la existencia de los seis cambios identificados por secuenciación *Sanger* (**Tabla C1.R17**).

Tabla C1.R14. Cambios identificados en fCMT_441.

SGT_385	SGT_386	SGT_392	SGT_393	Gen	Posición genómica	Secuencia nucleotídica (NM)	Cambio DNA	Cambio proteína
1/0	1/0	1/0	1/0	RBMS3	3:29925683	NM_001330696.1	c.775G>A	p.A259T
1/0	1/0	1/0	1/0	DVL3	3:183888164	NM_004423.4	c.1772C>T	p.P591L
1/0	1/0	1/0	1/0	FRS3	6:41740598	NM_006653.5	c.353T>G	p.I118S
1/0	1/0	1/0	1/0	C6ORF165	6:88123610	NM_001031743.3	c.275C>A	p.T92K
1/0	1/0	1/0	1/0	MYO3A	10:26315365	NM_017433.5	c.857T>G	p.F286C
1/0	1/0	1/0	1/0	C18ORF63	18:72066011	NM_001174123.2	c.563T>C	p.V188A

Columnas sombreadas refieren a los pacientes de la familia. 1/0: heterocigoto para el cambio.

Tabla C1.R15. Familia fCMT_441: novedad del cambio y del gen, y expresión en SN.

Mutación	MAF ¹	Enfermedad ²	Expresión SN ³
RBMS3 c.775G>A (p.A259T)	Novel	n.a.	Cerebro
DVL3 c.1772C>T (p.P591L)	Novel	Síndrome Robinow (MIM 616894)	Alta en cerebro y cerebelo
FRS3 c.353T>G (p.I118S)	Novel	n.a.	Cerebro y cerebelo
C6ORF165 c.275C>A (p.T92K)	Novel	n.a.	Baja en cerebelo
MYO3A c.857T>G (p.F286C)	Novel	Sordera (MIM 607101)	No en SN
C18ORF63 c.563T>C (p.V188A)	Novel	n.a.	No en SN

¹Base de datos consultada: gnomAD; ²Bases de datos consultadas: OMIM, HGMD; ³Base de datos consultada: *The human protein atlas*. SN: sistema nervioso; n.a.: no asociado.

Tabla C1.R16. Análisis de patogenicidad *in silico* de los cambios identificados en fCMT_441.

Mutación	<i>Mutation Taster</i>	<i>PolyPhen2</i>	<i>PROVEAN</i>	<i>SIFT</i>
RBMS3 c.775G>A (p.A259T)	0,999 (Patológico)	0,034 (Benigno)	-0,040 (Neutral)	0,22 (Tolerado)
DVL3 c.1772C>T (p.P591L)	0,999 (Patológico)	0,344 (Benigno)	-0,619 (Neutral)	0,18 (Tolerado)
FRS3 c.353T>G (p.I118S)	0,997 (Patológico)	0,993 (Probablemente patológico)	-2,966 (Deletéreo)	0,01 (No tolerado)
C6ORF165 c.275C>A (p.T92K)	0,999 (Patológico)	0,996 (Probablemente patológico)	-2,163 (Neutral)	0,63 (Tolerado)
MYO3A c.857T>G (p.F286C)	0,999 (Patológico)	1 (Probablemente patológico)	-6,100 (Deletéreo)	0 (No tolerado)
C18ORF63 c.563T>C (p.V188A)	0,001 (Benigno)	0,971 (Probablemente patológico)	-1,625 (Neutral)	0,160 (Tolerado)

Tabla C1.R17. Validación mediante secuenciación *Sanger* de los cambios identificados en fCMT_441.

Mutación	SGT_385	SGT_386	SGT_392	SGT_393
RBMS3 c.775G>A (p.A259T)	1/0	1/0	1/0	1/0
DVL3 c.1772C>T (p.P591L)	1/0	1/0	1/0	1/0
FRS3 c.353T>G (p.I118S)	1/0	1/0	1/0	1/0
C6ORF165 c.275C>A (p.T92K)	1/0	1/0	1/0	1/0
MYO3A c.857T>G (p.F286C)	1/0	1/0	1/0	1/0
C18ORF63 c.563T>C (p.V188A)	1/0	1/0	1/0	1/0

Las columnas sombreadas refieren a los pacientes de la familia. 1/0: heterocigoto para el cambio.

C1.3.1-5. Familia fCMT_443

El probando (SGT_406) de la familia fCMT_433 era seguido en el Hospital U. de Bellvitge (L'Hospitalet de Llobregat) (**Figura C1.R5**). Padece un CMT2 con inicio en la segunda década de vida, caracterizado por una progresión rápida y un cuadro clínico complejo. Así, a los 30 años, cursaba con tetraplejía y afectación de pares craneales, debilidad facial y atrofia de lengua. Se secuenció el exoma del probando (SGT_406), previamente estudiado mediante el panel de genes Neuro_104 (**Anexo 1**), junto con sus padres (SGT_404, SGT_405) y hermano sano (SGT_407) (**Figura C1.R5**).

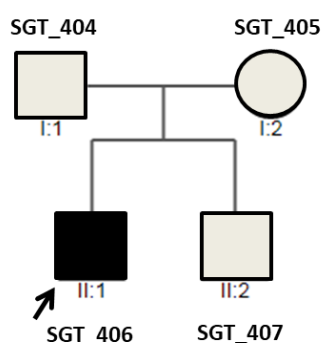


Figura C1.R5. Árbol genealógico de la familia fCMT_443. La flecha señala el probando.

Al tratarse de un caso esporádico varón, la presentación de la enfermedad era compatible con una herencia AR o XR y podría ser un cambio *de novo*. El filtrado de datos de WES, condujo a la selección de dos cambios de interés en los genes *FHL1* y *SIRT1* (**Tabla C1.R18**).

Tabla C1.R18. Cambios identificados en fCMT_443.

SGT_406	SGT_407	SGT_404	SGT_405	Gen	Posición genómica	Secuencia nucleotídica (NM)	Cambio DNA	Cambio proteína
1/0	0/0	0/0	0/0	<i>SIRT1</i>	10:69644882	NM_012238.5	c.403G>A	p.A135T
1/Y	0/Y	0/Y	1/0	<i>FHL1</i>	X:135278980	NM_001159701.1	c.19T>G	p.S7P

Columna sombreada refiere al único paciente de la familia. 1/Y: hemizigoto para el cambio; 1/0: heterocigoto para el cambio; 0/0-0/Y: no porta el cambio.

Las variantes identificados eran novedades en bases de datos poblacionales [último acceso gnomAD 15/05/2019] (**Tabla C1.R19**). Mutaciones en *FHL1* se asocian con diferentes tipos de miopatías, mientras que *SIRT1*, nunca ha sido implicado en patología humana. En cuanto a su expresión, sólo *SIRT1* se expresaba en SN (**Tabla C1.R19**). Los estudios *in silico* estimaron un efecto benigno para ambas mutaciones con tres de los cuatro programas utilizados (**Tabla C1.R20**).

Tabla C1.R19. Familia fCMT_443: novedad del cambio y del gen, y expresión en SN.

Mutación	MAF ¹	Enfermedad ²	Expresión SN ³
<i>SIRT1</i> c.403G>A (p.A135T)	Novel	n.a.	Alta en cerebro, médula espinal y DRG
<i>FHL1</i> c.19T>G (p.S7P)	Novel	Miopatías (MIM 300280, 300696, 300696, 300717, 300718, 300695)	No en SN

¹Base de datos consultada: gnomAD; ²Bases de datos consultadas: OMIM, HGMD; ³Base de datos consultada: *The human protein atlas*. SN: sistema nervioso; n.a.: no asociado; DRG: *dorsal root ganglion*.

Tabla C1.R20. Análisis de patogenicidad *in silico* de los cambios identificados en fCMT_443.

Mutación	Mutation Taster	PolyPhen2	PROVEAN	SIFT
<i>SIRT1</i> c.403G>A (p.A135T)	0,001 (Benigno)	0,345 (Benigno)	-0,312 (Neutral)	0 (No tolerado)
<i>FHL1</i> c.19T>G (p.S7P)	0,001 (Benigno)	0,032 (Benigno)	-0,008 (Neutral)	0 (No tolerado)

Finalmente, se llevó a cabo la validación de los cambios identificados en *SIRT1* y *FHL1* mediante secuenciación *Sanger*. Se confirmó que la mutación *SIRT1* c.403G>A había surgido *de novo* en el probando SGT_406, mientras la mutación *FHL1* c.19T>G había sido heredada de su madre (SGT_405), no siendo portadores de este cambio ni el hermano ni el padre (**Tabla C1.R21**).

Tabla C1.R21. Validación mediante secuenciación *Sanger* de los cambios identificados en fCMT_443.

Mutación	SGT_406	SGT_407	SGT_404	SGT_405
<i>SIRT1</i> c.403G>A (p.A135T)	1/0	0/0	0/0	0/0
<i>FHL1</i> c.19T>G (p.S7P)	1/Y	0/Y	0/Y	1/0

Columna sombreada refiere al único paciente de la familia. 1/Y: hemizigoto para el cambio; 1/0: heterocigoto para el cambio; 0/0-0/Y: no porta el cambio.

C1.3.2. Análisis *in vitro* de la mutación novel *AIFMI* c.629T>C (p.F210S)

C1.3.2-1. Modelado de la estructura 3D de AIF p.F210S

Mediante el programa *in silico* de modelado de macromoléculas COOT, empleando la estructura cristalizada de AIF [4BUR y 4BV6 (RCBS-PDB, *protein data bank*)], pudimos comprobar que el residuo F210 está situado en la superficie de la proteína. La sustitución por el residuo serina (p.F210S) no produjo alteraciones estructurales evidentes que afectaran al sitio activo de AIF ni a la estructura del péptido regulador localizado entre los residuos 510 y 560 (**Figura C1.R6-A, B**). Sin embargo, la serina en la posición 210 de la proteína podría romper la interacción existente entre el residuo F210 y la prolina en posición 207 (P207) (**Figura C1.R6-B**). La pérdida parcial de interacción entre estos dos residuos alteraría la interacción entre una hélice- α de la proteína situada entre los residuos 510-516 y un giro- β localizado entre los residuos 192-204, siendo crucial para la unión del cofactor NAD y por lo tanto, para el correcto funcionamiento de AIF (**Figura C1.R6-C**).

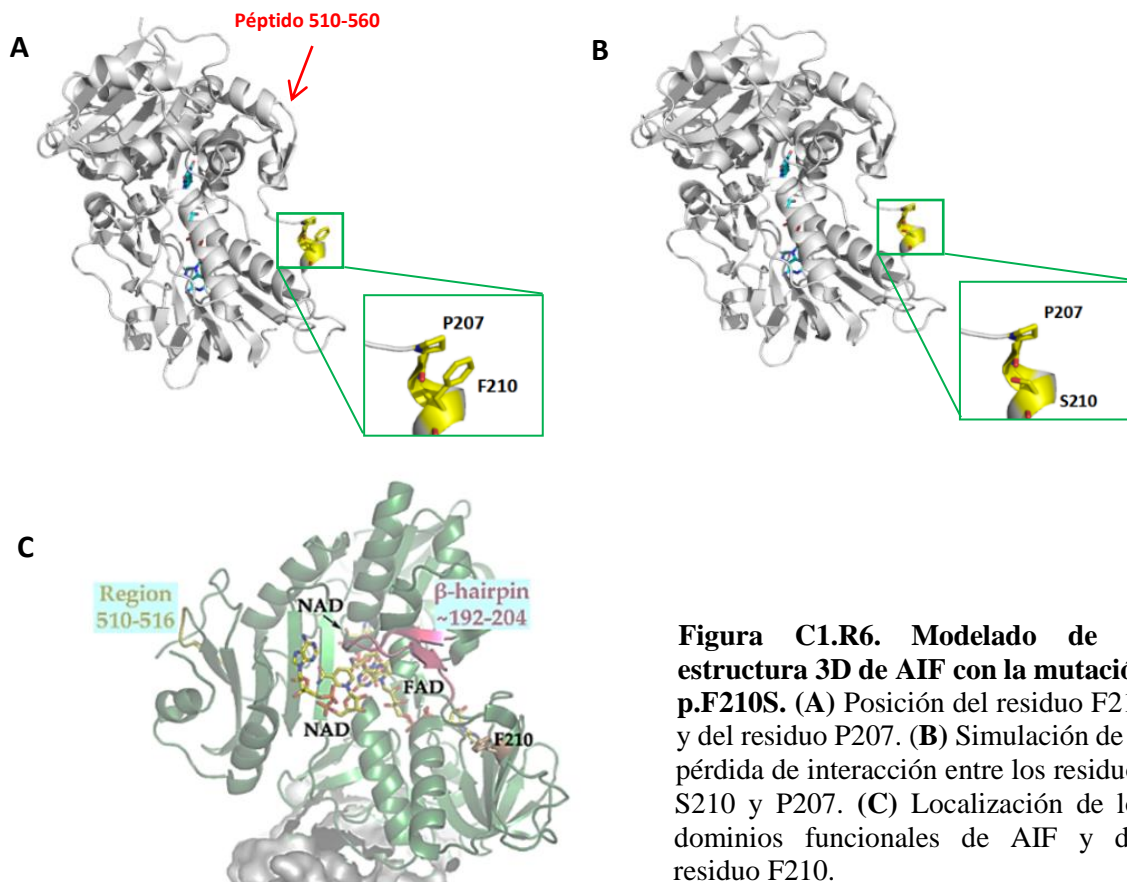


Figura C1.R6. Modelado de la estructura 3D de AIF con la mutación p.F210S. (A) Posición del residuo F210 y del residuo P207. (B) Simulación de la pérdida de interacción entre los residuos S210 y P207. (C) Localización de los dominios funcionales de AIF y del residuo F210.

C1.3.2-2. Caracterización de fibroblastos derivados del paciente SGT_361

C1.3.2-2A. Estudio de la ultraestructura celular

El estudio de microscopía en campo claro y mediante inmunofluorescencia utilizando marcadores de citoesqueleto (actina) y núcleo celular (DAPI) de fibroblastos derivados de biopsia de piel del paciente SGT_361 y de un control sano, reveló una morfología alterada de los fibroblastos SGT_361, aumentando de tamaño y adquiriendo formas poligonales no observadas en los fibroblastos control (**Figura C1.R7**).

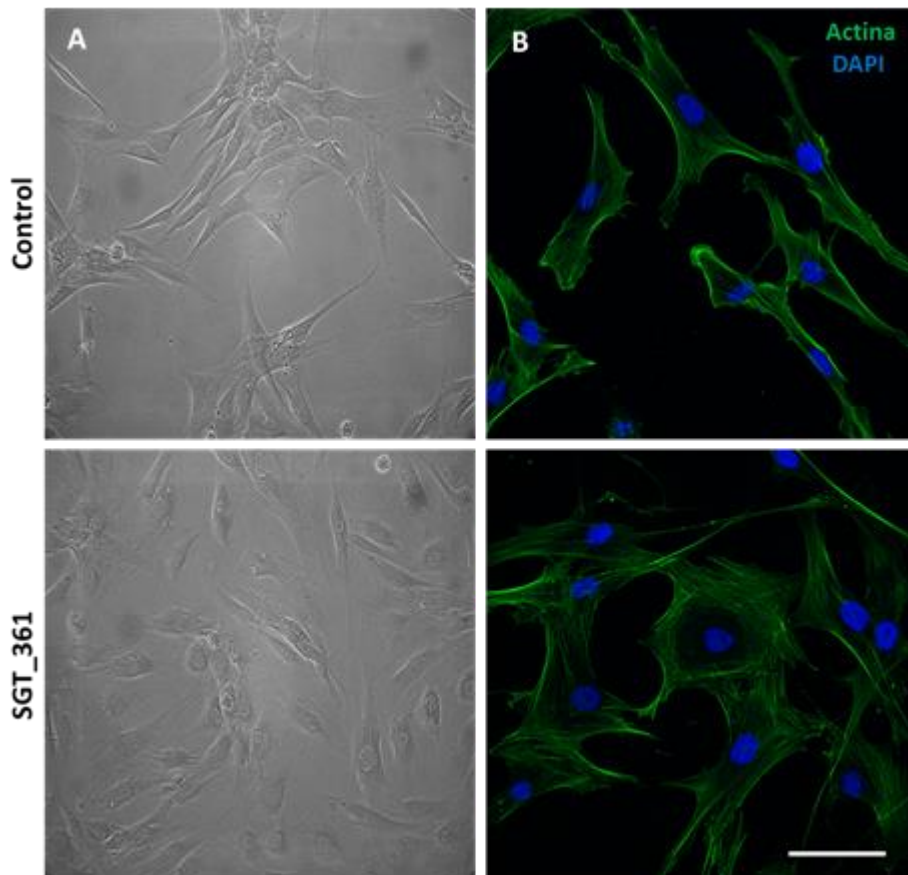


Figura C1.R7. Análisis de la ultraestructura celular de los fibroblastos del paciente SGT_361 y control. (A) Estudio de microscopía en campo claro de células *in vivo*. (B) Inmunofluorescencia de fibroblastos fijados que muestra actina en el canal verde como marcador de citoesqueleto y DAPI como marcador nuclear. Barra de escala: 50 μm .

C1.3.2-2B. Estudio de localización e integridad proteica de AIF

En fibroblastos control y del paciente SGT_361, AIF colocalizaba con el marcador mitocondrial Tom20 (**Figura C1.R8-A**). Además, en algunas células, AIF mostraba un patrón punteado tanto en núcleo como en citoplasma. No obstante, no se detectaron diferencias de localización proteica entre fibroblastos del paciente y control (**Figura C1.R8-A**). Por otro lado, el estudio de integridad proteica mediante *western blot* (WB), reveló una disminución estadísticamente significativa de los niveles de AIF en los fibroblastos de SGT_361 respecto a dos controles sanos, siendo más notable cuando se comparó con los fibroblastos procedentes de un individuo de edad similar al paciente (células Hs27; ATCC® CRL-1634™) (**Figura C1.R8-B, C**).

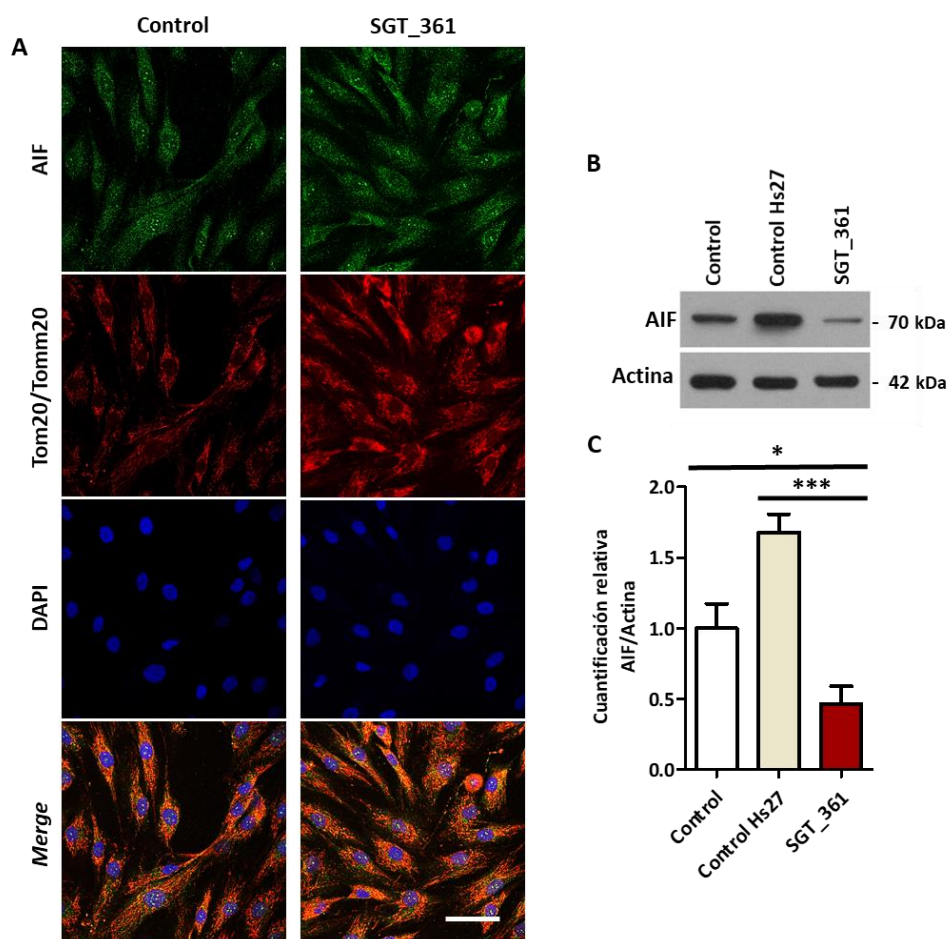


Figura C1.R8. Estudio de localización e integridad proteica de AIF en fibroblastos control y de SGT_361. (A) Inmunofluorescencia que muestra AIF en el canal verde, la red mitocondrial con Tom20 en el canal rojo y DAPI en el canal azul. *Merge*: solapamiento entre los tres canales. Barra de escala: 50 μ m. (B) Inmunoblot de AIF en extractos proteicos de fibroblastos del paciente SGT_361, fibroblastos control y de la línea comercial Hs27. Se emplea actina como control de carga. (C) Cuantificación de AIF relativizada al valor obtenido en el control. * $p_{\text{valor}} < 0,05$; *** $p_{\text{valor}} < 0,001$.

C1.3.2-2C. Ensayo de supervivencia: viabilidad y apoptosis

Los ensayos de viabilidad celular y apoptosis, se realizaron mediante citometría de flujo empleando marcadores específicos. Para la determinación de la viabilidad de fibroblastos en cultivo, se empleó yoduro de propidio (*propidium iodide*; PI) y para la cuantificación de la tasa apoptótica, se utilizó anexina V como marcador del fosfolípido fosfatidil-serina que se trasloca a la cara externa de la membrana plasmática durante los primeros estadios de apoptosis. Además, dada la localización de AIF en mitocondria, se empleó medio basal de crecimiento de fibroblastos y medio suplementado con galactosa, ya que produce estrés mitocondrial por incremento de ROS (*reactive oxygen species*).

Como resultado, no se detectaron diferencias significativas para la medida de anexina V entre los fibroblastos control y SGT_361 en los dos medios empleados (**Figura C1.R9-A**), ya que en ambas muestras la tasa apoptótica crecía de forma similar conforme aumentaban los días de cultivo. No obstante, el estudio de viabilidad celular mostró un aumento significativo de células positivas para PI en los fibroblastos SGT_361 frente a los fibroblastos control a día 6 postsiembra (**Figura C1.R9-B**). El aumento de mortalidad sin activación del programa apoptótico, sugería la activación de otros procesos que conducen a muerte celular, tales como senescencia.

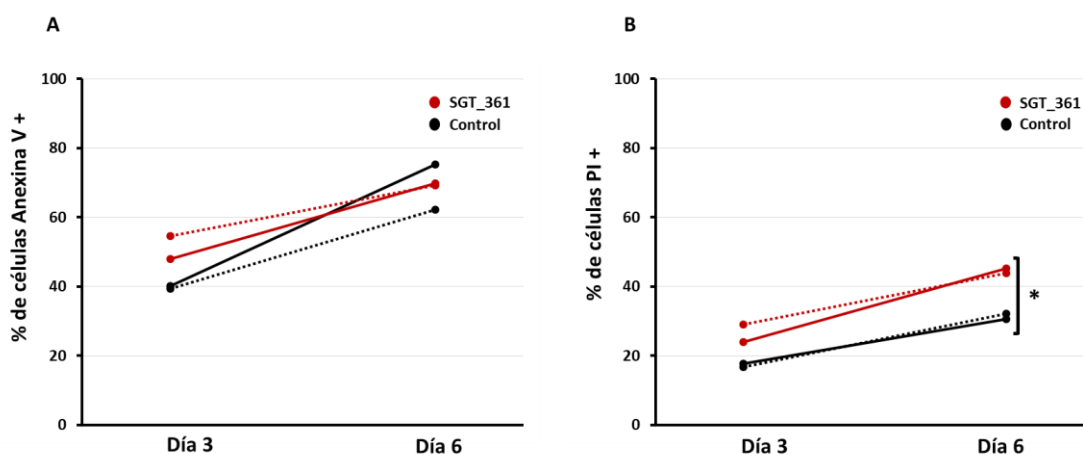


Figura C1.R9. Ensayo de viabilidad y apoptosis en fibroblastos control y de SGT_361 a día 3 y día 6 postsiembra. (A) Porcentaje de células anexina V positivas. (B) Porcentaje de células PI (yoduro de propidio) positivas. Línea continua: medio basal; línea discontinua: medio con galactosa. *p_valor<0,05.

Para corroborar los resultados obtenidos por citometría de flujo, se realizaron estudios de expresión de genes relacionados con procesos apoptóticos (*BAX*) y de senescencia celular (*P21*, *P16*) mediante RT-PCR. Los resultados derivados de este análisis de expresión, ratificaron que en los fibroblastos de SGT_361 no existía un aumento de *BAX*, activador del programa apoptótico (**Figura C1.R10-A**). No obstante, el estudio de marcadores senescentes, reveló un aumento de la expresión del gen *P21* a día 6 (**Figura C1.R10-B**). En el caso de *P16*, el incremento fue mucho más drástico en los fibroblastos del paciente SGT_361, aumentando conforme pasaban los días de cultivo y haciéndose más evidente bajo condiciones de estrés mitocondrial por aumento de ROS (**Figura C1.R10-C**).

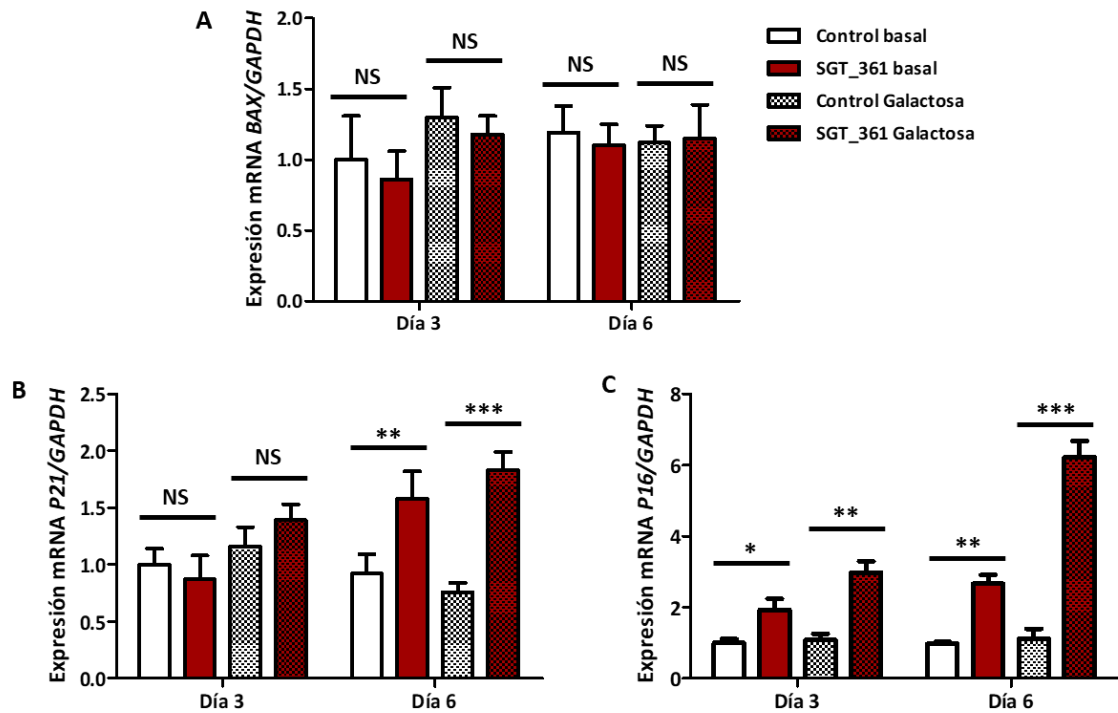


Figura C1.R10. Estudio de expresión génica de marcadores de apoptosis y viabilidad mediante RT-PCR de fibroblastos control y de SGT_361 a día 3 y día 6 postsiembra. En todos los casos, se normalizaron los datos frente a *GAPDH* y posteriormente, por la relativización al valor de expresión del control. (A) Cuantificación relativa de la expresión de *BAX*. (B) Cuantificación relativa de la expresión de *P21*. (C) Cuantificación relativa de la expresión de *P16*. * $p_{\text{valor}} < 0,05$; ** $p_{\text{valor}} < 0,01$; *** $p_{\text{valor}} < 0,001$; NS: no significativo.

C1.3.2-2D. Caracterización cuantitativa y cualitativa mitocondrial

La inmunotinción con el marcador mitocondrial Tom20 mostró una morfología diferente de las mitocondrias del paciente SGT_361 en comparación con las de los fibroblastos control, independientemente del medio de crecimiento empleado. A simple vista, parecían ser más circulares y con una menor interconectividad que las células control (**Figura C1.R11**).

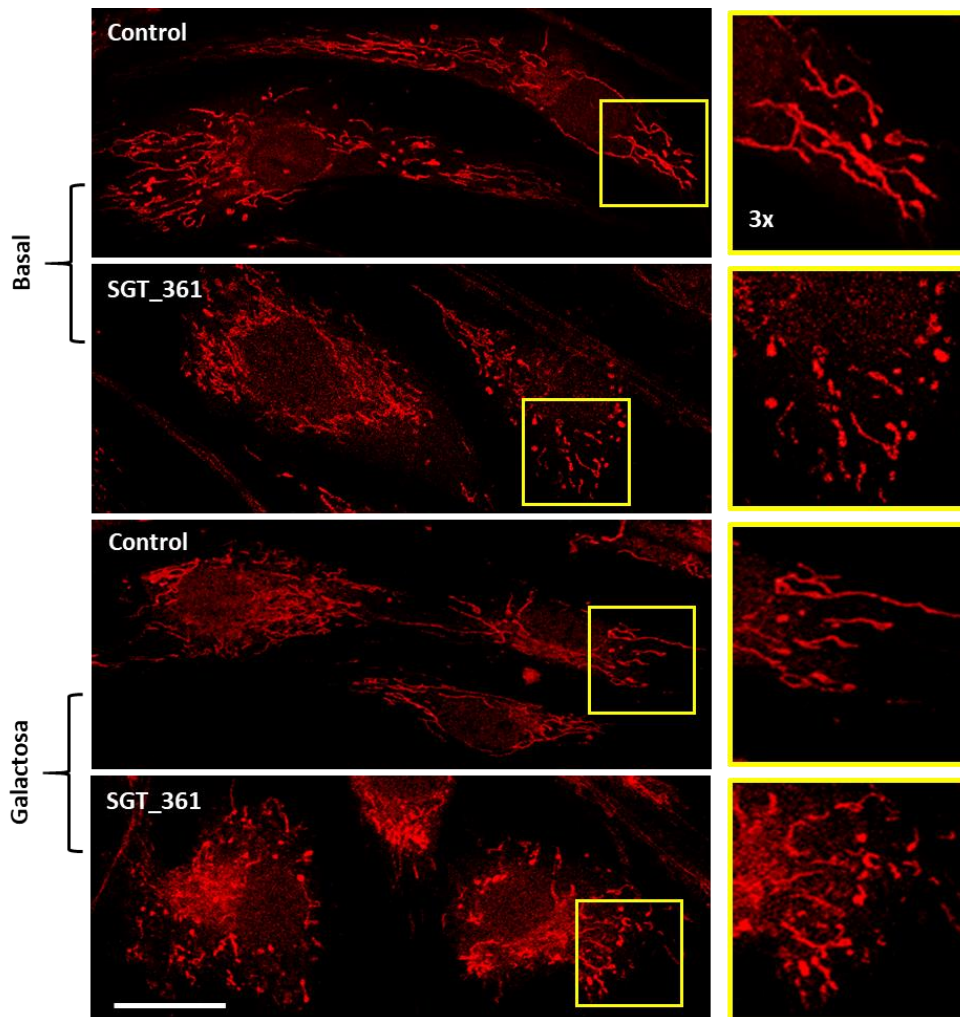


Figura C1.R11. Inmunofluorescencia que muestra la red mitocondrial de fibroblastos control y de SGT_361 en medio basal y en medio con galactosa. Se empleó el anticuerpo Tom20 para marcar mitocondrias. Las ampliaciones mostradas en cada recuadro amarillo corresponden a una magnificación 3X de un área concreta de cada imagen. Barra de escala: 25 μm .

Para llevar a cabo un análisis más preciso, se empleó una aplicación de cuantificación mitocondrial incluida en el programa *ImageJ*, que permite estudiar características tales como, masa (número de mitocondrias/célula), interconectividad (ratio

área/perímetro) o forma mitocondrial (circularidad y elongación) (**Figura C1.R12**). La cuantificación de las imágenes mostró que no se apreciaban diferencias en la masa mitocondrial (**Figura C1.R12-A**), pero sí se detectaron diferencias significativas en la interconectividad y en la forma mitocondrial en los fibroblastos derivados de SGT_361. En cuanto a la interconectividad, la cuantificación área/perímetro de las mitocondrias del paciente en ambos medios fue significativamente más baja que la de los fibroblastos control (**Figura C1.R12-B**). Cuanto menor es este ratio, mayor es la fragmentación mitocondrial, por lo que las mitocondrias de los fibroblastos SGT_361 presentaban un estado de fragmentación mucho más elevado que los fibroblastos control. Del mismo modo, se confirmó que las mitocondrias del paciente mostraban formas menos elongadas (**Figura C1.R12-C**) y más circulares que el control (**Figura C1.R12-D**). Estos resultados coincidían para los dos medios utilizados, por lo que tanto en condiciones basales como en condiciones de estrés por aumento de ROS, la morfología mitocondrial resultó ser anómala en el paciente SGT_361.

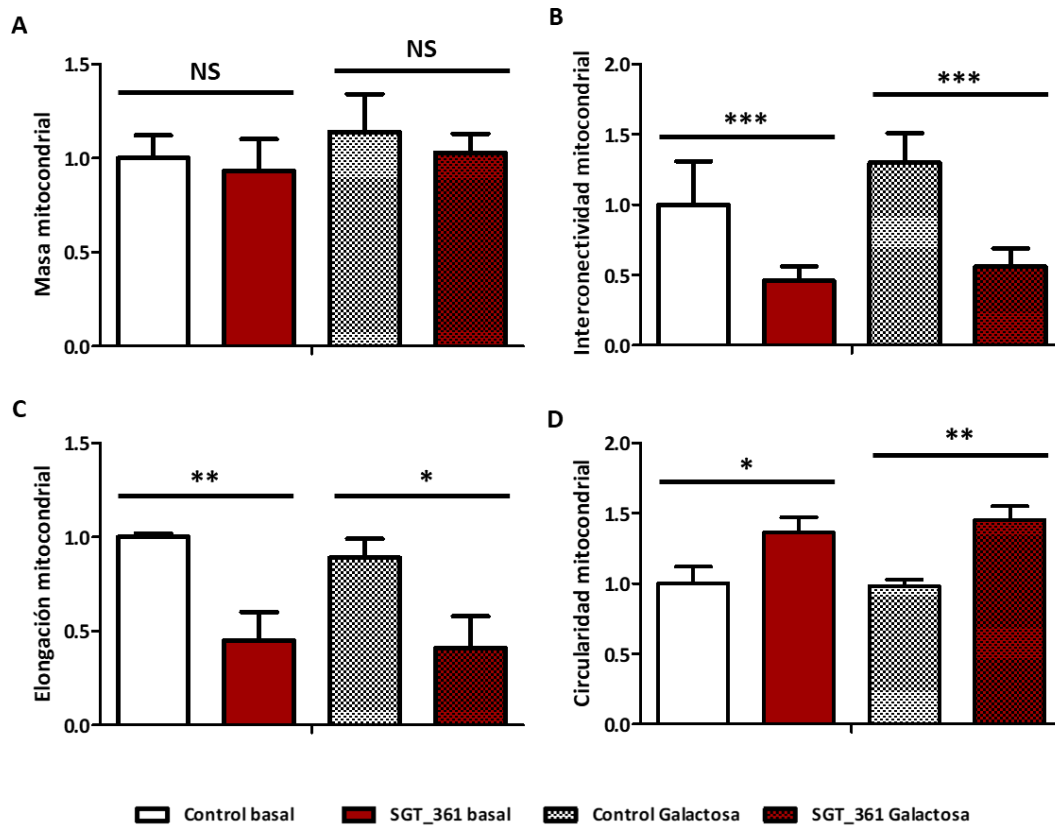


Figura C1.R12. Estudio de las características mitocondriales de fibroblastos control y de SGT_361. Los valores obtenidos en los fibroblastos de paciente se normalizaron frente a los obtenidos en el control. (A) Masa mitocondrial. (B) Interconectividad mitocondrial. (C) Elongación mitocondrial. (D) Circularidad mitocondrial. *p_valor<0,05; **p_valor<0,01; ***p_valor<0,001. NS: no significativo.

C1.3.3. Análisis *in vitro* de mutaciones en el gen *MME*

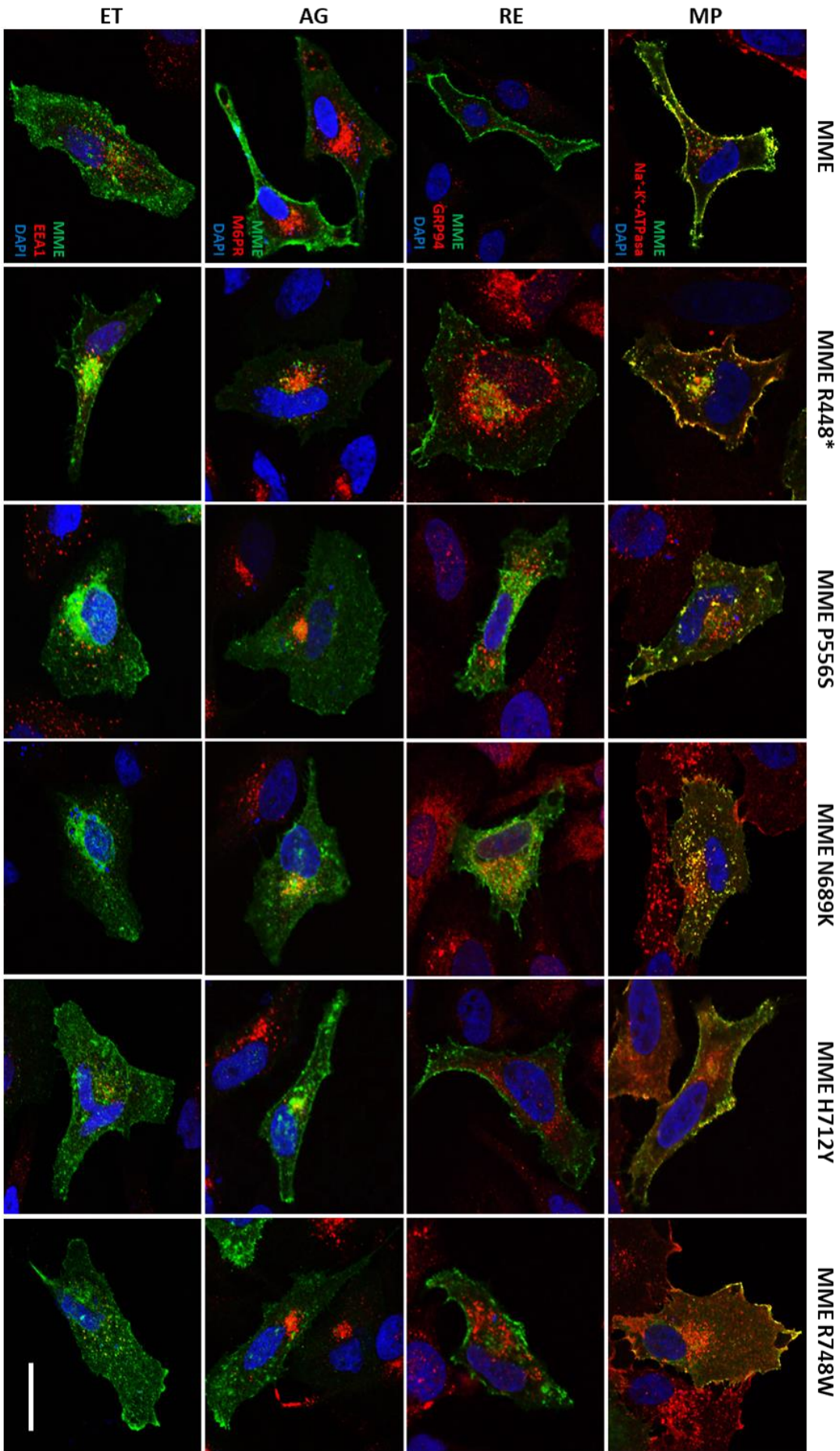
C1.3.3-1. Estudio de localización subcelular de neprilisina

Para conocer la localización de la forma *wild type* (WT) de neprilisina (NEP) y de cinco de las mutaciones identificadas en nuestra serie clínica (p.R448*, p.P556S, p.N689K, p.H712Y y p.R748W), llevamos a cabo un estudio de inmunofluorescencia en células HeLa que sobreexpresaban los diferentes constructos etiquetados con HA en N-ter de NEP (**Figura C1.R13**). NEP-WT colocalizaba mayoritariamente con la membrana plasmática (MP; anti-Na⁺K⁺ATPasa), aunque se detectaba también un patrón punteado citoplasmático, que colocalizaba parcialmente con el marcador de endosomas tempranos EEA1, sugiriendo así un tráfico vesicular entre la MP y la ruta endocítica. El estudio de colocalización con un marcador del retículo endoplásmico (RE; anti-GRP94) y del aparato de Golgi (AG; anti-M6PR), no reveló la presencia de NEP en dichos orgánulos.

El patrón subcelular de NEP-WT se observó también con las construcciones que presentaban las mutaciones p.H712Y y p.R748W, ambas localizadas en el segundo dominio peptidasa de la región C-ter (**Figura C1.I3**). La distribución subcelular fue diferente para la mutación p.R448*, ya que se acumulaba en la región perinuclear, coincidiendo parcialmente con RE y AG, y no colocalizaba con el marcador de endosomas tempranos EEA1. Por último, las mutaciones p.P556S y p.N689K parecían mostrar un patrón en MP como la forma WT, aunque con una menor presencia, además de una distribución citoplasmática tanto punteada como difusa (**Figura C1.R13**).

(Pie de la figura de la página siguiente)

Figura C1.R13. Estudio de localización en células HeLa de NEP-WT y las mutaciones p.R448*, p.P556S, p.N689K, p.H712Y y p.R748W. Inmunofluorescencia que muestra los constructos WT y mutantes de NEP (fusionados a la etiqueta –HA) en el canal verde. En el canal azul, con DAPI se muestran los núcleos. Los marcadores específicos de orgánulo se muestran en el canal rojo: EEA1 para ET (endosomas tempranos); M6PR para AG (aparato de Golgi); Na⁺K⁺-ATPasa para MP (membrana plasmática); GRP94 para RE (retículo endoplásmico). Barra de escala: 20 μm.



C1.3.3-2. Ensayo de la función proteolítica de neprilisina

Dada la localización común de las mutaciones p.P556S, p.N689K, p.H712Y y p.R748W en el segundo dominio proteasa de NEP y la ausencia del mismo inducida por la mutación p.R448*, decidimos realizar un ensayo de la actividad proteolítica de NEP. Para ello, llevamos a cabo transfecciones transitorias empleando los constructos WT y mutantes en células HeLa y utilizamos el péptido comercial Mca-RPPGFSAFK-Dnp (Enzo Life Sciences) como sustrato de la enzima. De forma que, tras la excitación a 328 nm, si el péptido era hidrolizado por NEP (forma WT o mutada), la fluorescencia emitida de los fragmentos resultantes podría ser leída a 393 nm. En paralelo, llevamos a cabo un análisis de integridad proteica por WB de los mismos cultivos para conocer el nivel de expresión de NEP en las diferentes transfecciones realizadas. Los datos de actividad proteasa se normalizaron frente a la expresión de NEP obtenida en cada transfección.

Como resultado de ambas aproximaciones, y relativizando los resultados a los valores obtenidos para NEP-WT, p.R448* y p.H712Y perdían su capacidad proteolítica, con valores similares al vector vacío (pCMV_HA). Por el contrario, p.P556S y p.N689K parecían no alterar la función proteasa de NEP. Del mismo modo, p.R748W presentaba un aumento significativo de la función proteolítica de en torno a un 20% (**Figura C1.R14-A**). Los estudios de expresión mediante WB, confirmaron la integridad de NEP para todas las muestras (banda de 120 kb), excepto para la mutación p.R448*, donde se observó una banda más baja (~90 kb), producto de la pérdida del fragmento C-ter. En este caso, además, se observaba una banda difusa inmediatamente inferior de ~75 kb, que podría estar inducida por procesos de degradación proteica (**Figura C1.R14-B**).

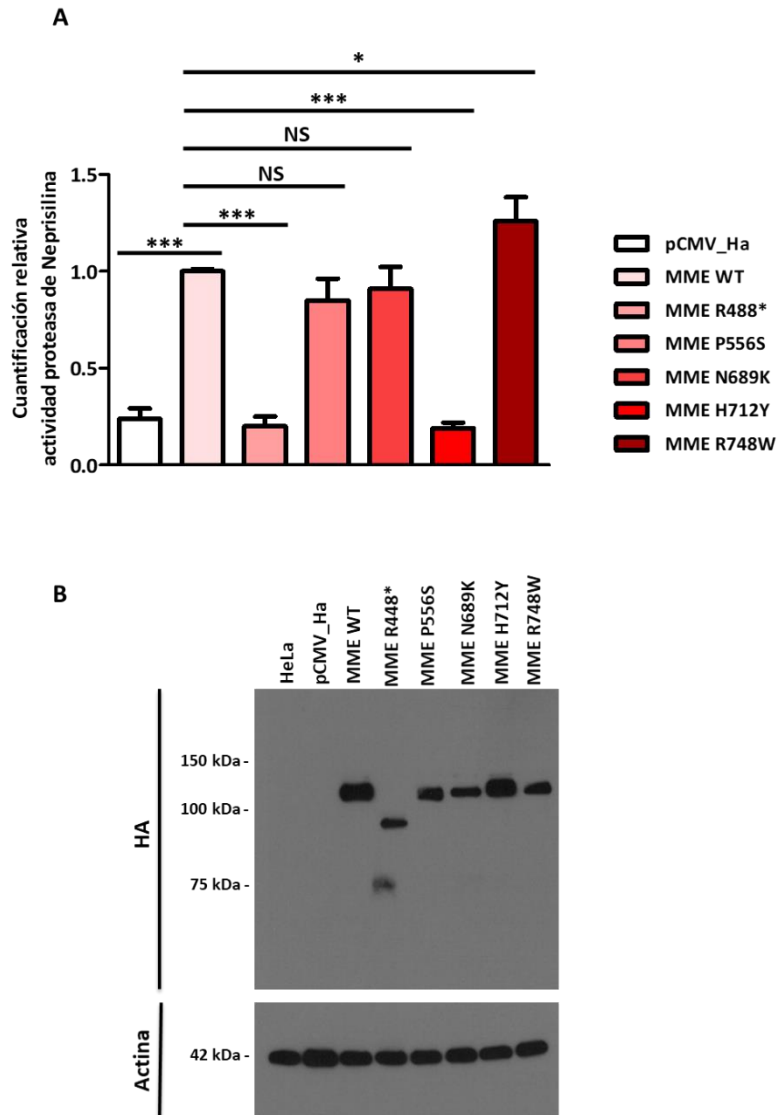


Figura C1.R14. Ensayo de la función proteasa de NEP-WT y las mutaciones p.R448*, p.P556S, p.N689K, p.H712Y y p.R748W. (A) Cuantificación de la actividad proteolítica de NEP normalizada frente a la actividad de NEP-WT. *p_valor<0,05; ***p_valor<0,001; NS: no significativo. (B) Inmunoblot que muestra los niveles de expresión de NEP-WT y mutantes empleando un anticuerpo frente a -HA, fusionada en la región N-ter de la proteína. Se empleó actina como control de carga.

C1.4. Discusión

C1.4.1. Complejidad del diagnóstico genético de neuropatías periféricas

El estudio mediante WES en cinco familias con diagnóstico clínico CMT2 o NMHd ha resultado en la identificación de la mutación causal en una familia (fCMT_436), a la descripción de un posible gen nuevo implicado en CMT2 en una segunda familia (fCMT_433), y en el hallazgo de mutaciones candidatas a ser responsables de la enfermedad muscular en las familias fCMT_441 y fCMT_443. Finalmente, en la familia fCMT_376 no hemos logrado identificar posibles cambios causales de la patología.

Respecto a la tasa de diagnóstico obtenida con la utilización de las diferentes herramientas NGS, WES identifica la causa genética en alrededor del 25-50% de casos (Chong *et al.*, 2015; Eldomery *et al.*, 2017). Si se estudia sólo el probando, se resuelven aproximadamente el 30% de casos, mientras que si se estudian tríos (progenitores y probando), éste aumenta a un 40% (Retterer *et al.*, 2016; Wright *et al.*, 2018). El estudio de un trío mediante WGS en enfermedades mendelianas tiene una tasa de éxito similar a la obtenida por WES trío, estimada en un 42% (Wright *et al.*, 2018).

Alrededor de un 86% de las mutaciones relacionadas con enfermedades mendelianas están en exones codificantes y un 14% se localizan en zonas no codificantes que por tanto, no están cubiertas en un exoma: un 11% de las mismas se sitúan en intrones y un 3% en regiones reguladoras (Cooper *et al.*, 2010). Conforme se identifiquen más mutaciones clínicas en zonas no exónicas, estos porcentajes cambiarán, aunque es de esperar que la proporción de cambios patológicos en exones sea el más destacado, ya que son justamente los que resultan en proteína.

También se debe tener en cuenta que WES no es adecuada para la detección de alteraciones genómicas tales como grandes inserciones y/o deleciones, o mutaciones dinámicas (Maroille and Tarailo-Graovac, 2019). Es decir, que además de considerar el estudio de todo el genoma, habría que emplear aproximaciones distintas para investigar si otro tipo de mutación, diferente a la mutación puntual o pequeñas deleciones/duplicaciones, podría causar la enfermedad.

El filtrado de resultados de exoma y el estudio de segregación de variantes candidatas de la familia **fCMT_433**, mostró dos mutaciones noveles de interés en los genes *CADM4* y *DNAH1*. Si bien ambos genes presentaban expresión en SN, la

predicción de patogenicidad *in silico* de las variantes *CADM4* c.206C>T (p.T69I) y *DNAH1* c.2104A>G (p.K702E) indicaba que probablemente ambas serían benignas.

El gen *DNAH1* (*dynein heavy chain 1*) codifica para una proteína implicada en la espermatogénesis masculina. La proteína DNAH1 forma parte del complejo dineína, incluido en la estructura ciliar responsable del movimiento flagelar de los espermatozoides masculinos (Ben Khelifa *et al.*, 2014). De hecho, se ha relacionado con diferentes patologías con herencia AR que conducen a infertilidad (MIM 617577, 617576). Hasta la fecha, no se ha relacionado DNAH1 con ninguna enfermedad con afectación del SNP.

El gen *CADM4* (*cell adhesion molecule-4*) codifica para la proteína CADM4 de 388 aminoácidos, también llamada NECL4 (*nectin-like protein-4*). CADM4, es una nectina perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, glicoproteínas de membrana formadas por cuatro miembros (CADM1, CADM2, CADM3 y CADM4) (Sakisaka and Takai, 2004; Biederer, 2006). Las proteínas CADM son moléculas de adhesión que participan en la unión de las células de Schwann y los axones durante la mielinización. Mientras que CADM1 y CADM3 se distribuyen a lo largo de la membrana axonal, la localización de CADM4 queda restringida a la membrana de las células de Schwann, y CADM2 se presenta en las membranas de ambos tipos celulares (Maurel *et al.*, 2007; Spiegel *et al.*, 2007). El proceso de mielinización requiere de la comunicación recíproca entre las células de Schwann y sus axones asociados, mediada por diferentes proteínas de adhesión localizadas en los nodos de Ranvier o paranodos (Eshed *et al.*, 2005). Las proteínas CADM desempeñan un papel crucial en este proceso; de hecho, la interacción axón-glía es mediada por la unión de CADM4 con CADM3 y CADM2 (Maurel *et al.*, 2007; Spiegel *et al.*, 2007).

Respecto a los dominios de la proteína CADM4, se conocen tres: un gran dominio extracelular (aminoácidos 21-324), un dominio de anclaje a membrana (aminoácidos 325-345), y un dominio citoplasmático N-ter (aminoácidos 346-388). La mutación c.206C>T identificada en los pacientes de la familia fCMT_433 conduciría al cambio p.T69I, y se localiza en el dominio extracelular. Este dominio es de vital importancia para la funcionalidad de la proteína, pues media la unión con CADM3 y CADM2 durante la mielinización. De hecho, la alteración del dominio extracelular conduce a una reducción de la mielinización *in vitro* llevada a cabo por células de Schwann (Spiegel *et al.*, 2007).

El ratón *knock-out* (KO) para *Cadm4* muestra un fenotipo de CMT grave, con reducción de la VCN y afectación del aparato locomotor (Golan *et al.*, 2013). Entre otras alteraciones, el ratón presenta *limb grasping* (postura anormal de las extremidades inferiores cuando queda suspendido de la cola). Además, se ha demostrado que la ausencia de *Cadm4* resulta en una deficiencia de contacto axón-glía y una redistribución anómala de los canales iónicos en la superficie del axón (Golan *et al.*, 2013). Adicionalmente, en un estudio que examinaba la expresión de diferentes proteínas de adhesión presentes en la interfaz axón-glía en biopsias de pacientes y en modelos murinos de CMT1A, se observó una fuerte represión de *CADM4* durante la maduración de los nervios periféricos, reafirmando su papel clave en la integridad axonal y su implicación en la fisiopatología de CMT (Kinter *et al.*, 2013).

Más recientemente, se ha identificado la interacción de *CADM4* con un transportador de la colina (*CTL1; choline transporter-like 1*) (Heffernan *et al.*, 2017). En un modelo *in vitro* de células de Schwann KO para *CADM4* han demostrado mediante análisis lipidómicos, la acumulación de derivados de colina como fosfatidil-colina o fosfatidil-inositol, y en células de Schwann doble KO para *CTLI* y *CADM4*, han observado un déficit de la mielinización de neuritas (Heffernan *et al.*, 2017). De esta forma, se expanden las funciones atribuidas a *CADM4* en SNP, ya que, además de estar involucrado en el contacto axón-glía durante la mielinización y en la correcta distribución de los canales iónicos a lo largo del axón, parece ejercer un papel regulador en la biogénesis de lípidos derivados de colina. Todo ello, hace que el cambio *CADM4* c.206C>T (p.T69I), sea el mejor candidato para explicar la patología observada en la familia fCMT_433, si bien no se ha asociado hasta el momento con enfermedad humana. Son necesarios estudios adicionales para establecer que realmente *CADM4* es un nuevo gen implicado en CMT, con el propósito de clarificar cómo la variante identificada altera la función correcta de la proteína. Y evidentemente, la descripción de más pacientes con CMT axonal y mutaciones en este gen, sería la demostración irrefutable de que *CADM4* pasa a formar parte de la lista creciente de genes implicados en CMT.

El filtrado de resultados de WES de la familia **fCMT_436** reveló la presencia en homocigosis de los cambios *KCNA1* c.451C>T (p.R151C) y *SLC2A5* c.475C>T (p.R159W), ambos predichos como patológicos, en el paciente nacido de padres consanguíneos.

El gen *KCNA1* codifica la proteína Kv1.1, un canal de potasio con seis dominios transmembrana (TM) y dos dominios citosólicos en N-ter y C-ter. La mutación identificada en el probando, afecta al aminoácido 151, incluido en el dominio N-ter. Mientras que los dominios TM forman parte del canal de potasio, el dominio N-ter se relaciona con la interacción de subunidades β del complejo, reguladoras de la expresión y de la inactivación del canal (Bähring *et al.*, 2004; Ovsepian *et al.*, 2016). Se han identificado un total de 19 mutaciones con herencia AD localizadas en los dominios TM y C-ter de Kv1.1 que conducen a ataxia episódica-1 (EA1; MIM 160120) con signos adicionales como epilepsia, mioquímia, neuromiotonía o hipertermia maligna (Comu *et al.*, 1996; Brandt and Strupp, 1997; Lee *et al.*, 2004; Imbrici *et al.*, 2008, 2017; Tan *et al.*, 2013; Karalok *et al.*, 2018) (**Figura C1.D1**). De las mutaciones conocidas, únicamente se conoce una que no causa fenotipo de EA1, c.724G>C (p.A242P), observada en un paciente con mioquímia (Tan *et al.*, 2013). La variante c.451C>T (p.R151C) detectada en el probando SGT_68 es la única conocida, en principio asociada a enfermedad, que se localiza en el dominio citosólico N-ter del canal Kv1.1. Además, SGT_68 tiene los dos alelos mutados y consecuentemente, es de prever una pérdida de función de la proteína. Estas diferencias con respecto a los pocos casos previamente descritos pueden explicar, al menos parcialmente, la disparidad en el cuadro clínico, ya que el probando no manifiesta ataxia.

Apoyando que *KCNA1* es un excelente candidato para explicar la enfermedad en SGT_68, es la respuesta del paciente al tratamiento con el anticonvulsivante carbamazepina. Este fármaco bloquea las formas inactivadas de los canales de sodio dependientes de potencial, lo que explica que actúe de forma selectiva sobre aquellas neuronas que sufren descargas epilépticas (en las que se incrementa el número de estos canales inactivados) (Martins *et al.*, 2018). La carbamazepina se suele prescribir a pacientes con canalopatías o miopatías con disfunciones en diferentes tipos de canales iónicos (Hurst and Hobson-Webb, 2016), por lo que la respuesta favorable del probando es sugestiva de una alteración de un canal, lo que refuerza el posible carácter deletéreo de *KCNA1* c.451C>T (p.R151C). Por todo ello, el probando SGT_68 quien padece un CMT2 congénito con hipertonía y neuromiotonía causado por mutaciones con herencia AR, expande la genética y la clínica asociadas al gen *KCNA1*.

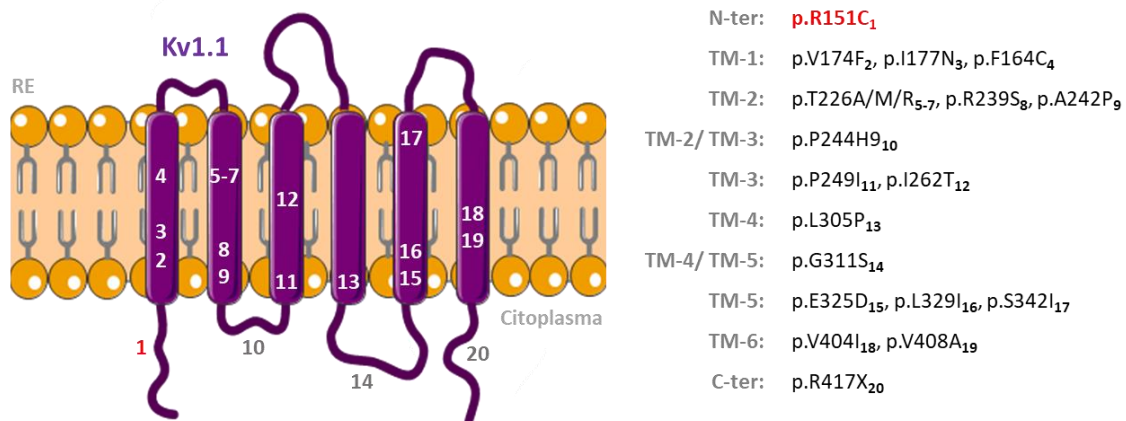


Figura C1.D1. Esquema de los diferentes dominios del canal Kv1.1 y la localización de las mutaciones reportadas hasta el momento. En rojo se destaca la mutación p.R151C identificada en el probando SGT_68 de la familia fCMT_436. RE: región extracelular; TM1-TM6: dominios transmembrana 1-6; N-ter: dominio amino-terminal; C-ter: dominio carboxi-terminal.

El estudio mediante WES en cuatro pacientes de la **familia fCMT_441** mostró la presencia en todos ellos de seis cambios noveles en heterocigosis, que se consideraban variantes deletéreas en al menos un predictor. Al no disponer de muestras de otros familiares sanos o enfermos, no se pudo ampliar el análisis de segregación, y consecuentemente, no fue posible descartar o aceptar con más confianza ninguno de los cambios detectados. La clínica atribuida a mutaciones en *DVL3* (síndrome Robinow; MIM 616894) y *MYO3A* (sordera recesiva; MIM 607101) no está relacionada con NPHs, por lo que es de esperar que no estén implicados en la patología familiar. Sobre la posible implicación de los genes *C6ORF165* y *C18ORF63* en la enfermedad de los pacientes de la familia fCMT_441, poco se puede decir ya que se desconoce la función de las proteínas codificadas. Por último, en cuanto a *RBMS3* (MIM 605786) o *FRS3* (MIM 607744), a pesar de no haberse asociado hasta la fecha con enfermedad humana, se les han atribuido funciones en el SN, haciendo de éstos últimos los candidatos más interesantes que pudieran estar relacionados con el mecanismo de enfermedad del cuadro clínico en la familia fCMT_441.

RBMS3 codifica una proteína de unión a RNA (*RNA binding protein*, RBP). Las RBPs presentan funciones diversas intracelulares, todas ellas relacionadas con el metabolismo del RNA. Además, se conocen diferentes RBPs implicadas en ELA, como FUS o TDP43 (Ravanidis *et al.*, 2018), y en relación a RBMS3 se ha establecido su asociación con ELA mediante un estudio basado en inteligencia artificial empleando la plataforma IBM Watson (Bakkar *et al.*, 2018).

Respecto a *FRS3*, éste codifica para un factor de crecimiento de fibroblastos, relacionado con el mantenimiento del citoesqueleto, el tráfico intracelular y el desarrollo cortical de neuronas del SNC y del SNP (Hryciw *et al.*, 2010). Son varias las formas CMT asociadas a genes que participan en estas rutas. Entre ellas, CMT2O (MIM 614228) está causado por mutaciones en el gen *DYNC1H1*, que codifica para una proteína que forma parte del complejo dineína (Hafezparast *et al.*, 2003), o CMT2B (MIM 600882) es debido a mutaciones en *RAB7*, proteína que participa en el reclutamiento del complejo motor dineína-dinactina (Verhoeven *et al.*, 2003), además de interactuar con *peripherin*, proteína implicada en el crecimiento de neuritas y en regeneración axonal del SNP (Cogli *et al.*, 2013). En un modelo CMT2B de pez cebra se ha observado que el crecimiento axonal, el desarrollo de neuritas y el transporte a través de la ruta endocítica entre el soma y la sinapsis son procesos dañados (Ponomareva *et al.*, 2016), expandiendo las posibles vías de afectación de proteínas mutadas del citoesqueleto neuronal. Todo ello, refuerza la hipótesis de que alteraciones en el transporte axonal, la homeostasis de neurofilamentos y la arquitectura del citoesqueleto, son procesos clave en la fisiopatología global de la neuropatía de CMT (Azzedine *et al.*, 2012; Bucci *et al.*, 2012; Gentil and Cooper, 2012). Es tentador, en el caso de que se establezca con certeza la implicación de *FRS3* en CMT, hipotetizar que el mecanismo molecular subyacente está relacionado con las vías anteriormente mencionadas.

De los cambios identificados en la familia **fCMT_443** destacaban *SIRT1* c.403G>A (p.A35T) y *FHL1* c.19T>G (p.S7P). El cambio en *FHL1* cosegregaba con la enfermedad y la variante en *SIRT1* era *de novo*, si bien los análisis *in silico* predecían que se trataba probablemente de cambios tolerables.

El gen *SIRT1* codifica para sirtuína-1, una proteína perteneciente a la familia de las sirtuínas, que son proteínas desacetilasas de histonas NAD-dependientes (Abdelmohsen *et al.*, 2007; Murayama *et al.*, 2008). La sirtuína-1 es una proteína nuclear con expresión predominantemente neuronal (Ramadori *et al.*, 2008). De hecho, ha sido previamente relacionada con funciones neuronales diversas, incluyendo el mantenimiento de la estabilidad genómica o la homeostasis proteica (reduciendo la acumulación de agregados tóxicos), la plasticidad sináptica (mediante la activación de la transcripción de genes específicos), el control del estrés oxidativo y la función mitocondrial, la apoptosis celular o la disminución de la neuroinflamación a través de la inhibición de la ruta de señalización NF- κ B (Min *et al.*, 2013). La ruta de las sirtuínas, y más especialmente la

función llevada a cabo por sirtuína-1, se ha relacionado con enfermedades neurodegenerativas tales como Alzheimer, Parkinson o Huntington (Donmez and Outeiro, 2013). Así, de entre las vías de acción de la proteína relacionadas con homeostasis neuronal, sirtuína-1 une y desacetila factores de transcripción de la familia FOXO, involucrados en protección neuronal, resistencia a diferentes tipos de estrés o producción de glucosa (Salminen *et al.*, 2008). Todo ello hace del cambio *SIRT1* c.403G>A (p.A35T) un buen candidato a ser la mutación causal de la enfermedad en los pacientes de la familia fCMT_443.

Respecto a la mutación novel *FHL1* c.19T>G (p.S7P), *FHL1* forma parte de una familia de proteínas que contienen cuatro dominios y medio de tipo LIM (Lee *et al.*, 1998), motivos muy conservados constituidos por dos subdominios de dedos de zinc en tándem (Kadmas and Beckerle, 2004). Se conocen múltiples mutaciones en *FHL1* que ocasionan diferentes tipos de miopatías y cardiomiopatías, entre ellas: distrofia muscular Emery-Dreifuss (MIM 300696), miopatía con atrofia muscular postural (MIM 300696), distrofia facio-escapulo-humeral (MIM 300695), miopatía con cuerpos reductores (MIM 300717, 300718), y síndrome de Uruguay (MIM 300280). El probando SGT_406 padece un CMT2 con tetraplejía y por tanto, si la variante *FHL1* c.19T>G causa la enfermedad, sería un nuevo fenotipo asociado a este gen. Se han descrito cuatro isoformas transcripcionales del gen *FHL1* (**Figura C1.D2**). Las mutaciones asociadas a enfermedad están descritas en las isoformas *FHL1*-A (NM_001159700.1), *FHL1*-B (NM_001159702.2) y *FHL1*-C (NM_001159703.1) (Gueneau *et al.*, 2009). Sin embargo, la mutación identificada en SGT_406 se localiza en un exón de la región 5', anotado en la nueva versión GRCh38 del genoma humano, que es exclusivo de una cuarta isoforma de *FHL1* (NM_001159701.1) (**Figura C1.D2**). Como primera aproximación para ganar evidencias que aclaren si esta nueva isoforma puede estar implicada en enfermedad humana, en concreto en neuropatía, sería interesante determinar si se expresa en SNP.

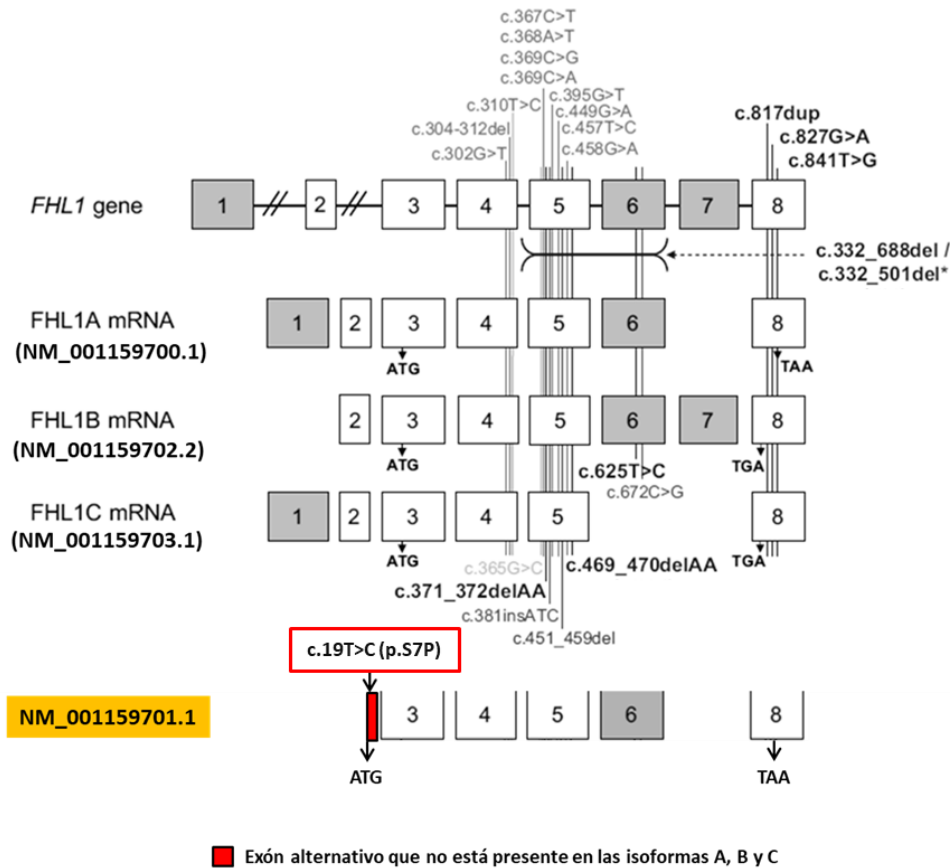


Figura C1.D2. Isoformas del gen *FHL1* y localización de las mutaciones clínicas. [Adaptación de Gueneau *et al.*, *American journal of human genetics*; 2009]. En naranja se destaca la nueva isoforma (NM_001159701.1) anotada versión GRCh38 del genoma humano, y en rojo el exón donde se localiza la mutación identificada en el paciente de la familia fCMT_443 (c.19T>C, p.S7P).

Finalmente, en el caso de la familia **fCMT_376** no hemos logrado ningún candidato a ser la mutación responsable de la neuropatía. La consanguinidad existente entre los progenitores, hizo priorizar en un primer análisis cambios en homocigosis, y al no identificar variantes interesantes, se continuó con el estudio de cambios en heterocigosis compuesta, al suponer una herencia AR, si bien los padres nunca fueron evaluados clínicamente. Al no lograr resultados concluyentes, seguidamente, se filtraron cambios en heterocigosis con la hipótesis de una herencia AD y se detectaron siete mutaciones candidatas. No obstante, estudios posteriores de segregación descartaron la implicación de los mismos, puesto que ninguno cosegregaba con la patología. Llegar a esta conclusión fue posible gracias a la disponibilidad de DNA de seis miembros sanos de la familia. Este estudio subraya la importancia del análisis de segregación como método sencillo para descartar o no si una variante novel o poco común está implicada en una enfermedad. Evidentemente, es preciso que los individuos tengan claramente

definido su estatus, enfermo o sano, aunque esto suponga una evaluación clínica en detalle tanto de pacientes como de asintomáticos, sobre todo al tratarse de trastornos neurodegenerativos de debut en edad adulta. Del mismo modo, otros aspectos a nivel fenotipo-genotipo, como la penetrancia incompleta y expresividad variable intra e interfamiliar, son características habitualmente asociadas a este grupo de neuropatías en particular, y a enfermedades mendelianas o monogénicas en general. Éstas son consecuencias de mecanismos que llevan a una pérdida de heredabilidad (*missing heritability*), expresión acuñada por el profesor Brendan Maher en 2008 (Maher, 2008). En concreto, para paraparesias espásticas familiares, se estima que entre un 30-40% de los casos no se diagnostican genéticamente debido a la heredabilidad perdida causada por la participación en la fisiopatología de la enfermedad de más de un gen (herencia oligogénica), por la presencia de modificadores genéticos o por mecanismos tales como disomías uniparentales, entre otras opciones (Bis-Brewer and Züchner, 2018). Indiscutiblemente, conforme se mejora la comprensión de las bases moleculares de enfermedades mendelianas, la apreciación de que además de la mutación primaria, otros factores influyen en el fenotipo clínico tanto o más que el defecto molecular primario es una realidad palpable para muchas enfermedades. De hecho, en el análisis de cerca de 600.000 genomas de individuos sanos adultos, se identificaron 13 que portaban mutaciones que conducían a trastornos pediátricos fatales y sin embargo, no habían manifestado ningún signo clínico (Chen *et al.*, 2016). Este estudio subraya la influencia de factores adicionales que modifican el fenotipo final hasta el extremo de anular la expresión de una clínica grave. Consecuentemente, las bases genéticas de las enfermedades mendelianas son definitivamente mucho más complejas de lo creído hasta ahora.

C1.4.2. Análisis del impacto de *AIFM1* c.629T>C (p.F210S) en fibroblastos de paciente

Mutaciones en *AIFM1* conducen a fenotipos clínicos diversos, incluyendo CMTX4 o síndrome de Cowchock, deficiencia combinada de la fosforilación oxidativa o sordera tipo 5 (Ghezzi *et al.*, 2010; Berger *et al.*, 2011; Rinaldi *et al.*, 2012; Zong *et al.*, 2015; Diodato *et al.*, 2016; Jing *et al.*, 2016; Mierzewska *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018). En el caso de la familia fCMT_437, se identificó en hemizigosis la mutación *AIFM1* c.629T>C (p.F210S) en dos hermanos con un diagnóstico clínico de NMHd de

inicio en la infancia y sin alteraciones cognitivas. Por ello, la caracterización de este nuevo caso expande la clínica asociada a *AIFM1*.

El análisis *in silico* del impacto de la mutación p.F210S en la estructura tridimensional de AIF, sugiere una posible disminución en la interacción del residuo 210 con el residuo 207 de AIF (P207), lo que alteraría la interacción entre un dominio hélice- α de la proteína (510-516) y un giro- β (192-204), que es fundamental para la unión del cofactor NAD. La localización de las tres mutaciones publicadas hasta el momento que conducen a daño de los nervios periféricos sin alteraciones en el SNC (p.M171I, p.P210L y p.P210S), coincide en el primer dominio de unión a FAD, sugiriendo un patrón de patogenicidad similar.

Por otro lado, los fibroblastos del paciente SGT_361 mostraron una morfología anormal respecto al control y a pesar de descartar diferencias en la localización subcelular de AIF, se observaron alteraciones en los niveles proteicos mediante WB. Los fibroblastos del paciente presentaban menor expresión de la proteína al comparar con los controles, especialmente con el control pareado por sexo y edad. Este hallazgo podría sugerir un patrón de expresión diferencial de AIF durante el desarrollo, con una expresión más prominente en edad infantil. De modo que la pérdida de proteína observada en el paciente podría explicar el debut temprano de la sintomatología (cuando AIF debiera exhibir una mayor expresión). La disminución en los niveles de AIF es una alteración común a otras mutaciones identificadas en otros dominios de AIF, como p.V243L, p.G262S y p.G338E (Kettwig *et al.*, 2015; Diodato *et al.*, 2016; Sevrioukova, 2016).

El estudio de supervivencia celular reveló un descenso de la viabilidad de los fibroblastos del paciente respecto al control, haciéndose más evidente bajo condiciones de estrés mitocondrial (exceso de ROS inducido por cultivo con galactosa). No obstante, y a pesar de la función descrita de AIF como inductor de apoptosis (Cande, 2002; Gurbuxani *et al.*, 2003; Delavallée *et al.*, 2011), la disminución de la viabilidad no fue acompañada de activación del programa apoptótico. Esta, en principio, incongruencia, ha sido descrita previamente: es habitual que mutaciones clínicas en AIF no afecten a la apoptosis; de hecho, sólo los cambios p. R201del y p.E493V tienen efecto en este sistema de muerte celular (Ghezzi *et al.*, 2010; Sevrioukova, 2016). Con el fin de profundizar qué mecanismo era responsable de disminuir la viabilidad celular en los fibroblastos *AIFM1* c.629T>C (p.F210S), analizamos la expresión de marcadores de apoptosis (*BAX*) y de

senescencia (*P21*, *P16*), observándose que *BAX* no presentaba diferencias significativas frente al control, pero la expresión de *P21* y *P16* fue significativamente mayor en el caso de los fibroblastos SGT_361 en condiciones basales y de estrés por ROS. En conclusión, la disminución de la viabilidad sin activación de la apoptosis y el incremento de la expresión de genes como *P21* y *P16* sugerían una activación del programa senescente producto de la mutación c.629T>C (p.F210S). Este hallazgo abre una nueva vía acerca de las funciones atribuidas a AIF, entre las cuales, además de estar la apoptosis, podría estar el control de la senescencia celular.

Por otro lado, la caracterización mitocondrial de los fibroblastos del paciente no reveló diferencias en cuanto a masa (número de mitocondrias por célula) en comparación con los fibroblastos control en ninguno de los medios de cultivo utilizados (medio basal o medio de estrés mitocondrial), aunque el índice de interconectividad (área/perímetro) mitocondrial fue significativamente más bajo en los fibroblastos SGT_361, lo que indicaba una mayor fragmentación mitocondrial. Adicionalmente, se apreciaban variaciones en la morfología de las mitocondrias; en los fibroblastos del paciente, éstas eran más circulares y menos alargadas que en el control. El aumento de fragmentación se relaciona con la alteración de la dinámica mitocondrial, proceso estrictamente regulado por la fusión-fisión de las mismas y que es vital para el correcto funcionamiento del SNP (Youle and Karbowski, 2005). De hecho, genes que codifican para proteínas implicadas en dinámica mitocondrial han sido previamente asociados con CMT de tipo axonal, tales como *MFN2* o *GDAP1* (Cuesta *et al.*, 2002; Züchner *et al.*, 2004).

De igual manera, la dinámica mitocondrial está íntimamente ligada con el correcto funcionamiento de OXPHOS (*oxidative phosphorylation*), proceso en el que participa AIF. Cinco de las mutaciones clínicas reportadas en *AIFM1*, producen una disminución de OXPHOS: p.G308E, p.R201del, p.G338E, p.G262S y p.V243L (Sevrioukova., 2016). Curiosamente, tres de ellas (p.G338E, p.G262S y p.V243L) también inducen una disminución del nivel de proteína (Kettwig *et al.*, 2015; Diodato *et al.*, 2016; Sevrioukova, 2016), como ocurre con la mutación p.F210S identificada en SGT_361. Recientemente se ha descrito una mutación en la misma posición proteica (c.630C>G, p.F210L) en un paciente con polineuropatía motora-sensitiva de inicio tardío sin deterioro cognitivo (Hu *et al.*, 2017). El fenotipo clínico de este último caso es muy similar al de SGT_361, excepto por el debut a edad adulta y en la afectación sensitiva. Los autores demuestran que la patogenicidad del cambio radica en un fallo de OXPHOS provocado por un ensamblaje fallido de los complejos mitocondriales CI y CIII ocasionando una

rotura en la interacción con la óxido-reductasa MIA40 (Hu *et al.*, 2017). Existen otras evidencias previas que también conectan Aif y Mia40 en modelos de ratón, donde la deficiencia parcial de Aif provoca la deslocalización de Mia40 en mitocondria y el desensamblaje de los complejos mitocondriales CI y CIV, conduciendo a atrofia muscular y neurodegeneración progresiva (Meyer *et al.*, 2015). Pudiera ser que p.F210S dañe el funcionamiento de OXPHOS, compartiendo mecanismo con la mutación localizada en el mismo residuo proteico, p.F210L.

En conclusión, el estudio de la mutación *AIFM1* c.629T<C (p.P210S) ha evidenciado que ésta en fibroblastos del paciente conduce a: (i) alteración morfológica de la ultraestructura celular; (ii) disminución de la cantidad de AIF; (iii) descenso de la viabilidad celular por inducción de procesos senescentes; y (iv) alteración en la interconectividad y la forma mitocondrial. En su conjunto, las aproximaciones hechas *in vitro* indican que la mutación *AIFM1* c.629T<C (p.P210S) daña el correcto funcionamiento de la proteína AIF, y en tanto que mutaciones en este gen causan fenotipos clínicos similares al observado en el paciente SGT_361, podemos concluir que ésta es la mutación que conduce a la enfermedad neuromuscular de la familia fCMT_437.

C1.4.3. Mutaciones en el gen *MME*: localización y funcionalidad de neprilisina

Mutaciones transmitidas con herencia AR en el gen *MME* causan CMT2T (MIM 617017) (Higuchi *et al.*, 2016; Lupo *et al.*, 2018). En nuestro laboratorio, se identificaron 11 mutaciones (p.W24*, p.T77Lfs*, p.P156Lfs* c.196+1G>A, p.R448*, p.P556S, p.A658T, p.N689K, p.H712Y, p.R748W y p.W750Gfs*) en homocigosis o heterocigosis compuesta en nueve familias CMT2 (**Anexo 2**, Lupo *et al.*, 2018). El gen *MME* codifica la proteína NEP, metaloendopeptidasa dependiente de zinc localizada en MP que hidroliza multitud de péptidos, entre ellos: insulina, sustancia P, bradiquinina, PNA o Pβ-A (Skidgel *et al.*, 1984; Howell *et al.*, 1995; Kerr and Kenny, 2015). A pesar de conocerse la implicación de la proteólisis mediada por NEP con otras patologías, tales como, alteraciones en la presión sanguínea, renal o pulmonar (Kerr and Kenny, 2015) o diferentes tipos de cáncer (Xu *et al.*, 2001; Fabiani *et al.*, 2004; Velazquez *et al.*, 2007; Yasir *et al.*, 2012), se desconoce la fisiopatología subyacente a CMT2T.

Se ha demostrado previamente la localización de NEP en MP en células cancerígenas de próstata (Gomes *et al.*, 2003), y en concreto, en células HEK293, se ha colocalizado con subdominios de membrana ricos en lípidos (*lipid rafts*), donde se acumulan algunas de sus dianas proteolíticas (Sato *et al.*, 2012). En el presente trabajo, hemos confirmado la presencia de NEP-WT en MP, así como en vesículas citoplasmáticas, parcialmente coincidente con el marcador de endosomas tempranos EEA1. Respecto a las mutaciones clínicas investigadas, dos de ellas (p.H712Y y p.R748W) presentaban una localización idéntica a NEP-WT, mientras que las otras tres (p.R448*, p.P556S y p.N689K) inducían una disminución de la proteína en MP y un incremento de acúmulos citoplasmáticos de la misma, que parcialmente colocalizaban con los marcadores empleados para AG, RE o endosomas tempranos. Las proteínas transmembrana son sintetizadas en el citoplasma y transportadas a la MP a través de diferentes tipos de vesículas, y su reciclaje se lleva a cabo por vía endosomal, por lo que existe un tráfico continuado de las proteínas transmembrana entre diferentes orgánulos citoplasmáticos y la MP. Tanto problemas en el reciclaje, como anomalías en el correcto plegamiento de las mismas, pueden producir retenciones en orgánulos tales como AG o RE (Cournia *et al.*, 2016). Consecuentemente, las mutaciones p.R448*, p.P556S o p.N689K conducen a una retención anómala de la proteína en diferentes compartimentos, pudiendo ocasionar una disminución de NEP en la MP. Por otro lado, los hallazgos obtenidos permiten concluir que las sustituciones p.H712Y y p.R748W exhiben otro mecanismo patológico celular diferente, en tanto que la localización de la proteína no se ve alterada.

El estudio *in vitro* de la actividad proteolítica de NEP determinó la pérdida de función al expresar p.R448* y p.H712Y, y el aumento de la misma ocasionado por la mutación p.R748W, mientras que p.P556S y p.N689K presentaban una actividad semejante a NEP-WT, cuyo mecanismo de enfermedad podría estar más bien relacionado con anomalías en el transporte hacia la MP, según sugería el estudio de localización subcelular. Aproximaciones similares a las descritas previamente, identificaron *in vitro* una disminución de la actividad proteolítica de NEP al expresar las mutaciones clínicas p.T347C o p.A422D (Auer-Grumbach *et al.*, 2016). La afectación dispar de actividad enzimática causada por diferentes mutaciones en el mismo gen, no es un hecho aislado en patología humana. De hecho, efectos similares se han descrito para DLD (dihidrolipoamida deshidrogenasa), cuyas mutaciones conducen a una deficiencia que

curso con acidosis láctica, hipotonía, letargia y hepatomegalia (MIM 246900). DLD es una enzima multifuncional que cuenta con actividad proteasa y en función de la mutación, ésta puede ser menor, igual o mayor que la presente en la proteína nativa (Vaubel *et al.*, 2011). También aquí se aprecia que existen diferentes mecanismos de acción según la mutación y se evidencia que no todos están relacionados con una actividad proteasa dañada. Otro ejemplo lo encontramos en el gen *MORC2*, cuyas mutaciones causan CMT2Z (MIM 616688). En este caso se ha descrito un fenotipo clínico mucho más grave que presenta una actividad ATPasa nula causada por la mutación p.S87L, mientras que la clínica es más leve con una actividad ATPasa ligeramente reducida para la mutación p.R252W (Sancho *et al.*, 2019). O incluso pudiera ser que según la actividad de la enzima, dependiente de la localización de la mutación en la proteína, el fenotipo clínico fuera uno u otro. Es lo que sucede con el gen *PRSP1* (MIM 311850). Mutaciones en éste con herencia XR causan al menos cuatro enfermedades alélicas, dependiendo de la actividad residual de *PRSP1* (Mittal *et al.*, 2015). Si ésta está aumentada puede conducir a superactividad de PRSP1 (MIM 300661). En cambio, cuando está disminuida puede provocar CMTX5 (MIM 311070), síndrome de Arts (MIM 301835), o una sordera sensorineural no sindrómica (DFNX2; MIM 304500), originando un espectro continuo de manifestaciones en el que hay pacientes que padecen sólo una de estas condiciones o dos de ellas (DFNX2 y CMTX5; CMTX5 y síndrome de Arts) (Mittal *et al.*, 2015).

Respecto a las familias portadoras de las citadas mutaciones contenidas en el trabajo de Lupo y colaboradores (*Journal of Medical Genetics*, 2018; **Anexo 2**), se ha conseguido establecer la afectación proteica primaria al menos para dos de ellas: F1 (deslocalización parcial de NEP inducida por la mutación p.N689K y alteración de la proteólisis debido a la mutación p.R748W) y F2 (abolición completa de la función proteica y deslocalización parcial de NEP debido a la mutación p.R448* en homocigosis) (**Tabla C1.D1**). Teniendo en cuenta que las mutaciones no estudiadas que generan un codón de parada prematuro (p.W24*, p.T77Lfs*, c.196+1G>A, p.P156Lfs* y p.W750Gfs*) afectarían a la funcionalidad y localización de la proteína de forma similar a p.R448*, también podría deducirse las consecuencias proteicas para las mutaciones que presentan las familias F3, F4, F5, F6, F7 y F8 (**Tabla C1.D1**). El caso más claro de éstas últimas sería la familia F3, con la mutación p.H712Y (fallo en la proteólisis) y con p.W24*, mutación que genera un codón de parada en el inicio de la proteína. Finalmente, la familia que quedaría por resolver es la F9, para la cual hemos demostrado una

disminución de NEP en MP ocasionada por la mutación p.P556S, pero desconocemos las consecuencias en la proteína de la mutación *missense* p.A658T (Tabla C1.D1).

Tabla C1.D1. Familias CMT2T, mutaciones y consecuencias en la proteína NEP.

Familias	MME mutación I	Consecuencia	Localización NEP	Proteolisis NEP	MME mutación II	Consecuencia	Localización NEP	Proteolisis NEP
F1	p. N689K	Cambio aa	✗	✓	p.R748W	Cambio aa	✓	✗
F2	p.R448*	STOP pm	✗	✗	p.R448*	STOP pm	✗	✗
F3	p.W24*	STOP pm	-	-	p.H712Y	Cambio aa	✓	✗
F4	c.196+1G>A	STOP pm	-	-	p.R448*	STOP pm	✗	✗
F5	c.446delC	STOP pm	-	-	p.P156Lfs*	STOP pm	-	-
F6	p.R448*	STOP pm	✗	✗	p.W750Gfs*	STOP pm	-	-
F7	p.P156Lfs*	STOP pm	-	-	p.P156Lfs*	STOP pm	-	-
F8	p.T77Lfs*	STOP pm	-	-	p.R448*	STOP pm	✗	✗
F9	p.P556S	Cambio aa	✗	✓	p.A658T	Cambio aa	-	-

✓: sin alteración; ✗: dañada; NEP: neprilisina; aa: aminoácido; pm: prematuro; -: no estudiado.

En conclusión, hemos establecido una deslocalización parcial de NEP ocasionada por la sobreexpresión de las mutaciones p.R448*, p.P556S y p.N689K y una alteración significativa de la actividad proteolítica debido a las mutaciones p.R448*, p.H712Y y p.R748W, conociendo un poco más cómo afectan estos cambios a la proteína, al menos *in vitro*. Tras el descubrimiento de estos hallazgos, sería interesante trasladar aproximaciones similares a sistemas *in vivo* o *ex vivo*, confirmando la alteración de actividad proteolítica mediante ensayos enzimáticos de NEP circulante en plasma de pacientes CMT2T. Del mismo modo, técnicas proteómicas y/o peptidómicas podrían ayudar a la búsqueda de moléculas específicas hidrolizadas por NEP en SNP con el objetivo de identificar tanto marcadores pronósticos como dianas farmacológicas para los pacientes con neuropatías axonales de inicio tardío y en particular para CMT2T.

C1.5. Conclusiones

- 1.- El análisis por WES en cinco familias diagnosticadas con CMT2/NMHD, ha conducido al hallazgo de la mutación causal en la familia fCMT_436, la identificación de mutaciones candidatas en otras tres (fCMT_433, fCMT_441 y fCMT_443), y no se ha logrado ningún resultado de interés en una familia (fCMT_376).
- 2.- En la familia fCMT_433 se ha identificado la mutación c.206C>T (p.T69I) en *CADM4*, gen involucrado en la interacción axón-glía en el proceso de mielinización de los nervios periféricos, hasta la fecha no relacionado con enfermedad humana.
- 3.- La neuropatía de la familia fCMT_436 está causada por la mutación *KCNA1* c.451C>T (p.R151C) con herencia AR. Mutaciones con herencia AD en *KCNA1* conducen a ataxia episódica tipo 1, por lo que la caracterización de este nuevo caso expande la genética y la clínica de este gen.
- 4.- En la familia fCMT_441 se han identificado dos posibles mutaciones responsables de la enfermedad: *RBMS3* c.775G>A (p.A259T) y *FRS3* c.353T>G (p.I118S). *RBMS3* es una *RNA binding protein*, y muchas de ellas desempeñan un papel en neurodegeneración, y en cuanto a *FRS3*, se le atribuyen funciones relacionadas con el citoesqueleto neuronal.
- 5.- El estudio de la familia fCMT_443 ha conducido al hallazgo de dos variantes candidatas de producir la neuropatía: *FHL1* c.19T>G (p.S7P) y *SIRT1* c.403G>A (p.A135T). Mutaciones en *FHL1* causan diferentes tipos de miopatías y *SIRT1* ha sido relacionado con neurodegeneración.
- 6.- En la familia fCMT_376 no hemos conseguido identificar candidatos que cosegregaran con la patología.
- 7.- El análisis del impacto de la mutación novel *AIFM1* c.629T<C (p.P210S) en fibroblastos de paciente ha revelado una alteración morfológica celular, una disminución en la cantidad de proteína, un descenso de la viabilidad por inducción de procesos senescentes, y un fallo en la interconectividad mitocondrial. Estos hallazgos, establecen que la mutación es la causante del trastorno neuromuscular del probando y abren nuevas vías de estudio en la fisiopatología asociada a este gen.
- 8.- Estudios *in vitro* de cinco mutaciones en el gen *MME* identificadas en pacientes CMT2T, han resultado en la deslocalización parcial de neprilisina para tres de ellas (p.R448*, p.P556S y p.N689K) y en la alteración de la actividad proteolítica en otras tres (p.R448*, p.H712Y y p.R748W). Por ello, se ha demostrado que tanto alteraciones en la localización como en la actividad enzimática de la proteína pueden contribuir al mecanismo patológico de las mutaciones causantes de CMT2T.

CAPÍTULO 2

“DE LAS BASES MOLECULARES AL FENOTIPO CELULAR Y BIOQUÍMICO: FISIOPATOLOGÍA DE CMT2Z”

C2.1. Introducción

C2.1.1. *MORC2* y CMT2Z

Mediante estudios de WES se identificó la mutación novel c.754C>T (NM_001303256.3) en heterocigosis en el gen *MORC2* en una familia con diagnóstico de CMT2 (fCMT_237). Posteriormente, tras el cribado de la mutación en familias CMT2 pendientes de diagnóstico, se identificó una segunda familia con el mismo cambio (fCMT_197) (**Figura C2.II**; Sevilla *et al.*, 2016). Esta variante conduciría a un cambio de una arginina por un triptófano en posición 252 de la proteína *MORC2* (p.R252W, NP_001290185).

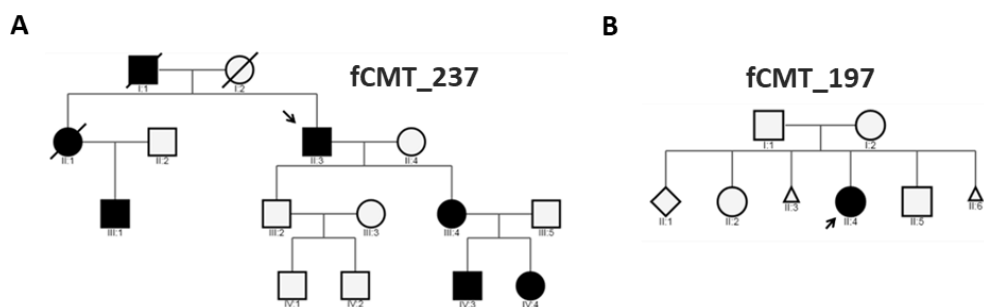


Figura C2.II. Árboles genealógicos de las familias con la mutación c.754C>T (p.R252W) en el gen *MORC2*: fCMT_237 (A) y fCMT_197 (B). La flecha indica al probando.

Desde su publicación (Sevilla *et al.*, 2016), el número de casos ha ido en aumento y a esta nueva forma de CMT axonal debida a mutaciones en el gen *MORC2* se le ha llamado CMT2Z (MIM 616688). De hecho, la neuropatía CMT2Z se podría considerar como una de las formas axonales más frecuentes de CMT, junto a los subtipos CMT2A2 (MIM 609260) y CMT2K (MIM 607831), causados por mutaciones en el gen *MFN2* y *GDAP1*, respectivamente (Timmerman *et al.*, 2014; Pareyson *et al.*, 2017). En total, se han descrito 33 familias con mutaciones en *MORC2*, siendo 10 los cambios identificados y distribuidos a lo largo del gen (Albulym *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016; Hyun *et al.*, 2016; Laššuthová *et al.*, 2016; Schottmann *et al.*, 2016; Sevilla *et al.*, 2016; Ando *et al.*, 2017; Bansagi *et al.*, 2017; Semplicini *et al.*, 2017; Zanni *et al.*, 2017). Asimismo, de los 10 cambios reportados, la mutación identificada en las familias fCMT_237 y fCMT_197 (c.754C>T, p.R252W), es la más frecuente.

Respecto a la clínica descrita en los pacientes con mutaciones en *MORC2*, todos muestran afectación motora y sensitiva, no obstante, el inicio y la gravedad, así como la aparición de síntomas específicos asociados, es dispar en función de la mutación (**Tabla C2.I1**). De este modo, para la mayor parte de las mutaciones, el inicio de la patología comienza en la segunda década de vida y los pacientes presentan una afectación motora inicial y sensitiva más tardía. La sintomatología CMT2Z es similar a la referida a un CMT2 de predominio motor, con afectación de las extremidades inferiores (debilidad y deformaciones en tronco inferior). Además, con el progreso de la patología, prácticamente todos los pacientes cursan con alteraciones en las extremidades superiores y debido a la rápida progresión de la atrofia en extremidades inferiores, suele ser necesario el empleo de silla de ruedas para desplazarse. Especialmente acusado es el fenotipo de los pacientes portadores de las mutaciones p.S87L y p.T424R, con un cuadro clínico de AME congénito con signos adicionales tales como atrofia del cerebelo, cataratas o parálisis diafragmática (Hyun *et al.*, 2016; Schottmann *et al.*, 2016; Sevilla *et al.*, 2016).

Tabla C2.I1. Espectro clínico de la neuropatía CMT2Z.

Mutación	Inicio	Fenotipo	Características y/o síntomas adicionales
p.S87L	Congénito	AME	Afectación de la primera motoneurona, retraso en el desarrollo, cataratas.
p.R132L	Segunda década	CMT2	Afectación sensitivo-motora distal y proximal.
p.E236G	Segunda década	CMT2	Afectación sensitivo-motora distal y proximal.
p.R252W	Segunda década	CMT2	Afectación sensitivo-motora distal y proximal.
p.Q400R	Segunda década	CMT2	Afectación sensitivo-motora distal y proximal.
p.A406V	Segunda década	CMT2	Afectación sensitivo-motora distal y proximal (a nivel escapuloperoneal).
p.C407T	Segunda década	CMT2	Afectación sensitivo-motora distal y proximal.
p.T424R	Congénito	AME	Afectación de la primera motoneurona, retraso en el desarrollo, atrofia de cerebelo, parálisis diafragmática.
p.A431V	Segunda década	CMT2	Afectación sensitivo-motora distal y proximal.
p.D466N	Segunda década	CMT2	Afectación sensitivo-motora distal y proximal

AME: atrofia muscular espinal; CMT2: Charcot-Marie-Tooth axonal.

C2.1.2. Funciones de las proteínas MORC

MORC2 pertenece a la familia de proteínas microrchidia (MORC), de la cual se conocen cuatro miembros en humanos (Wang *et al.*, 2010). Las proteínas MORC presentan tres estructuras altamente conservadas en eucariotas: dominio ATPasa tipo GHL (*Gyrase B*, *Hsp90*, *MutL*) en la zona N-ter, dominio de interacción con DNA tipo *zinc finger* (CW) y un número variable de dominios de tipo *coiled-coil* (CC), posiblemente asociados con procesos de metilación de DNA y cromatina (Mackay *et al.*, 1999; Dutta and Inouye, 2000; Perry, 2003). De las cuatro proteínas MORC, MORC2 tiene una secuencia aminoacídica más larga, presentando un dominio GHL-ATPasa mayor. Además, cuenta con tres dominios adicionales: uno CC, y dos predichos que consisten en una zona con similitud a la proteína ribosomal S5 (S5) y un cromó-dominio (CD) de interacción proteica en la zona C-ter (**Figura C2.I2**).

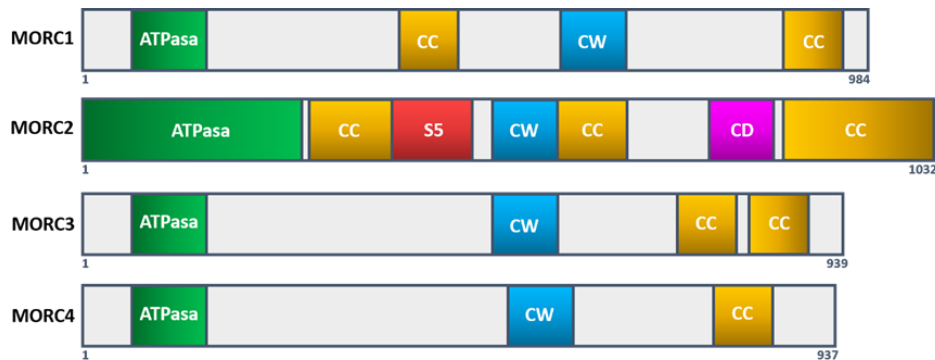


Figura C2.I2. Representación esquemática de los dominios funcionales de las proteínas de la familia MORC. MORC1 (NP_055244), MORC2 (NP_001290185), MORC3 (NP_056173), MORC4 (NP_078933). CC: dominios *coiled-coil*; CW: dominios *zinc finger CW-type*; CD: cromó-dominio; S5: dominio con similitud a la proteína ribosomal S5.

C2.1.2-1. Funciones de MORC1, MORC3 y MORC4

En cuanto a las funciones atribuidas a las proteínas MORC, generalmente se relacionan con la remodelación de la cromatina en respuesta a señales epigenéticas tales como modificación de histonas y metilación del DNA (Iyer *et al.*, 2008). En el caso particular de MORC1, se expresa en células germinales de los testículos de los roedores y está implicado en espermatogénesis. Estudios en el ratón KO de *Morc1* establecen que los machos presentan esterilidad, posiblemente debida a una activación de la vía apoptótica en las células testiculares (Inoue *et al.*, 1999). Posteriormente, se ha implicado a MORC1 con la regulación epigenética en la línea germinal masculina, actuando como represor de transposones con un patrón similar al observado para células germinales deficientes para

la DNA metil-transferasa DNMT3L (Pastor *et al.*, 2014). Además, la ausencia de *Morc1* en hembras de ratón KO, parece estar relacionada con procesos depresivos (Schmidt *et al.*, 2016). En cuanto a MORC3, se ha establecido que a través de su actividad ATPasa juega un papel regulador de p53 mediante su reclutamiento en los cuerpos nucleares de PML (*promyelocytic leukemia*) que induciría senescencia celular (Mimura *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2007;). Por otro lado, la sobreexpresión de MORC4 se considera un biomarcador de linfoma difuso de células B grandes y linfoma de Hodgkin (Liggins *et al.*, 2007), y recientemente se ha establecido el papel oncogénico de MORC4 en cáncer de mama dónde su sobreexpresión se asocia con una baja supervivencia (Yang, 2018).

C2.1.2-2. Funciones de MORC2

MORC2 es una proteína expresada en diversos tejidos, siendo predominante su presencia en testículo, ovario y cerebro (Wang *et al.*, 2010). Se le han atribuido funciones diversas y dispares, habitualmente investigadas en relación con procesos cancerígenos. En particular, se ha relacionado con cáncer gástrico (Shao *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; Tong *et al.*, 2015, 2018; Wang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2018), de mama (Sánchez-Solana *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2017), hepático (Pan *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018), colorrectal (Liu *et al.*, 2019) y de pulmón (Liu *et al.*, 2018). De hecho, recientemente la sobreexpresión de MORC2 ha sido asociada con una evolución clínica desfavorable en múltiples tipos de cáncer (Ding *et al.*, 2018).

MORC2 actúa como sustrato de fosforilación de la quinasa PAK1 (*p21-activated kinase 1*) en células gástricas cancerosas (Li *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015). La fosforilación en la serina en posición 677 de MORC2 por parte de PAK1 es promovida por procesos de estrés extracelular y/o nuclear, tales como daño en el DNA. MORC2 fosforilado es capaz de activar una cascada de señalización que acaba con la fosforilación en la serina 139 de la histona H2AX (γ H2AX), que a su vez induce la activación de mecanismos de reparación de DNA.

MORC2 desempeña un papel intracelular en la activación de la *ATP-citrate lyase* (ACLY) en células derivadas de cáncer de mama (Sánchez-Solana *et al.*, 2014). En este proceso, la activación citosólica de ACLY, conduce a la formación del metabolito central de la bioquímica celular, acetil-coA, implicado en rutas tales como lipogénesis, colesterogénesis o metabolismo de hidratos de carbono.

Como represor transcripcional, MORC2 actúa sobre *ArgBP2* mediante el reclutamiento de EZH2 y HSF1 en células de tumor gástrico (Tong *et al.*, 2015, 2018).

ArgBP2 es un supresor de tumores, implicado en la organización del citoesqueleto de actina y en procesos de adhesión celular. Además, en células de cáncer de mama, se ha establecido que MORC2 promueve la invasión tumoral mediante la interacción con CTNND1 (Liao *et al.*, 2017), y en cáncer de pulmón, MORC2 induce la expresión de factores de crecimiento endoteliales de angiogénesis y con ello, conduce a aumentar la supervivencia del tumor y su capacidad metastásica (Liu *et al.*, 2018). Del mismo modo, la represión génica mediada por MORC2 se ha identificado en varias vías intra-celulares diferentes. Entre ellas, reprime a CAIX mediante el reclutamiento de la histona HDAC4 en células de tumor gástrico. La ausencia de CAIX, marcador de hipoxia, promueve el crecimiento y la supervivencia del tumor (Shao *et al.*, 2010). Por otro lado, y también en cáncer gástrico, MORC2 reprime la expresión de *p21Waf1/Cip1* mediante el reclutamiento de la histona HDAC1 a su promotor (Zhang *et al.*, 2015). El silenciamiento de $p21^{Waf1/Cip1}$, un regulador clave de la supervivencia celular, causa la proliferación de las células cancerosas sin control por parte de los sistemas de arresto de ciclo celular. Adicionalmente, MORC2 reprime al supresor metastásico *NDRG1* mediante el reclutamiento de SIRT1 en células de cáncer colorrectal (Liu *et al.*, 2019).

Dentro de su papel como modulador de la expresión génica, recientemente se ha demostrado que MORC2 actúa como molécula clave en el silenciamiento génico mediado por el complejo HUSH (*human silencing hub*) (Tchasovnikarova *et al.*, 2017). Éste está formado por las proteínas TASOR, MPP8 y periphilin-1 y, lleva a cabo el reclutamiento de la metil-transferasa SETDB1 en zonas de heterocromatina. La actuación conjunta del complejo, resulta en la adición de señales epigénéticas tales como trimetilaciones en la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3), que contribuyen al mantenimiento de la represión transcripcional de esas zonas (Tchasovnikarova *et al.*, 2015). Se ha demostrado que el complejo HUSH, además de interactuar con SETDB1, recluta a MORC2. De forma que, la pérdida de MORC2 provoca la descompactación de estas zonas de heterocromatina y una disminución de H3K9me3, resultando en la desregulación de múltiples genes contenidos en dichas regiones. Por último, los autores establecieron *in vitro* que la mutación p.R252W genera una ganancia de función de la represión mediada por el complejo HUSH en células SK.N.SH, indicando que los genes mayoritariamente reprimidos por p.R252W son de la familia de factores transcripcionales *zinc-finger* (ZNF) (Tchasovnikarova *et al.*, 2017).

C2.2. Hipótesis y objetivos

La caracterización de genes es esencial para establecer las bases moleculares de las enfermedades monogénicas y con ello, mejorar nuestra comprensión de los mecanismos de enfermedad subyacentes. Es básico entender la fisiopatología para identificar dianas terapéuticas y con tiempo, lograr un tratamiento efectivo. En la neuropatía de CMT hay más de 80 genes implicados que cuando están mutados causan cuadros clínicos muy similares. Por este motivo, es igualmente importante establecer conexiones entre los genes implicados en CMT con el propósito de lograr una terapia común al mayor número posible de formas clínicas.

El **objetivo general** de este capítulo es la caracterización funcional de MORC2 con el fin de esclarecer cuál es su papel en la biología y fisiopatología del nervio periférico, mediante el estudio de las consecuencias de la mutación más frecuente, p.R252W, y la asociada con la clínica más severa, p.S87L. Los **objetivos específicos** son:

- 1.- Caracterizar la expresión de MORC2 en SN mediante la determinación del perfil espacio-temporal de expresión génica y proteica del ortólogo de ratón *Morc2*, el establecimiento de la isoforma transcripcional predominante de *MORC2* en tejido nervioso humano, y el análisis de localización de MORC2 en las terminaciones nerviosas sensoriales de biopsias de piel.
- 2.- Identificar las vías de patogenicidad alteradas en CMT2Z mediante estudios bioquímicos de la función ATPasa y análisis transcriptómicos en dos modelos: fibroblastos de pacientes CMT2Z y neuronas sensoriales de rata.

C2.3. Resultados

C2.3.1. Cribado mutacional de *MORC2*

En nuestro laboratorio, se identificó por primera vez una mutación en *MORC2* en pacientes CMT2: c.568C>T (p.R190W) en el exón 10 del gen (NM_014941.3, NP_055756) (Sevilla *et al.*, 2016). En el transcrito NM_014941.3 (GRCh37), el exón 10 formaba parte de los exones codificantes del dominio ATPasa, el cual se extendía desde el exón 5 hasta el exón 11. En la versión GRCh38 del genoma humano se anotó una nueva isoforma transcripcional codificante de *MORC2* (NM_001303256.3, NP_001290185), que incluía 186 nucleótidos más en el extremo 5'. La adición de nucleótidos suponía una secuencia aminoacídica más larga en N-ter (+62 aminoácidos) respecto a NP_055756, formando parte del dominio ATPasa. Del mismo modo, la nomenclatura de las mutaciones y su posición exónica también se modificaron con esta nueva isoforma NM_001303256.3 (NP_001290185), y por ende, la mutación c.568C>T (p.R190W) pasó a ser nombrada c.754C>T (p.R252W) y a estar localizada en el exón 9.

Con el objetivo de identificar más familias con mutaciones en *MORC2*, se llevó a cabo un cribado mutacional mediante secuenciación *Sanger* de los exones codificantes del dominio ATPasa del gen *MORC2* en 74 probandos con CMT2 pertenecientes a nuestra serie clínica sin diagnóstico genético. Tras este estudio, conseguimos identificar dos casos más: la familia fCMT_440 (**Figura C2.R1-A**) portaba el mismo cambio en heterocigosis identificado en las familias fCMT_237 y fCMT_197 (*MORC2* c.754C>T, p.R252W), y en la familia fCMT_438 (**Figura C2.R1-B**) se detectó una mutación novel en heterocigosis en el exón 5 de *MORC2* (c.260C>T, p.S87L). En paralelo, en nuestro laboratorio, el estudio genético del resto de exones de *MORC2* en pacientes con CMT2 sin diagnóstico genético, se realizó mediante panel de genes de diseño propio dirigido al estudio de pacientes con CMT y NMHD (Neuro_104, **Anexo 1**), y versiones posteriores de éste, que también incluían genes implicados en ELA (Neuro_111 y Neuro_120, **Anexo 1**). Con esta herramienta diagnóstica, secuenciamos todos los exones codificantes de la isoforma NM_001303256.3 con una cobertura mínima por intervalo exónico >100X. De este modo, en la serie global de CMT2, se identificó una quinta familia (fCMT_154) con una mutación novel: c.1220G>A (p.C407T) en el exón 14 de *MORC2* (**Figura C2.R1-C**).

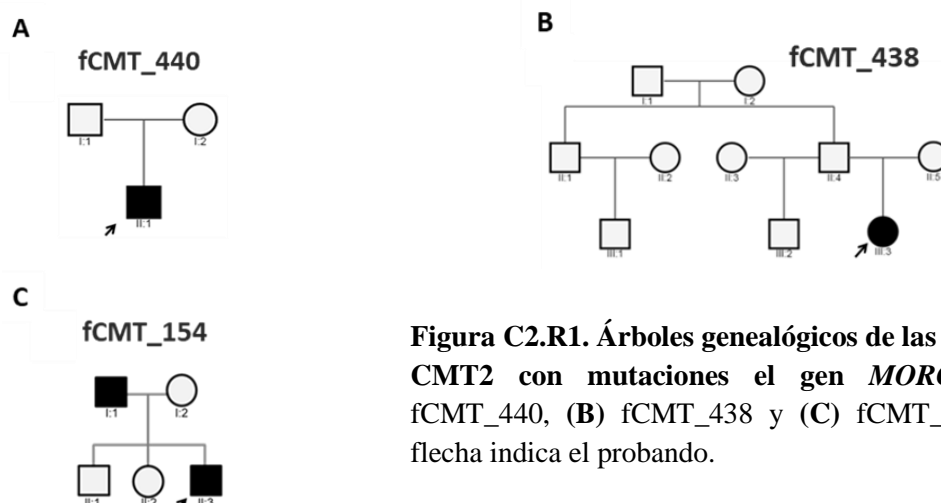


Figura C2.R1. Árboles genealógicos de las familias CMT2 con mutaciones el gen *MORC2*. (A) fCMT_440, (B) fCMT_438 y (C) fCMT_154. La flecha indica el probando.

La evaluación de las consecuencias fenotípicas de las tres mutaciones identificadas en *MORC2* sobre el procesamiento del mRNA o sobre la proteína, se realizó mediante estudios *in silico* (Tabla C2.R1), que indicaban que las variantes p.S87L y p.R252W podrían tener un efecto deletéreo sobre la funcionalidad de MORC2 para la mayoría de herramientas utilizadas. La variante c.1220G>A (p.C407T) mostraría un nivel de patogenicidad cuestionable, con resultados diferentes según el algoritmo empleado. El análisis *in silico* de las variantes c.260C>T y c.1220G>A descartó que alteraran el *splicing*, mientras que para c.754C>T el resultado no fue concluyente, ya que uno de los cuatro programas utilizados indicaba que podría causar alteración del procesamiento transcripcional (Tabla C2.R1).

Tabla C2.R1. Predicción de patogenicidad de las mutaciones identificadas en el gen *MORC2*.

		NM_001303256.3	c.260C>T	c.754C>T	c.1220G>A
		NP_001290185	p.S87L	p.R252W	p.C407T
		GRCh38	22:30949809	22:30941503	22:30937685
Predictores de patogenicidad	Proteína	<i>Mutation Taster</i>	0,99 (Patológico)	0,99 (Patológico)	0,99 (Patológico)
		<i>PolyPhen2</i>	1 (Probablemente patológico)	1 (Probablemente patológico)	0,919 (Posiblemente perjudicial)
		<i>PROVEAN</i>	-5,59 (Deletéreo)	-3,48 (Deletéreo)	-5,91 (Deletéreo)
		<i>SIFT</i>	0,01 (No tolerado)	0,09 (Tolerado)	0,50 (Tolerado)
	<i>Splicing</i>	<i>HSF-Human</i>	No alteración	Posible alteración	No alteración
		<i>Netgene2</i>	No alteración	No alteración	No alteración
		<i>NNSplice</i>	No alteración	No alteración	No alteración
		<i>Spliceview</i>	No alteración	No alteración	No alteración

De las 10 mutaciones clínicas detectadas en pacientes CMT2Z, la más frecuente es c.754C>T (p.R252W) con 17 familias descritas (**Figura C2.R2-A**); siendo importante destacar que en 15 de ellas, este cambio fue *de novo*. Las variantes c.260C>T (p.S87L) y c.1199A>G (p.Q400R) se han identificado en tres familias no relacionadas. El resto de mutaciones estaban distribuidas en una o dos familias (**Figura C2.R2-A**). En relación a la posición proteica de los cambios identificados, cuatro de las mutaciones se localizan en el dominio ATPasa N-ter de MORC2 (p.S87L, p.R132L, p.E236G y p.R252W), mientras que las otras seis (p.Q400R, p.A406V, p.C407T, p.T424R, p.A431V y p.D466N) se posicionan cerca de este dominio, entre el primer CC (CC1) y el dominio CW, en la zona con similitud a la proteína ribosomal S5 (**Figura C2.R2-B**).

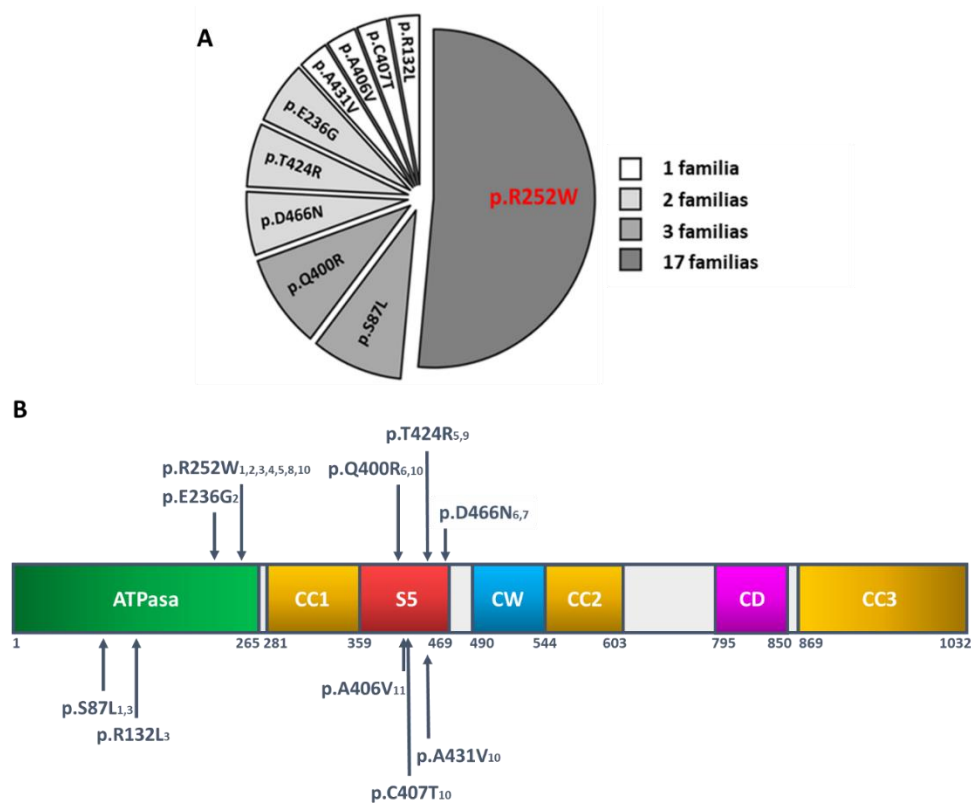


Figura C2.R2. Genética CMT2Z: familias y mutaciones. (A) Distribución de las mutaciones identificadas en las familias CMT2Z descritas. (B) Representación esquemática de la estructura proteica de MORC2 y la localización de las mutaciones clínicas. CC1/2/3: dominios *coiled-coil* 1, 2 o 3; CW: dominio *zinc finger CW-type*; CD: cromo-dominio; S5: dominio con similitud a la proteína ribosomal S5. ₁Sevilla *et al.*, 2016; ₂Albulym *et al.*, 2016; ₃Hyun *et al.*, 2016; ₄Lassuthova *et al.*, 2016; ₅Schottmann *et al.*, 2016; ₆Zhao *et al.*, 2016; ₇Semplicini *et al.*, 2017; ₈Bansagi *et al.*, 2017; ₉Zanni *et al.*, 2017; ₁₀Ando *et al.*, 2017; ₁₁Frasquet *et al.*, 2018.

C2.3.2. Análisis de las isoformas transcripcionales del gen *MORC2*

Para determinar qué isoforma de *MORC2* es la más abundante en tejidos y células neurales se llevó a cabo una amplificación por qPCR utilizando cebadores específicos para cada uno de los dos transcritos conocidos: NM_014941.3 y NM_00133256.3. Para ello, se diseñaron cebadores teniendo en cuenta la zona diferencial de ambas isoformas: NM_014941.3 presenta un codón de inicio ATG más tardío que NM_00133256.3 debido a la presencia de varios codones de parada entre los nucleótidos 466 y 1332 de su pauta de lectura, región ausente en NM_00133256.3. De modo que, se diseñó la pareja de cebadores h*MORC2*_1 (1D-1R) que amplificaba las dos isoformas con diferente tamaño, y las parejas h*MORC2*_2 (2D-2R) y h*MORC2*_3 (3D-3R), que amplificaban NM_00133256.3 y NM_014941.3, respectivamente (**Figura C2.R3**).

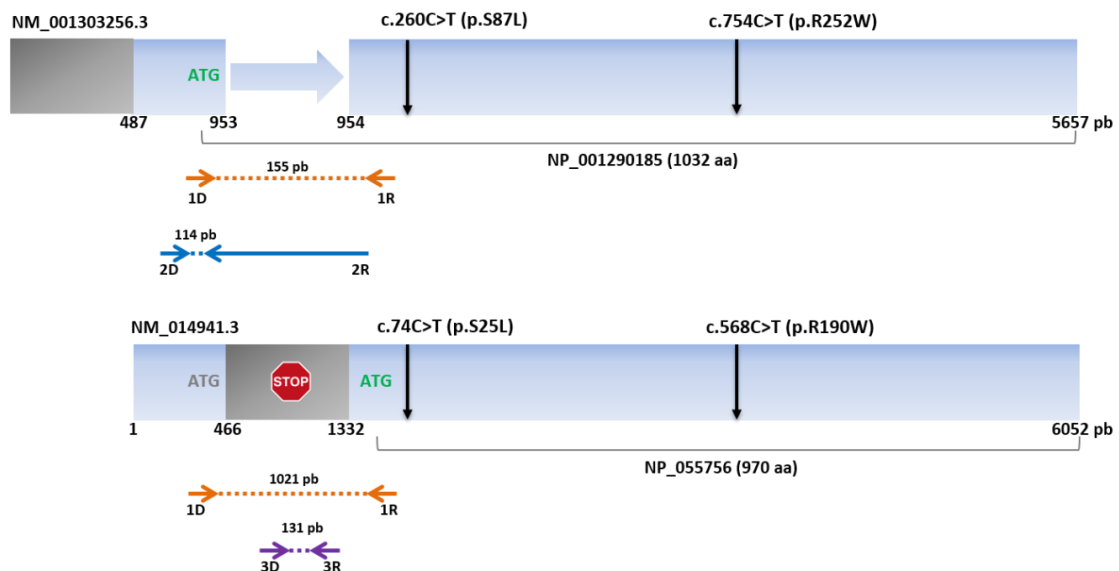


Figura C2.R3. Representación esquemática de las dos isoformas transcripcionales del gen *MORC2*. La pareja de cebadores h*MORC2*_1 (1D-1R) amplifica las dos isoformas si bien los amplicones resultantes tienen diferentes tamaños (155 pb para NM_001303256.3 y 1.021 pb para NM_014941.3), h*MORC2*_2 (2D-2R) amplifica 114 pb de la isoforma NM_001303256.3 y h*MORC2*_3 (3D-3R), 131 pb de la isoforma NM_014941.3. pb: pares de bases.

Para establecer qué isoforma específica se expresa en el contexto neuronal, el estudio se realizó a partir de cDNA de ganglios de la raíz dorsal (DRGs; *dorsal root ganglion*) de fetos humanos abortados y de diferentes secciones lumbares y cervicales de médula espinal de individuos adultos *postmortem*. En ambos casos, la isoforma predominante en tejido nervioso resultó ser NM_001303256.3 (**Figura C2.R4**).

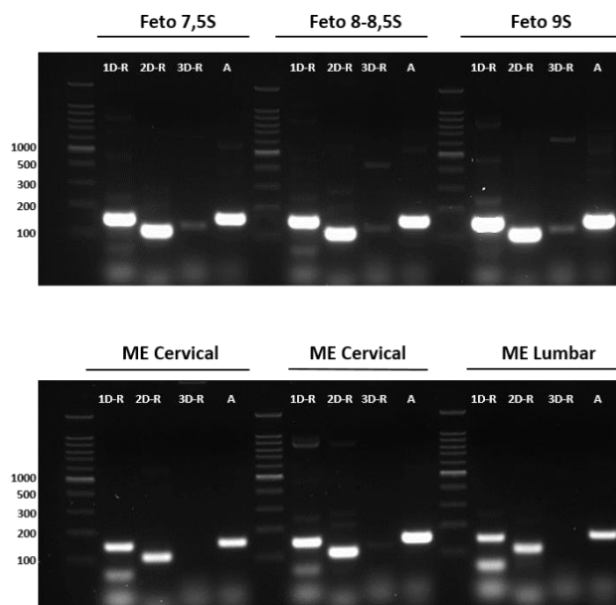


Figura C2.R4. Análisis de la expresión de las isoformas transcripcionales de *MORC2* en tejido nervioso. qPCR a partir de cDNA procedente de DRGs de fetos abortados de diferentes edades (7,5, 8-8,5 y 9 semanas) y a partir de secciones cervicales y lumbares de médula espinal de individuos adultos. 1D-1R: *hMORC2_1*; 2D-2R: *hMORC2_2*; 3D-3R: *hMORC2_3*; A: *actina*.

Para validar estos resultados en muestras de pacientes, se realizó el mismo estudio, pero utilizando cDNA de diferentes líneas de fibroblastos CMT2Z. Los resultados obtenidos confirmaron que NM_001303256.3 es el transcrito predominante (**Figura C2.R5**). A partir de este resultado, quedó establecida esta isoforma como la forma canónica del gen *MORC2* en tejido nervioso y en fibroblastos humanos, y por tanto, todos los estudios se realizaron utilizando dicho transcrito.

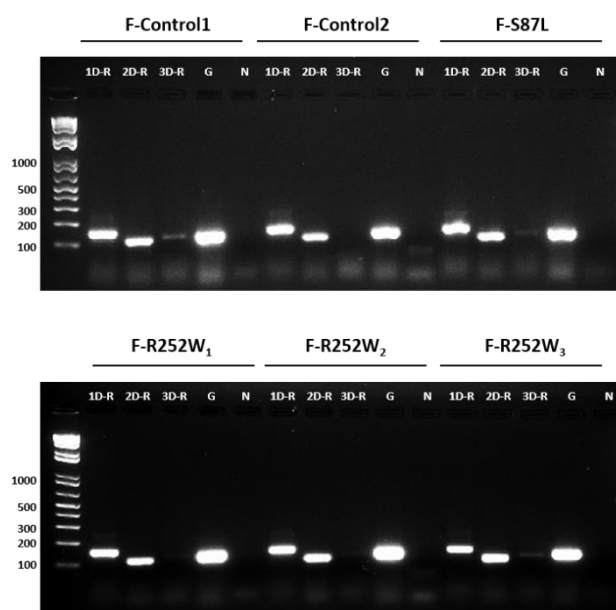


Figura C2.R5. Análisis de la expresión de las isoformas transcripcionales de *MORC2* en fibroblastos. qPCR a partir de cDNA procedente de fibroblastos control y CMT2Z: F-S87L, F-R252W₁, F-R252W₂ y F-R252W₃. 1D-1R: *hMORC2_1*; 2D-2R: *hMORC2_2*; 3D-3R: *hMORC2_3*; G: *GAPDH*; N: blanco.

C2.3.3. Estudio del efecto de la variante *MORC2* c.754C>T sobre el procesamiento del mRNA

A pesar que la mayoría de los programas *in silico* no revelaban un posible efecto deletéreo sobre el procesamiento del mRNA de *MORC2*, el programa “HSF Human” predecía una posible ruptura del sitio donador canónico del exón 9 debido a la mutación c.754C>T (p.R252W). Para clarificar este aspecto, se realizó un estudio de minigenes, para el cual se clonó el exón 9 de *MORC2* con parte de sus intrones flanqueantes en el vector pSPL3. El experimento se planteó partiendo de dos hipótesis (**Figura C2.R6**): procesamiento correcto (el amplicón resultante incluiría las 126 pb del exón y tendría un tamaño de 389 pb) o procesamiento anómalo (sería debido a un *skipping* completo del exón y el amplicón sólo incluiría secuencia del vector, con un tamaño de 263 pb).

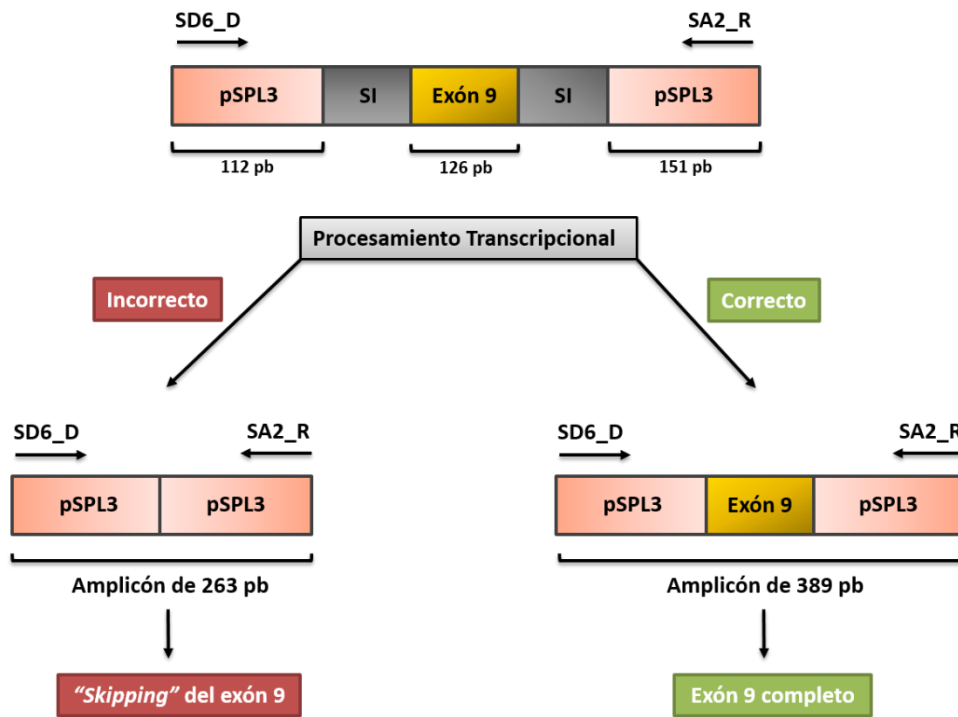


Figura C2.R6. Planteamiento esquemático de los resultados posibles en el experimento de minigenes del exón 9 de *MORC2*. pSPL3: vector donde se ha clonado el fragmento génico de *MORC2*; SI: secuencias intrónicas flanqueantes al exón 9; SD6_D, SA2_R: cebadores incluidos en el vector; pb: pares de bases.

El amplicón resultante del plásmido pSPL3_*MORC2*-WT tenía el tamaño esperado en el procesamiento correcto del exón, 389 pb. Sin embargo, en el caso del plásmido pSPL3_*MORC2* mutante (que incluía la mutación c.754C>T), se distinguían tres bandas: una coincidente con el procesamiento correcto (389 pb), otra correspondiente al *skipping* completo del exón 9 (263 pb), y una inferior a la banda de 389 pb que podría

corresponder a otro procesamiento aberrante (**Figura C2.R7**). Posteriormente, se validó el resultado de la qPCR por secuenciación *Sanger*, confirmando que la banda de 389 pb incluía el exón 9 completo y que la banda de 263 pb sólo contenía secuencia del vector. No obstante, no fue posible leer correctamente la banda intermedia obtenida en el mutante, ya que el electroferograma parecía mostrar una mezcla de amplificaciones, y consecuentemente, sería el resultado de una mezcla de amplicones hibridados.

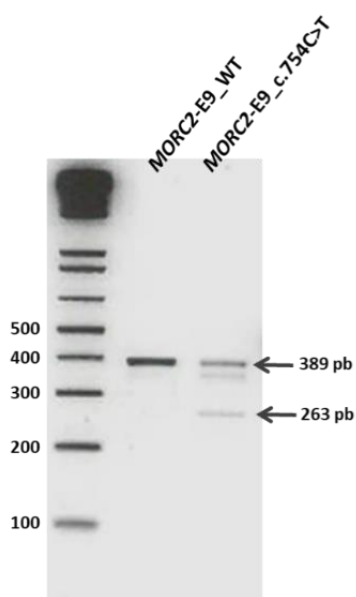


Figura C2.R7. Estudio del procesamiento transcripcional del exón 9 de *MORC2* por minigenes. qPCR de células HeLa transfectadas con pSPL3_*MORC2*-WT y mutante (c.754C>T). Se indica el tamaño de las bandas obtenidas: 389 pb para el procesamiento correcto del exón 9 y 263 pb para el *skipping* completo del exón.

Con el fin de comprender qué estaba ocurriendo en contexto fisiológico, se llevó a cabo una amplificación de cDNA obtenido de tres líneas de fibroblastos de diferentes pacientes con la mutación c.754C>T (F-R252W₁, F-R252W₂ y F-R252W₃) y de dos líneas de fibroblastos control (F-Control₁, F-Control₂) (**Figura C2.R8**). Los cebadores utilizados para amplificar el cDNA de fibroblastos, estaban localizados en el exón 7 (h*MORC2*_cDNA_E7_D) y el exón 11 (h*MORC2*_cDNA_E11_R), de forma que se incluía la secuencia completa del exón 9 y dos exones adyacentes a cada lado. En este caso, si el procesamiento del exón fuera correcto, el tamaño del amplicón sería 429 pb, y por el contrario, si hubiera un *skipping* del exón, el tamaño esperado sería 303 pb (**Figura C2.R8-A**). Este estudio reveló que el procesamiento transcripcional del exón 9 en fibroblastos de pacientes CMT2Z portadores de la mutación c.754C>T fue correcto, con un tamaño de amplificación de 429 pb (**Figura C2.R8-B**). La integridad completa del exón 9 y la posición del cambio en heterocigosis se corroboraron por secuenciación *Sanger*, y consecuentemente, pudimos concluir que la mutación *MORC2* c.754C>T no altera el *splicing*.

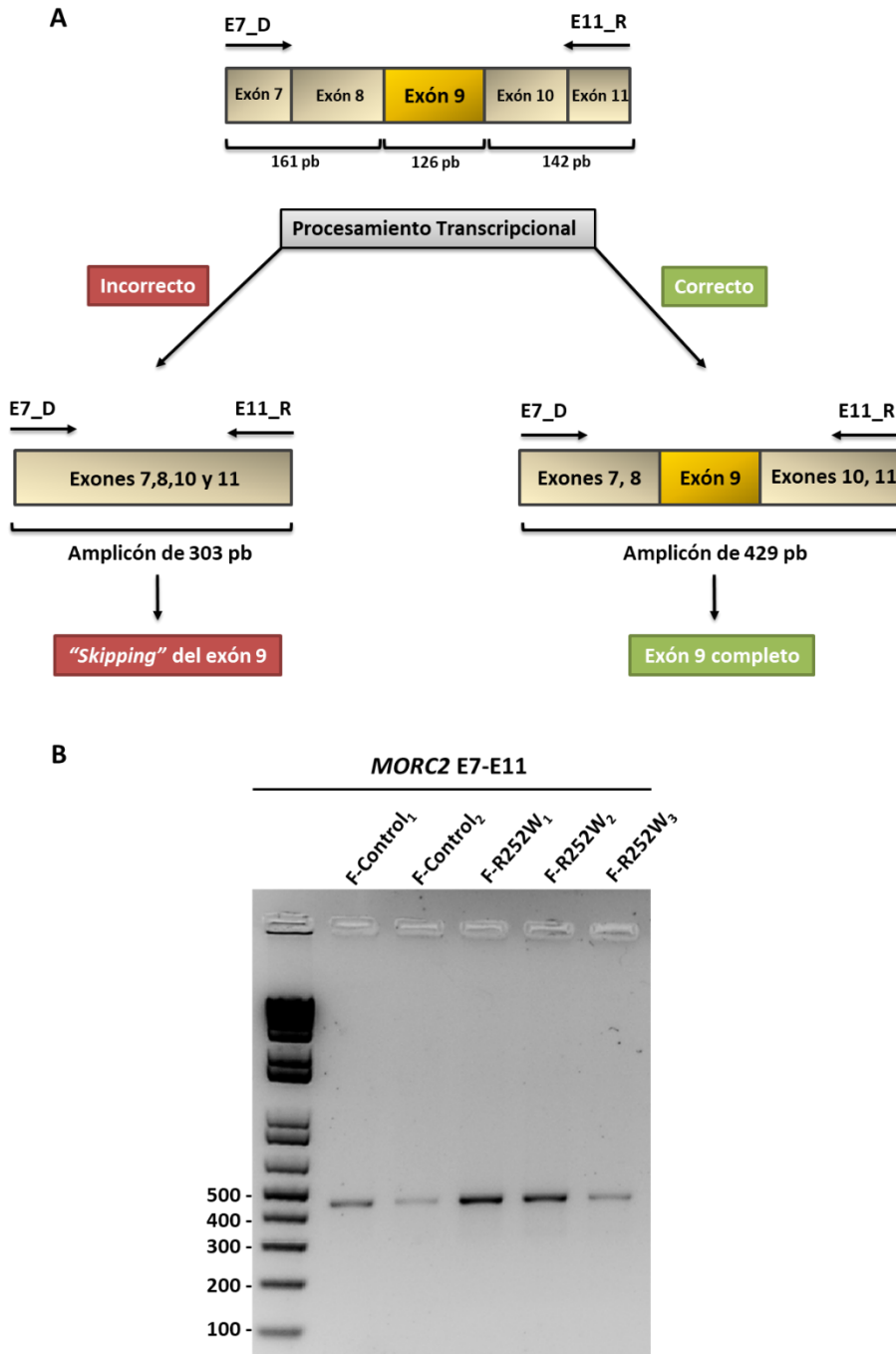


Figura C2.R8. Análisis de integridad del exón 9 de *MORC2* en fibroblastos. (A) Planteamiento esquemático de los resultados posibles en el procesamiento transcripcional del exón 9 de *MORC2*. 7D: h*MORC2*_cDNA_E7_D; 11R: h*MORC2*_cDNA_E11_R. (B) qPCR a partir de cDNA de fibroblastos control y fibroblastos CMT2Z portadores de la mutación c.754C>T (p.R252W) en el gen *MORC2*. La banda obtenida en todos los casos tiene un tamaño de 429 pb, correspondiente a un procesamiento correcto del exón 9 de *MORC2*.

C2.3.4. Estudio de expresión espacio-temporal de Morc2/MORC2

C2.3.4-1. Tejidos murinos

El análisis mediante WB reveló una expresión ubicua de Morc2 en todos los tejidos de ratón analizados, incluyendo los de origen nervioso (**Figura C2.R9**). La confirmación de que el anticuerpo policlonal utilizado (Anti-MORC2, Santa Cruz Biotechnology) reconocía de manera específica la proteína se llevó a cabo mediante silenciamiento transitorio de *MORC2* en células HeLa con si-RNA específico (Dharmacon) (**Anexo 3**).

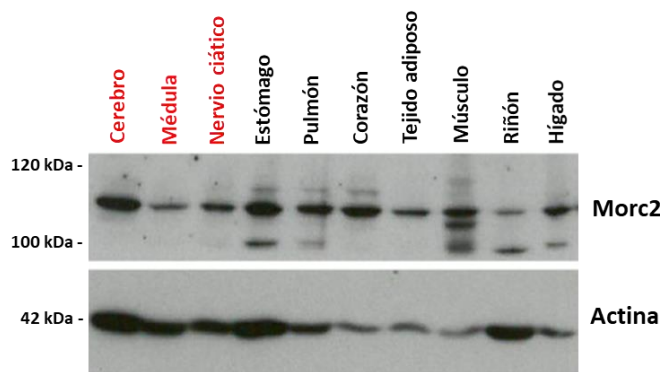


Figura C2.R9. Análisis de la expresión proteica de Morc2 en tejidos murinos. Los tejidos empleados provenían de ratones a día P120. Los tejidos de origen nervioso se destacan en color rojo. La actina se utilizó como control de carga.

En paralelo, estudios de RT-PCR ratificaron la expresión del ortólogo de *MORC2* (*Morc2a*) en cerebro, médula espinal y nervio ciático, y mostraron que *Morc2a* también era expresado en DRGs, así como en cultivos primarios de neuronas y células de Schwann (**Figura C2.R10-A**). Esta primera aproximación, señalaba una posible regulación temporal de *Morc2a*, con expresión predominante en momentos prenatales y primeros días postnatales (**Figura C2.R10-A**). Por ello, se realizó un estudio temporal de la expresión de *Morc2a* en cerebro y nervio ciático utilizando nueve estadios diferentes del desarrollo del ratón, que se incluían entre la etapa embrionaria (E17.5) y los 120 días de edad (P120). Los hallazgos logrados apoyaban que la expresión del mRNA de *Morc2a* estaba dinámicamente regulada, mostrándose más elevada en estadios tempranos del desarrollo postnatal (**Figura C2.R10-B**). Adicionalmente, se investigó si los niveles de expresión proteica también estarían regulados durante el desarrollo en cerebro y nervio ciático, viéndose que tal y como ocurría con el RNA, Morc2 mostraba un pico de expresión en estadios tempranos del desarrollo seguido de un posterior descenso durante el envejecimiento (**Figura C2.R10-C, D**).

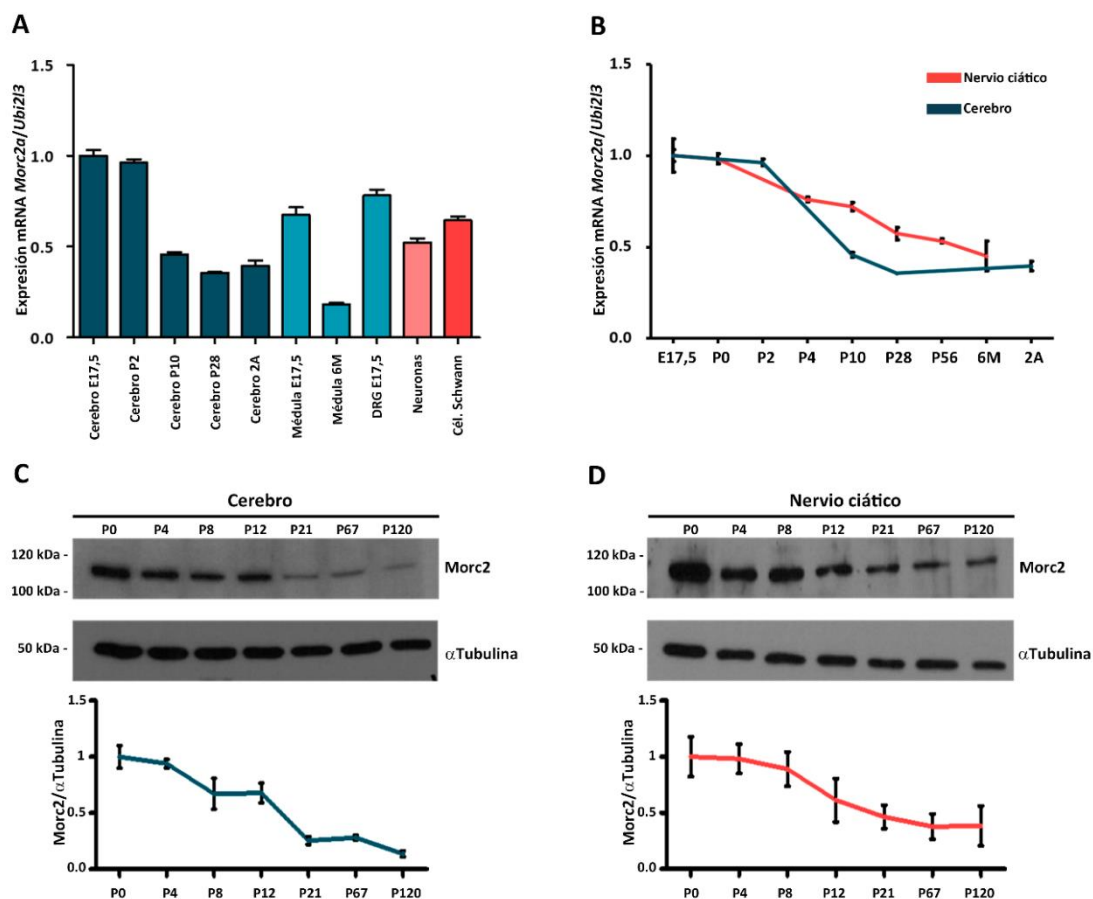


Figura C2.R10. Perfil de expresión espacio-temporal del ortólogo de ratón de MORC2 en SN. (A, B) RT-PCR de *Morc2a* en tejidos y células de origen nervioso. Ubiquitina (*Ubi2l3*) se utilizó como control de carga y se normalizaron los datos en relación a “cerebro E17.5”. **(C, D)** Cuantificación de la expresión de Morc2 por WB en cerebro **(C)** y nervio ciático **(D)** de ratón. α -tubulina se utilizó como control de carga y se normalizaron los datos en relación a “cerebro P0” **(C)** o “nervio ciático P0” **(D)**. E: día embrionario; P: día postnatal; M: meses; A: años.

Una vez determinado el patrón de expresión temporal de Morc2 en nervio ciático, se analizó cuál era su patrón de localización tisular, y para ello, se realizaron diferentes ensayos de inmunofluorescencia en cortes transversales y en fibras de nervio aisladas y elongadas (*teased fibres*) de nervio ciático de ratón P56 (**Figura C2.R11**). Así, Morc2 parecía mostrar un patrón de expresión axonal en corte transversal, no coincidente con las vainas de mielina cuando se destacaban en campo claro (**Figura C2.R11-A**). Para confirmar esta hipótesis, se utilizó SMI32 (marcador de neurofilamento pesado) como marcador interno axoplasmático y MBP (marcador de mielina compacta) como marcador externo de la vaina de mielina, concluyendo que Morc2 colocalizaba con SMI32 (**Figura C2.R11-B, C**) y no lo hacía con MBP (**Figura C2.R11-D, E**), si bien parecía marcar núcleo y citoplasma de células de Schwann y la zona ab-axonal de algunos axones (zona

que rodea las vainas de mielina) (**Figura C2.R11-D**). La localización de Morc2 en axones, conectaba por primera vez a *MORC2* con CMT2Z, ya que la expresión tisular de la proteína se correlacionaba con la patología axonal presentada por los pacientes.

C2.3.4-2. Biopsia de piel

El estudio de la ultraestructura de las biopsias de piel extraídas de la falange proximal del dedo índice se realizó utilizando la tinción hematoxilina-eosina (**Figura C2.R12-A**). En el caso de la paciente CMT2Z portadora de p.R252W, se observaba una ligera remodelación de la dermis en algunos puntos con discreta fibrosis en la dermis papilar (superficial) y focalmente a nivel perianexial, alrededor de algunas glándulas sudoríparas. Esta estructura aberrante podría ser consecuencia del proceso de degeneración a nivel distal de las extremidades superiores, ya que en este caso, en el momento de la biopsia la paciente mostraba signos evidentes de atrofia en manos y dedos.

Nuestro principal objetivo en este estudio era conocer el patrón de expresión de *MORC2* en las terminaciones nerviosas sensitivas presentes en la dermis. Para ello, se llevó a cabo un estudio mediante inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-SMI32 como marcador de los filamentos nerviosos presentes en las biopsias. De este modo, se pudo identificar la colocalización entre *MORC2* y SMI32 en ambas biopsias (**Figura C2.R12-B**). Sin embargo, la intensidad de señal correspondiente a la expresión de *MORC2* en la biopsia procedente de la paciente CMT2Z fue dos veces mayor comparada con la expresión de *MORC2* en la biopsia control (**Figura C2.R12-C**), sugiriendo un posible efecto compensatorio del alelo WT debido a un impacto deletéreo provocado por el alelo portador de la mutación.

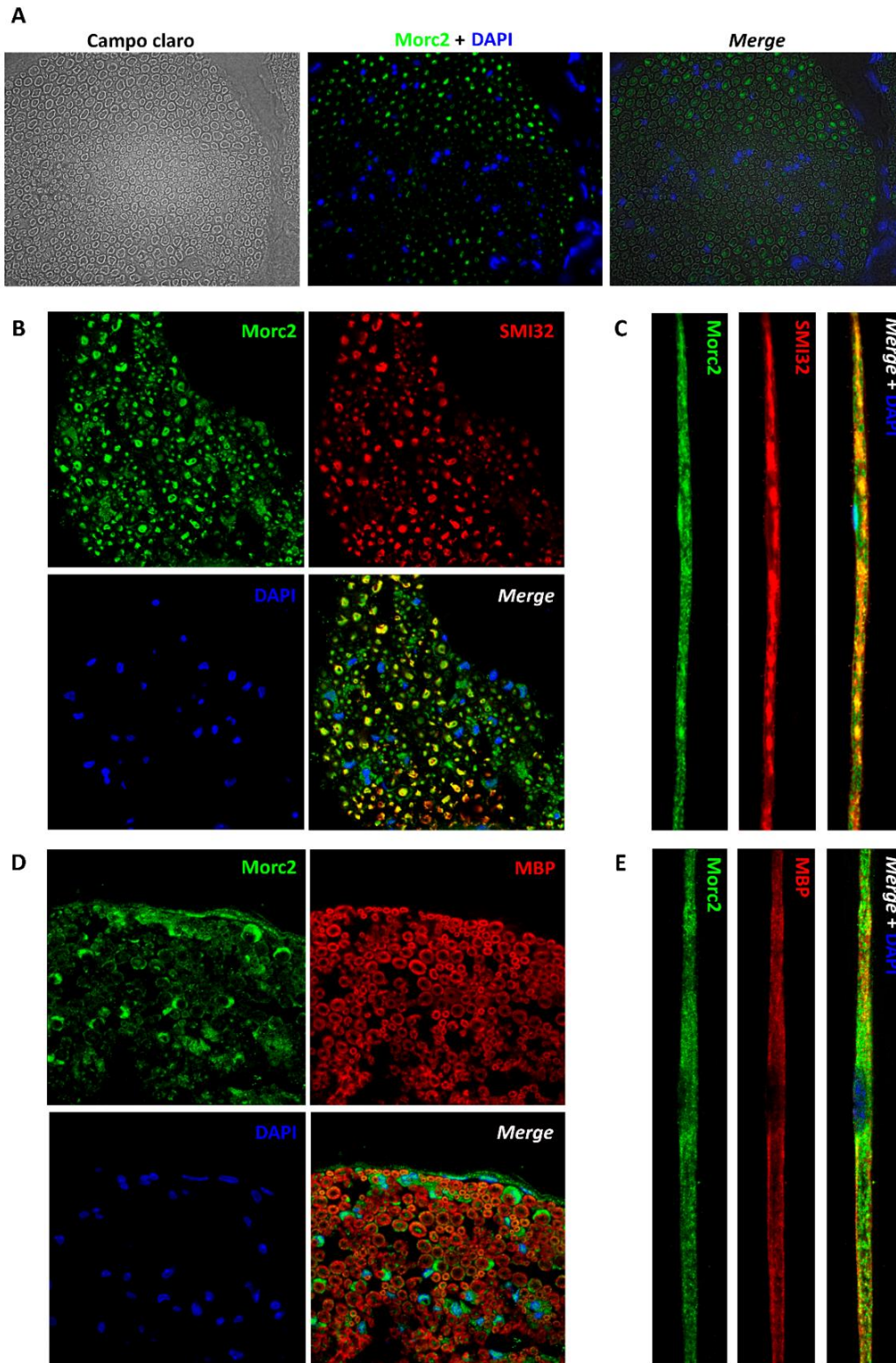


Figura C2.R11. Caracterización de la expresión tisular de Morc2 en nervio ciático de ratón P56. En todos los estudios se ha empleado anti-Morc2 en el canal verde y DAPI, como marcador nuclear, en el canal azul. (A) Inmunofluorescencia sobre campo claro de un corte transversal de nervio ciático. (B, C) Inmunofluorescencia utilizando anti-SMI32 en el canal rojo sobre corte transversal (B) y sobre *teased fibres* (C). (D, E) Inmunofluorescencia utilizando anti-MBP en el canal rojo sobre corte transversal (D) y sobre *teased fibres* (E). *Merge*: solapamiento entre los tres canales

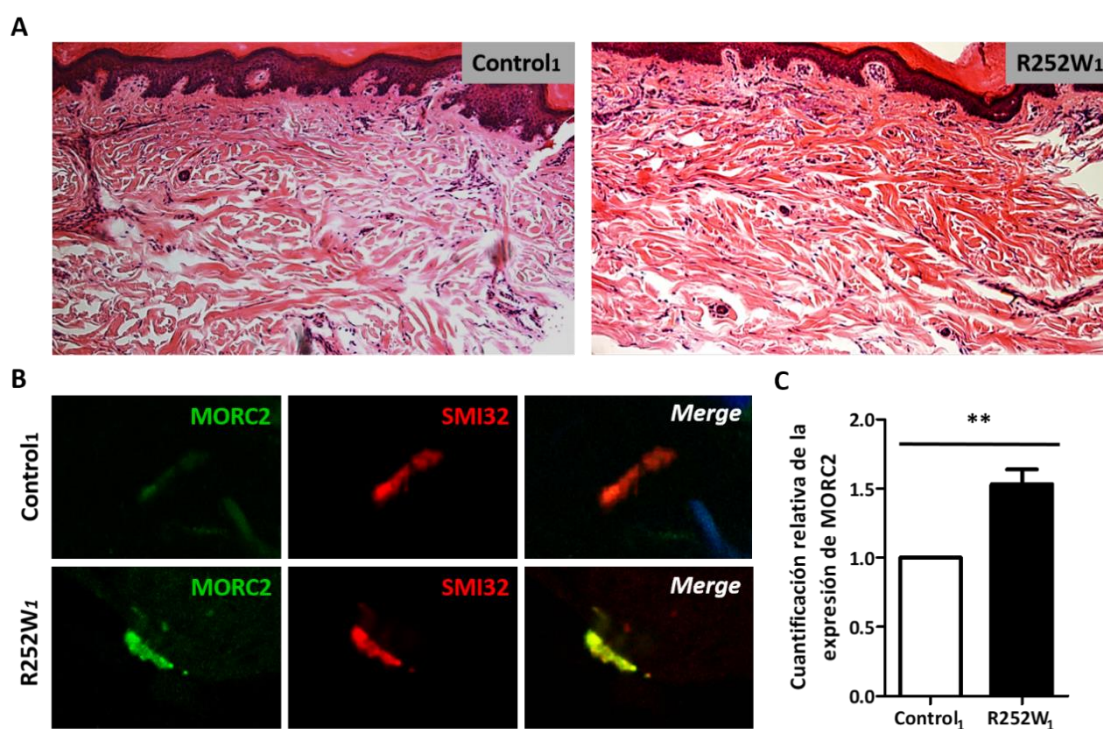


Figura C2.R12. Estudio de expresión de MORC2 en nervios sensitivos periféricos de paciente CMT2Z. Cortes longitudinales de biopsias de piel procedentes de la falange proximal del dedo índice de una paciente CMT2Z (R252W₁) y de un individuo control (Control₁). (A) Tinción hematoxilina-eosina. (B) Inmunofluorescencia marcando MORC2 en verde y SMI32 en rojo. (C) Cuantificación de la intensidad de expresión de MORC2 por inmunofluorescencia, el valor obtenido en el paciente se ha relativizado al valor obtenido en el control. **p_valor<0,01.

C2.3.5. Análisis de la localización subcelular de MORC2

La localización subcelular de MORC2 en líneas de fibroblastos control y CMT2Z (**Figura C2.R13**), así como en líneas continuas de HeLa que sobreexpresaban la proteína (**Figura C2.R14**), fue predominantemente nuclear. Además, en fibroblastos se observó expresión citoplasmática minoritaria y en HeLa, la expresión en citoplasma de MORC2 estaba limitada a células en división. Independientemente, no se distinguió ninguna alteración de localización de las mutaciones p.S87L y p.R252W.

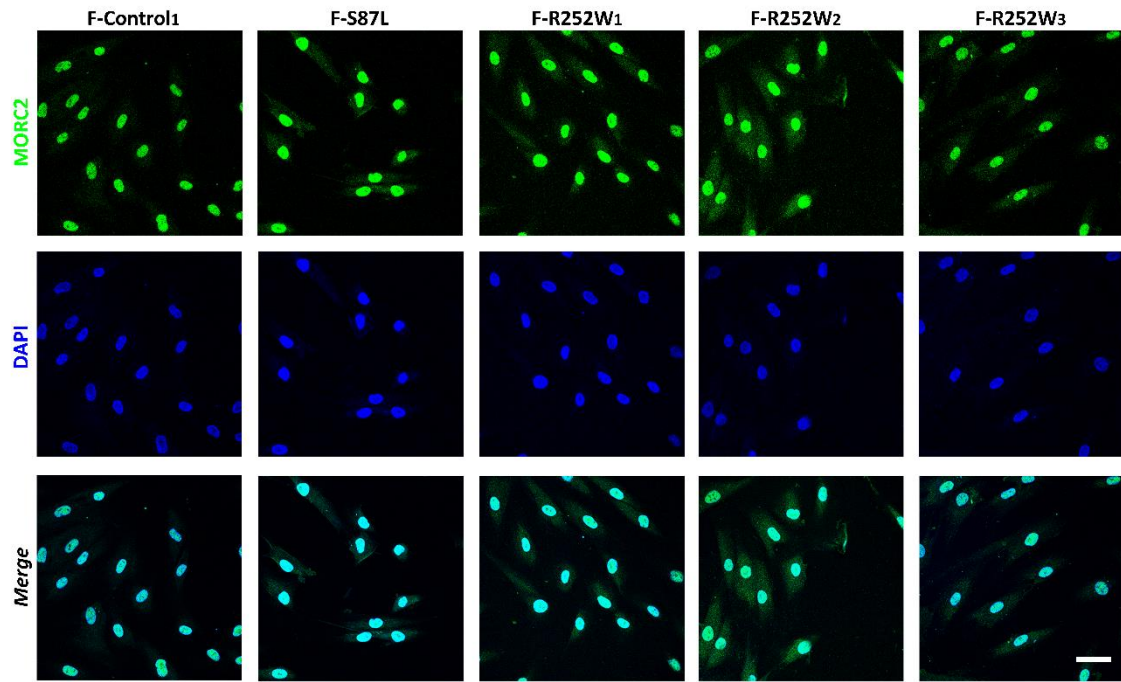


Figura C2.R13. Estudio de localización subcelular de MORC2 en fibroblastos de pacientes CMT2Z portadores de las mutaciones p.S87L y p.R252W. Inmunofluorescencia de fibroblastos fijados marcando MORC2 en el canal verde y DAPI en el canal azul. *Merge*: solapamiento entre los dos canales. Barra de escala: 50 μ m.

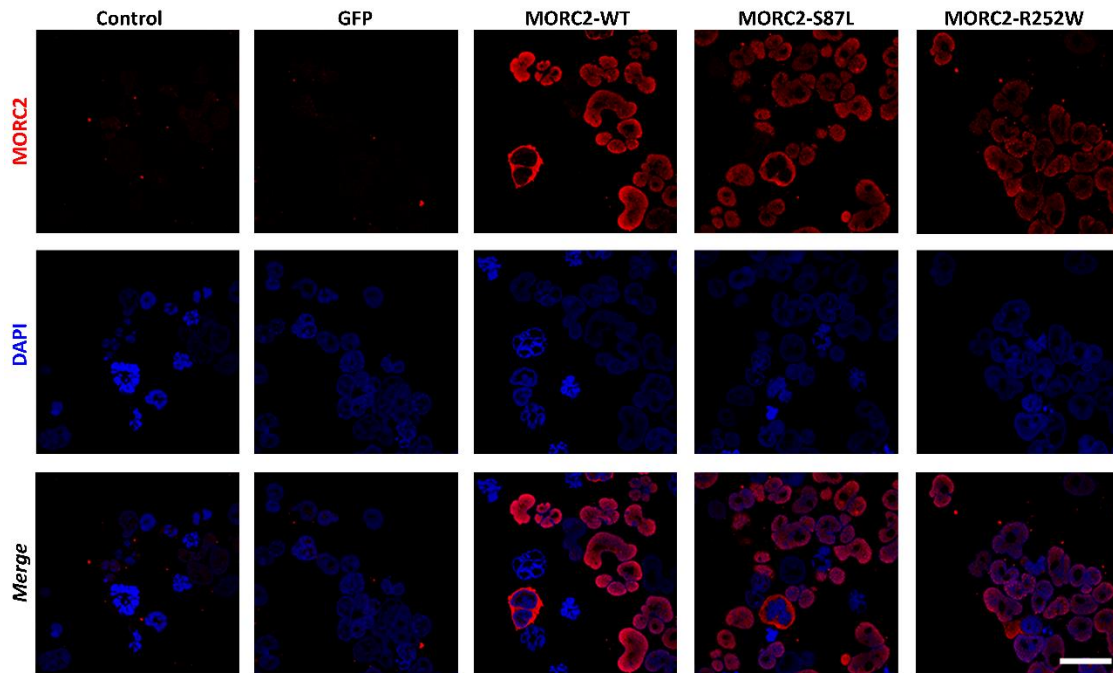


Figura C2.R14. Estudio de localización subcelular de MORC2 en células HeLa. Inmunofluorescencia de células HeLa infectadas con diferentes constructos. Canal rojo: MORC2; canal azul: DAPI. *Merge*: solapamiento entre los dos canales. Barra de escala: 50 μ m.

El estudio de localización subcelular de MORC2 en cultivo de neuronas sensoriales de rata, mostró una expresión mayoritariamente nuclear, tanto en la forma WT como en las formas mutantes (amplificació 10X; **Anexo 4**). No obstante, un estudio más en detalle (63X), reveló que mientras la expresión endógena de *Morc2* estaba limitada al soma neuronal (cultivos no infectados o infectados con GFP), la expresión de MORC2 sobreexpresado (WT y formas mutantes) también se extendía a algunos axones (**Figura C2.R15**). De modo que se ratificaba la expresión axonal de *Morc2*, tal y como se había apreciado previamente en nervio ciático de ratón (**Figura C2.R13-B, C**).

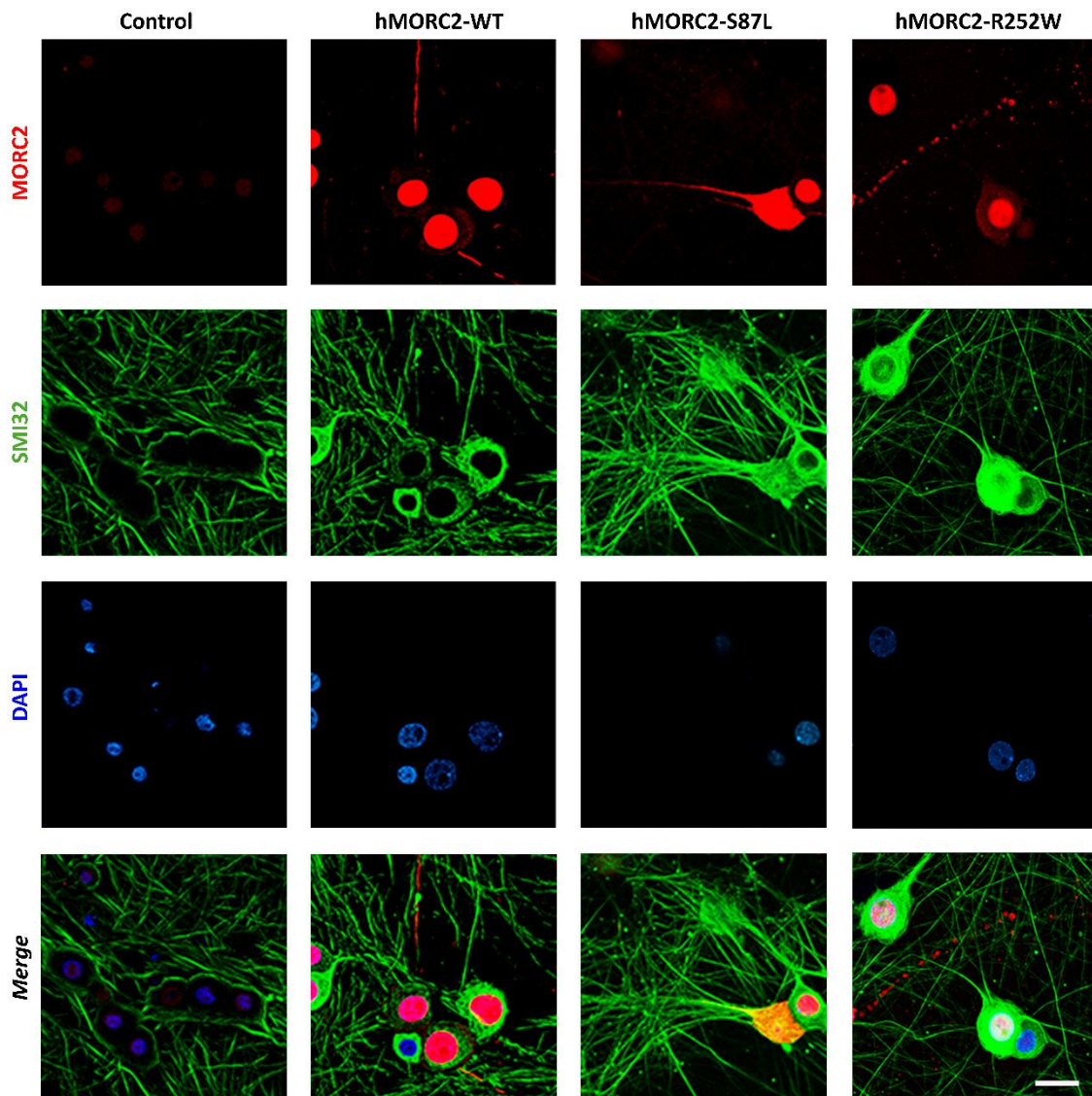


Figura C2.R15. Estudio de localización subcelular de MORC2 humano (hMORC2) sobreexpresado en cultivos de neuronas sensoriales de rata. Inmunofluorescencia de cultivos neuronales infectados con diferentes constructos. Canal rojo: MORC2; canal verde: SMI32; canal azul: DAPI. *Merge*: solapamiento entre los tres canales. Barra de escala: 20 μ m.

Empleando el marcador de neurofilamento SMI32, y a nivel de ultraestructura axonal, se detectaron *axonal swellings* (inflamaciones axonales) predominantemente en las neuronas infectadas con el mutante p.S87L (**Figura C2.R16-A**). La posterior cuantificación de éstos reveló que su presencia fue significativamente mayor en los cultivos que sobreexpresaban la mutación p.S87L, mientras que en el caso de MORC2-R252W el número de *axonal swellings* fue similar al del WT (**Figura C2.R16-B**).

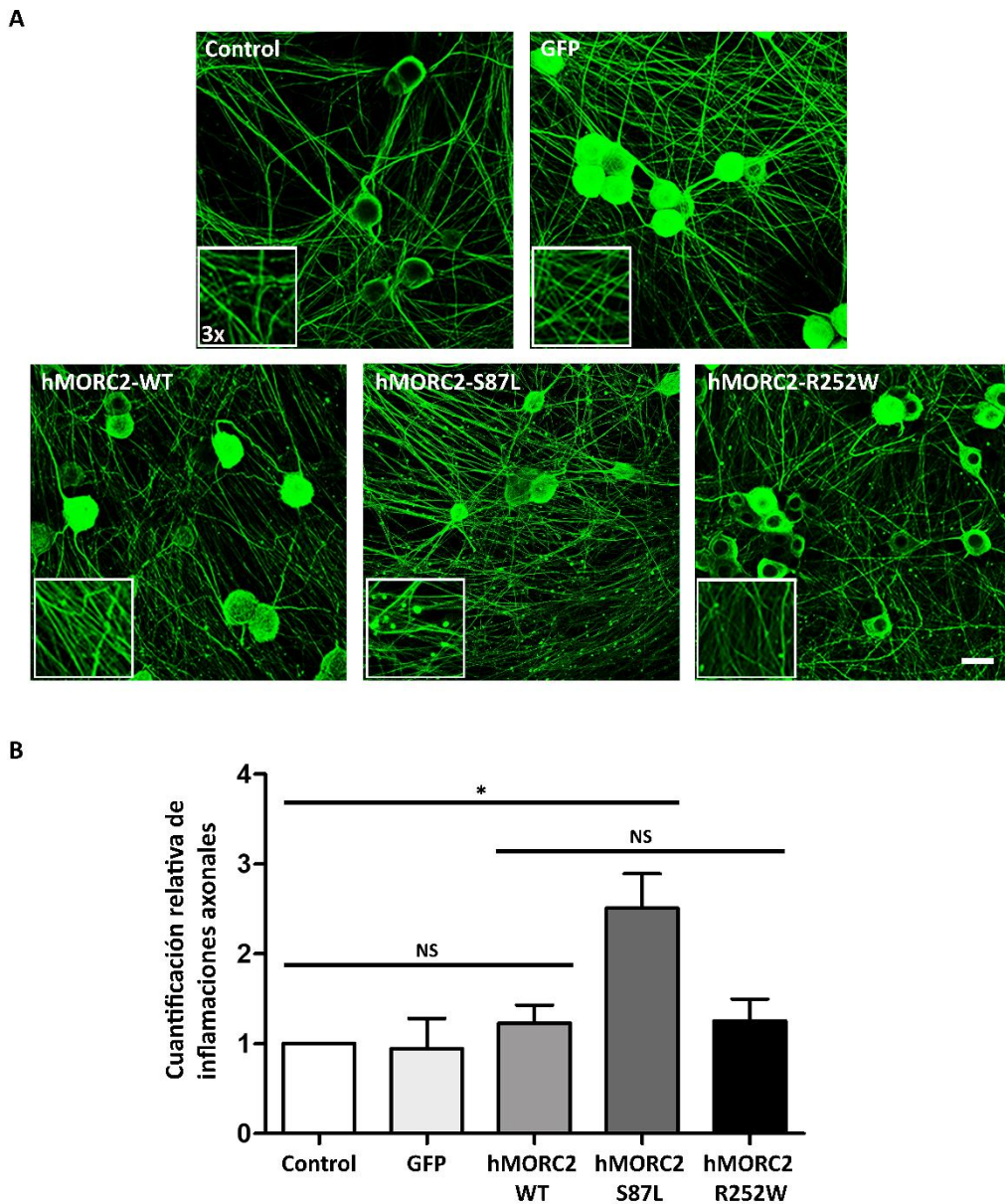


Figura C2.R16. Análisis de *axonal swellings* en cultivos neuronales infectados con los diferentes constructos. (A) Inmunofluorescencia marcando SMI32 en verde. Las ampliaciones mostradas en cada recuadro blanco corresponden a una magnificación 3X de un área concreta de cada imagen. Barra de escala: 20 μ m. (B) Cuantificación de *axonal swellings*. Al número de inflamaciones identificado en el control se le asignó el valor de 1 y todos los demás valores se normalizaron frente a éste. * $p_{\text{valor}} < 0,05$; NS: no significativo.

C2.3.6. Ensayo ATPasa de MORC2

El estudio *in vitro* de la función ATPasa en células HeLa que sobreexpresaban MORC2-WT y sus mutantes, mostró que la mutación p.S87L anulaba totalmente la actividad de MORC2, mostrando valores similares al del control sin infectar o la infección con GFP (Fig. C2.17-A). En cambio, para la forma p.R252W, se observó una leve disminución de la función ATPasa frente a MORC2-WT, que no fue estadísticamente significativa. Los niveles similares de expresión de los diferentes constructos, así como su integridad proteica, se confirmaron mediante WB (Figura C2.R17). En conclusión, a pesar de que ambas mutaciones se localizan en el mismo dominio, sólo la variante p.S87L alteraba drásticamente la actividad ATPasa de MORC2.

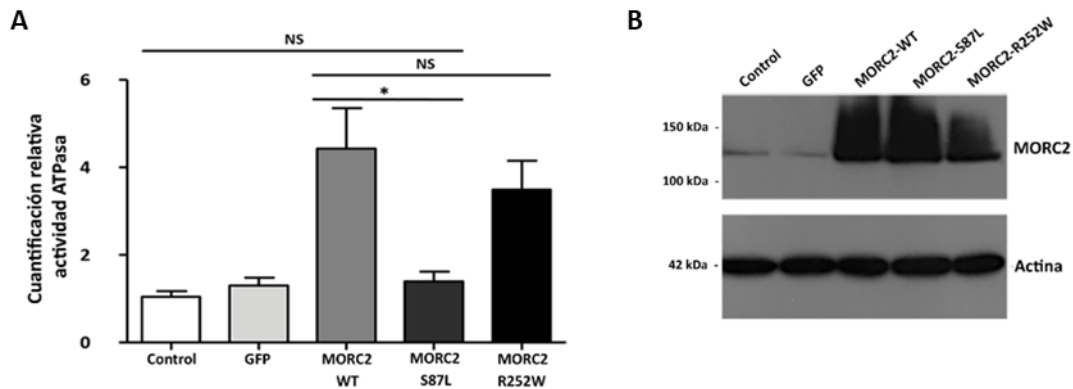


Figura C2.R17. Ensayo ATPasa de MORC2 en células HeLa. Los cultivos de células HeLa se infectaron con partículas lentivirales conteniendo el plásmido pSlik (control), pSlik_GFP y pSlik incluyendo los tres constructos de MORC2 (WT, p.S87L y p.R252W). (A) Cuantificación de la actividad ATPasa. La actividad enzimática (unidades/mL) se normalizó frente a la actividad mostrada en el control. *p_valor<0,05; NS: no significativo. (B) WB detectando el nivel de expresión de MORC2 en los diferentes cultivos. La actina se utilizó como control de carga.

C2.3.7. Perfiles transcriptómicos asociados a CMT2Z

C2.3.7-1. Transcriptómica de fibroblastos derivados de pacientes

Con el fin de identificar rutas y dianas moleculares asociadas con la fisiopatología de CMT2Z, se realizó un análisis global del transcriptoma mediante *array* de expresión génica en fibroblastos de pacientes CMT2Z: F-S87L (portador de la mutación p.S87L) y F-R252W (tres portadores de la mutación p.R252W). El RNA de todas las muestras empleadas pasó los estándares de integridad y calidad establecidos para el ensayo transcriptómico, con un RIN (*RNA integrity number*) nunca inferior a 8 (**Anexo 5**). Los resultados obtenidos del análisis del transcriptoma revelaron que un gran número de genes presentaban una expresión alterada estadísticamente significativa comparada con la línea de fibroblastos control (**Figura C2.R18-A**). En particular, F-S87L mostró 454 genes con expresión alterada (241 sobreexpresados y 213 reprimidos), F-R252W₁ mostró 650 (313 sobreexpresados y 337 reprimidos), F-R252W₂ mostró 665 (360 sobreexpresados y 305 reprimidos) y F-R252W₃, 1.181 genes (788 sobreexpresados y 393 reprimidos). En cuanto a las líneas de fibroblastos p.R252W, se llevó cabo un análisis paralelo teniendo en cuenta los datos transcriptómicos comunes de los tres pacientes como grupo único (F-R252W₁₊₂₊₃), ya que, a pesar de las diferencias geográficas y genéticas intrínsecas a cada individuo, se buscaban genes diferencialmente expresados asociados a dicha mutación. Consecuentemente, el grupo F-R252W₁₊₂₊₃ presentó 901 genes alterados (470 sobreexpresados y 431 reprimidos). A pesar de que identificamos un gran número de genes alterados para ambas mutaciones, la mutación p.R252W causó un agravio transcriptómico superior, con más de 900 genes desregulados significativos comparados con el transcriptoma de la línea control (**Figura C2.R18-B**). Atendiendo también a los valores de *fold change* logarítmico (FC log), el número de transcritos con valores acusados de FC log (>2; puntos rojos), <-2; puntos amarillos), así como valores intermedios de FC (-2>FC log<2; puntos azules), fue mayor para los fibroblastos F-R252W₁₊₂₊₃ (**Figura C2.R18-B**). Todo esto indicaría que las consecuencias transcriptómicas de la mutación p.R252W serían más acusadas que las debidas a la mutación p.S87L.

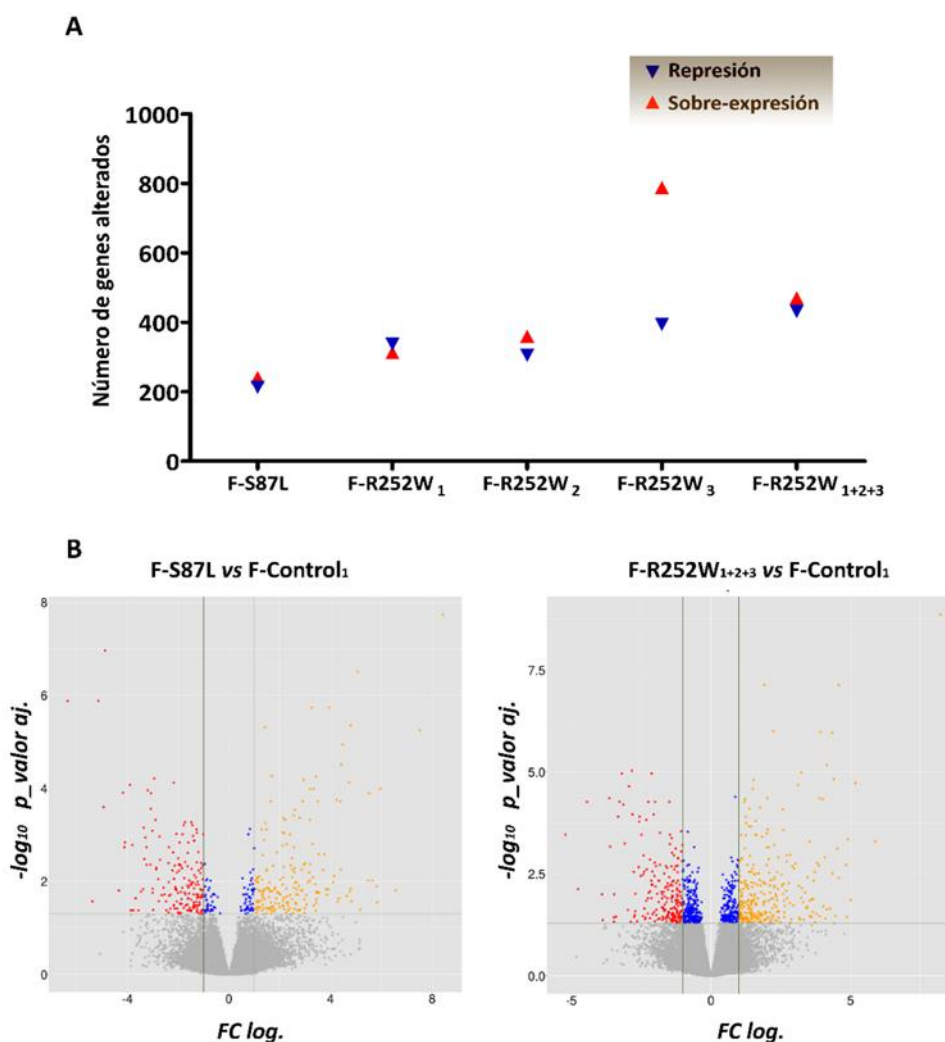


Figura C2.R18. Estudio transcriptómico de fibroblastos CMT2Z. (A) Número de genes significativamente alterados (p_valor ajustado $< 0,05$) en las cinco comparativas de estudio. Triángulo azul: genes reprimidos; triángulo rojo: genes sobreexpresados. (B) *Volcano plots* mostrando resultados transcriptómicos para F-S87L y F-R252W₁₊₂₊₃. Se representa el logaritmo decimal del p_valor ajustado frente al FC log (*fold change* logarítmico). Cada punto representado corresponde a un gen, siendo los puntos en color, aquéllos significativamente alterados. Puntos amarillos: genes sobreexpresados con $FC > 2$; puntos rojos: genes reprimidos con $FC < -2$; puntos azules: genes sobreexpresados o reprimidos con un FC entre -2 y 2 .

Atendiendo al papel represor de MORC2 descrito en otros modelos celulares y asociado a diferentes patologías (Shao *et al.*, 2010; Tong *et al.*, 2015, 2018; Zhang *et al.*, 2015; Tchasovnikarova *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2019), se investigó si en los genes reprimidos identificados en F-S87L y F-R252W existirían subgrupos funcionalmente relacionados. Para ello, se llevó a cabo un enriquecimiento funcional mediante la herramienta bioinformática DAVID (versión 6.7) de todos los genes reprimidos en las

cinco comparativas de estudio (F-S87L, F-R252W₁, F-R252W₂, F-R252W₃ y F-R252W₁₊₂₊₃) (**Figura C2.R19**). Los resultados mostraron tres subgrupos funcionales comunes a todos: genes codificantes de proteínas transmembrana, genes homeobox y la familia de factores transcripcionales *ZNF*. Adicionalmente, un cuarto grupo funcional enriquecido se detectó para dos de las tres líneas p.R252W, genes codificantes de metalotioneínas (**Figura C2.R19-A**). En cuanto al número de genes perteneciente a cada categoría funcional, los más numerosos fueron las proteínas transmembrana y los genes *ZNF* (**Figura C2.R19-B**).

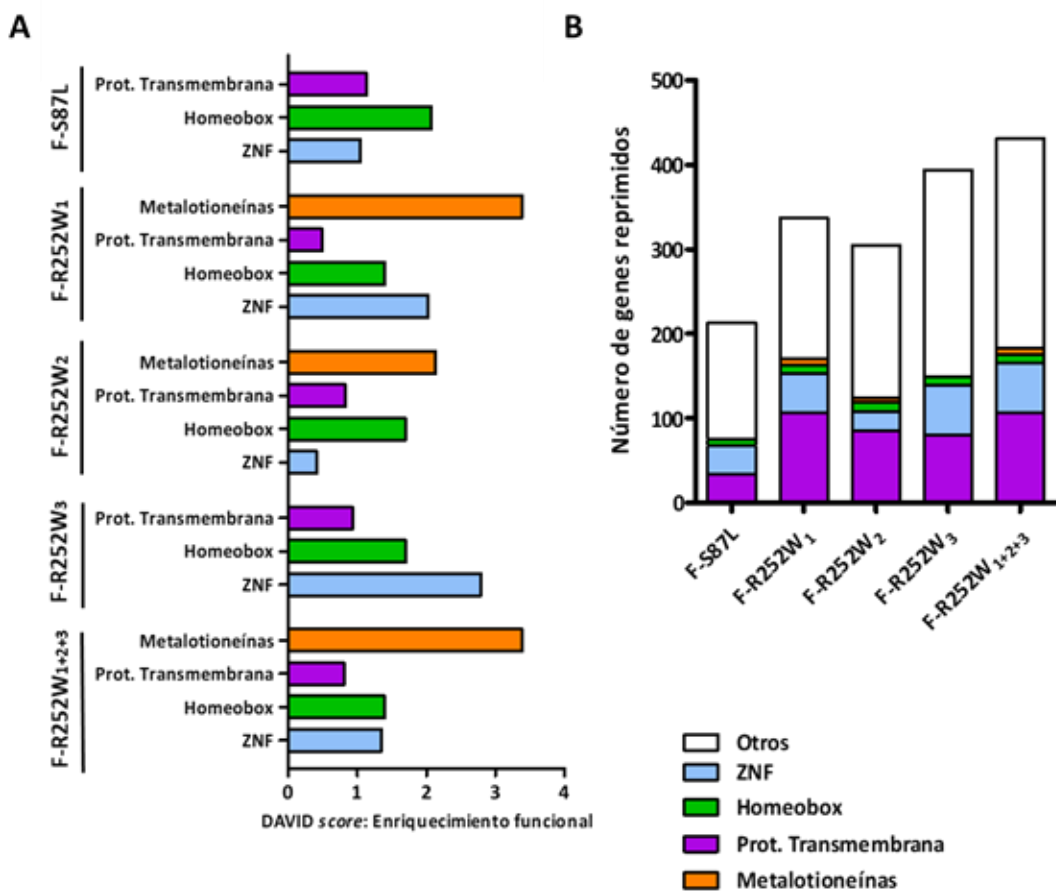


Figura C2.R19. Enriquecimiento funcional de genes reprimidos en fibroblastos CMT2Z. (A) Representación del DAVID score para cada grupo funcional dentro de cada comparativa. (B) Número de genes contenidos en cada categoría funcional.

La represión de genes *ZNF* asociada a MORC2 p.R252W ya había sido descrita previamente en células SK.N.SH (Tchasovnikarova *et al.*, 2017). Con los resultados derivados de este estudio, se pudo confirmar que dicha represión también ocurría en los fibroblastos de pacientes, tanto de los portadores p.R252W (**Tabla C2.R2**), como de la paciente portadora de p.S87L (**Tabla C2.R3**). De entre los genes *ZNF* reprimidos, se identificaron los genes *ZNF415*, *ZNF594*, *ZNF600*, *ZNF610* y *ZNF274* (marcados en rojo, **Tablas C2.R2** y **C2.R3**), en común con el modelo celular previamente descrito (Tchasovnikarova *et al.*, 2017).

Tabla C2.R2. Genes *ZNF* reprimidos en F-R252W₁₊₂₊₃.

Gen	Fold change logarítmico	p_valor ajustado	Gen	Fold change logarítmico	p_valor ajustado
ZNF594	-2,0444	0,0004	ZSCAN2	-0,4962	0,0172
ZNF454	-2,5782	0,0005	ZNF501	-0,4909	0,0172
ZNF717	-0,9719	0,0005	ZNF528	-0,8645	0,0172
ZNF518B	-0,8438	0,0006	ZNF600	-0,6658	0,0243
ZNF132	-1,2441	0,0013	ZSCAN81	-0,5705	0,0259
ZNF415	-2,3794	0,0076	ZFP64	-0,3451	0,0284
ZNF75A	-0,6543	0,0085	ZNF213	-0,8424	0,0288
ZNF425	-0,6632	0,0103	BNC1	-0,9917	0,0307
ZNF274	-0,6179	0,0106	ZNF584	-0,4787	0,0327
ZNF135	-1,5399	0,0106	ZNF79	-0,5056	0,0340
ZNF662	-1,2722	0,0107	SALL3	-0,4613	0,0355
ZNF793	-1,5777	0,0107	ZNF513	-0,5695	0,0379
ZBTB48	-0,6319	0,0120	ZNF300	-0,8629	0,0389
BCL11A	-1,7346	0,0120	ZNF787	-0,4350	0,0390
SP9	-1,5631	0,0160	ZNF630	-0,5834	0,0390
ZFP2	-0,8291	0,0169			

Tabla C2.R3. Genes *ZNF* reprimidos en F-S87L.

Gen	Fold change logarítmico	p_valor ajustado	Gen	Fold change logarítmico	p_valor ajustado
ZNF454	-2,7814	0,0030	ZNF154	-1,4553	0,0261
ZNF75A	-1,0237	0,0040	ZNF157	-1,3509	0,0261
ZNF528	-1,3250	0,0169	ZNF135	-1,7224	0,0310
ZNF540	-2,2426	0,0210	SP9	-1,9272	0,0325
ZNF846	-1,2658	0,0210	ZNF600	-0,9082	0,0325
ZNF502	-0,5908	0,0218	ZNF132	-0,9453	0,0446
ZNF415	-2,6290	0,0241	ZNF610	-1,3639	0,0446
ZNF594	-1,0206	0,0261	ZNF575	-0,9276	0,0446

C2.3.7-2. Transcriptómica de neuronas sensoriales de rata

Para corroborar los resultados obtenidos en muestras de fibroblastos CMT2Z en un contexto celular de origen neural, decidimos abordar los estudios transcriptómicos en cultivos de neurona sensorial de rata infectados con partículas lentivirales conteniendo los transcritos humanos de MORC2-WT y sus mutantes (p.S87L y p.R252W), utilizando GFP como control. El número de células infectadas en cada cultivo fue similar para las cuatro muestras en cada una de las tres infecciones independientes realizadas (**Anexo 6**). Por otro lado, los niveles de expresión de MORC2 fueron equitativos en todos los ensayos realizados (**Figura C2.R20**) y las muestras de RNA empleadas pasaron todos los estándares de calidad, mostrando valores de RIN superiores a 8 (**Anexo 5**).

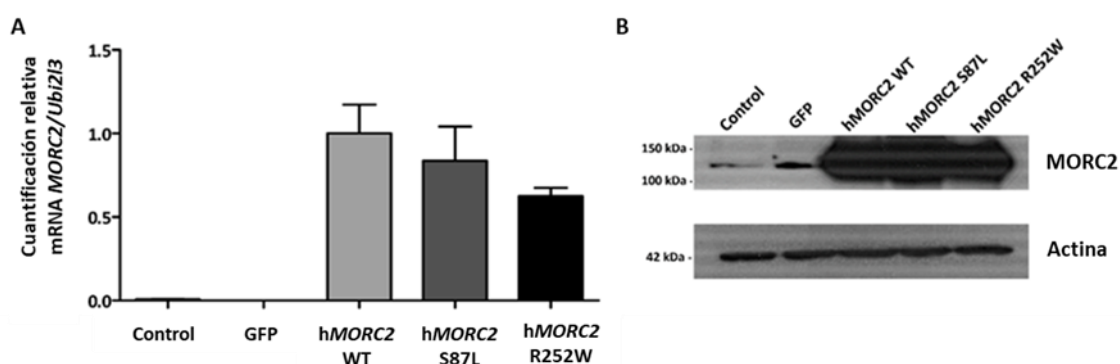


Figura C2.R20. Niveles de expresión de MORC2 humano (hMORC2) en las infecciones lentivirales de cultivos neuronales de rata. (A) RT-PCR del transcrito hMORC2. En todos los casos, se estableció una normalización de los datos frente al valor de expresión de hMORC2-WT. (B) Inmunodetección de hMORC2 mediante WB. La actina se utilizó como control de carga.

Los resultados mostraron que la sobreexpresión del transcrito humano de MORC2-WT (hMORC2-WT) alteraba levemente el transcriptoma de las neuronas sensoriales de rata comparado con aquellas que sobreexpresan GFP, mostrando 51 transcritos significativamente alterados (14 sobreexpresados y 37 reprimidos). Sin embargo, la sobreexpresión de la forma mutante p.S87L (hMORC2-S87L) variaba de forma más sustancial el transcriptoma neuronal, con 286 genes diferencialmente expresados frente al control GFP (209 sobreexpresados y 77 reprimidos). Finalmente, la sobreexpresión de hMORC2-R252W modificaba la expresión de 155 genes (99 sobreexpresados y 56 reprimidos) (**Figura C2.R21**).

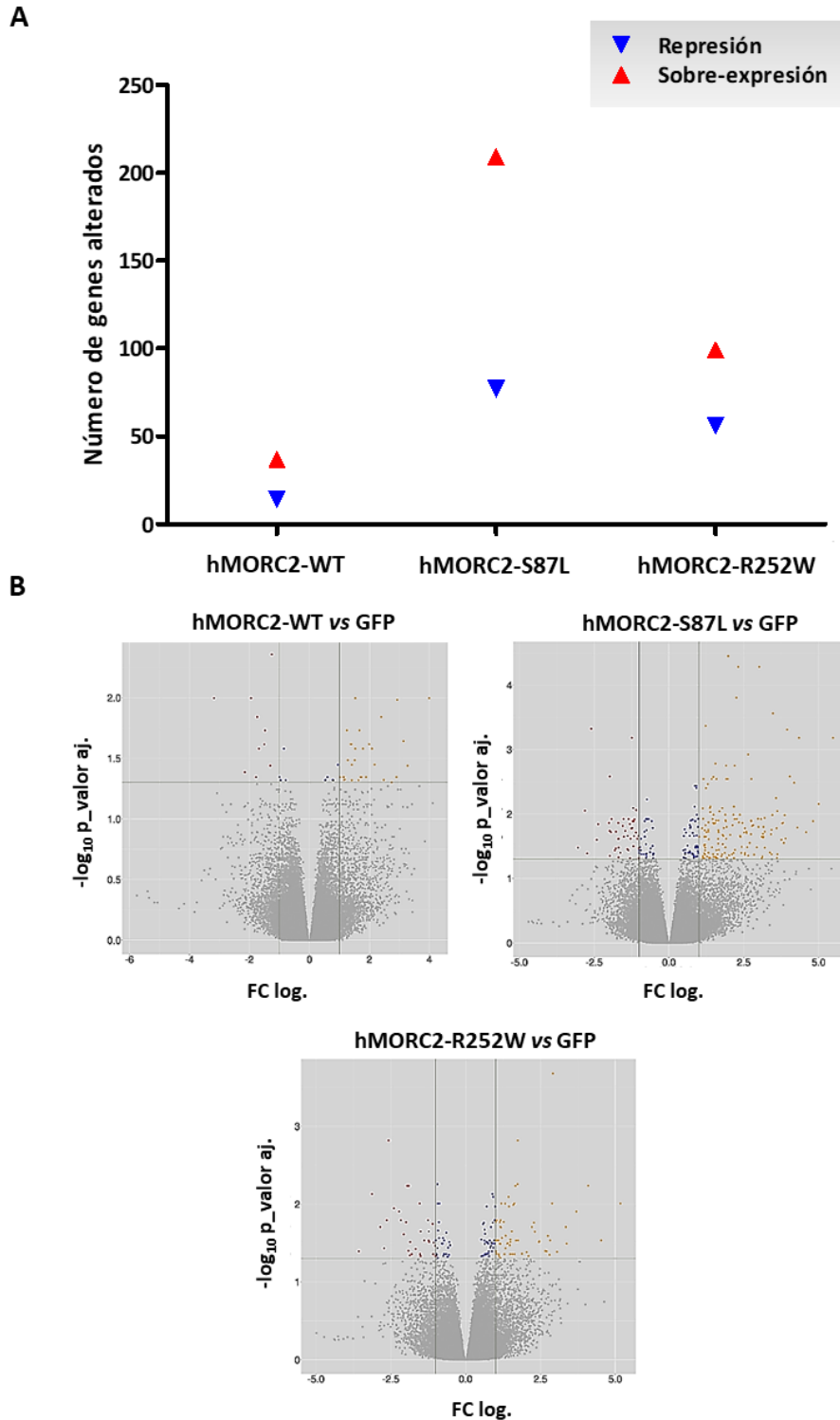


Figura C2.R21. Estudio transcriptómico de neuronas sensoriales de rata. (A) Número de genes significativamente alterados ($p_{\text{valor}} \text{ajustado} < 0,05$) en las tres comparativas de estudio. Triángulo azul: genes reprimidos; triángulo rojo: genes sobreexpresados. (B) *Volcano plots*, se representa el logaritmo decimal del $p_{\text{valor}} \text{ajustado}$ frente al FC log (*fold change* logarítmico). Cada punto representado corresponde a un gen, siendo los puntos en color, aquéllos significativamente alterados. Puntos amarillos: genes sobreexpresados con FC log > 2; puntos rojos: genes reprimidos con FC log < -2; puntos azules: genes sobreexpresados o reprimidos con un FC log entre -2 y 2.

Con el objetivo de determinar si existían grupos funcionalmente relacionados entre los detectados, se realizó de nuevo un análisis de enriquecimiento con la versión 6.7 de la herramienta DAVID. Ésta mostró que existían tres grupos predominantes de genes enriquecidos para ambas mutaciones: genes *ZNF*, genes homeobox y genes codificantes de receptores de neurotransmisores. Adicionalmente, la familia de genes codificantes de quinesinas se identificó exclusivamente en los cultivos neuronales infectados con la mutación p.S87L (**Figura C2.R22**).

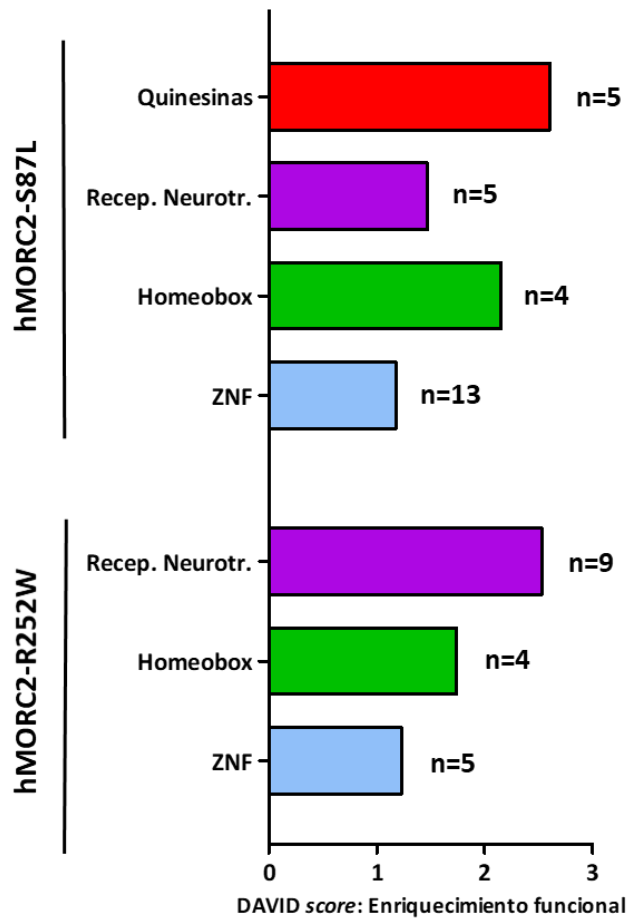


Figura C2.R22. Enriquecimiento funcional de genes significativamente alterados en cultivos neuronales infectados con hMORC2-S87L y hMORC2-R252W. Representación del DAVID score para cada grupo funcional dentro de cada comparativa; n: número de genes identificados en cada subgrupo.

Claramente, la modulación de la expresión génica de la familia de factores transcripcionales ZNF volvía a ser diana molecular de las formas mutantes de *MORC2*, como ya había ocurrido en los cultivos primarios de fibroblastos CMT2Z (**Figura C2.R19**) y en la línea celular SK.N.SH (Tchasovnikarova *et al.*, 2017). En este caso, el número de genes *ZNF* alterados para p.S87L fue 13 (tres sobreexpresados y 10 reprimidos), y para p.R252W descendió a cinco (un gen sobreexpresado y cuatro reprimidos) (**Anexo 7**). Otro grupo coincidente en los estudios transcriptómicos derivados de fibroblastos y neuronas fue el de los genes homeobox. En los transcriptomas neuronales de cultivos que expresaban las mutaciones se identificaron cuatro genes sobreexpresados, tres comunes a ambas mutaciones y uno diferencial, siendo *Hoxc6* para p.S87L y *Hoxb8* para p.R252W (**Anexo 7**).

No obstante, los grupos génicos resultantes en esta última aproximación ómica fueron aquéllos que alteraban la dinámica neural: receptores de neurotransmisores y quinesinas (**Figura C2.R22**). Dentro del set de los genes codificantes para receptores de neurotransmisores, se identificaron cinco diferencialmente expresados en p.S87L (cuatro sobreexpresados y uno reprimido), y nueve en p.R252W (siete sobreexpresados y dos reprimidos) (**Tablas C2.R4 y C2.R5**). De entre ellos, destacaron genes codificantes de receptores de neurotransmisores de ácido gamma-aminobutírico (GABA) y ácido glutamatérgico, moduladores del sistema nervioso. Por otro lado, las cinco quinesinas sobreexpresadas identificadas en el mutante p.S87L (**Tabla C2.R4**), indicaban una posible perturbación en el transporte anterógrado de los axones, pudiendo ser causa o consecuencia de la alteración ultraestructural observada mediante inmunofluorescencia de estos cultivos (**Figura C2. R16**).

En paralelo, para investigar una posible interacción entre *MORC2* y otros genes causantes de CMT, se analizaron los niveles de expresión de 118 genes homólogos en rata (**Anexo 8**) incluidos en la última versión del panel diagnóstico de CMT, NMHd y ELA (Neuro120, **Anexo 1**). Producto de este análisis, el único gen que resultó estar significativamente alterado fue *Hspb1*, mostrándose reprimido para ambas formas mutantes (**Tablas C2.R4 y C2.R5**). *Hspb1* codifica para una chaperona que participa en el correcto plegamiento de muchas proteínas celulares y que ha sido previamente relacionado con otra forma clínica de CMT2 (CMT2F, MIM 606595), así como con una neuropatía motora hereditaria distal (NMHd tipo IIB, MIM 608634).

Tabla C2.R4. Genes neuronales con expresión significativamente alterada en p.S87L.

Grupo funcional	Gen	Fold change logarítmico	p_valor ajustado
Dinámica acetilcolinesterasa (AChE)	<i>Prima1</i>	-0,8107	0,0225
Chaperonas	<i>Hspb1</i>	-2,0045	0,0138
Receptores del ácido aminobutírico (GABA)	<i>Gabra1</i>	1,8839	0,0102
	<i>Gabra5</i>	2,1599	0,0402
Receptores de glutamato	<i>Grik3</i>	0,9542	0,0318
<i>Solute carriers</i> (SLC)	<i>Slco3a1</i>	1,1453	0,0118
Quinesinas	<i>Kif18b</i>	2,6480	0,0012
	<i>Kif20b</i>	2,5508	0,0138
	<i>Kifc1</i>	1,4901	0,0103
	<i>Kif20a</i>	1,6522	0,0179
	<i>Kif11</i>	2,1956	0,0018

Tabla C2.R5. Genes neuronales con expresión significativamente alterada en p.R252W.

Grupo funcional	Gen	Fold change logarítmico	p_valor ajustado
Chaperonas	<i>Hspb1</i>	-2,1645	0,0161
Receptores del ácido aminobutírico (GABA)	<i>Gabra1</i>	1,4898	0,0439
	<i>Gabra5</i>	2,4493	0,0306
	<i>Gabrb1</i>	2,4636	0,0322
Receptores de glutamato	<i>Grik3</i>	1,0610	0,0292
Receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR)	<i>Chrn4</i>	1,3944	0,0322
<i>Solute carriers</i> (SLC)	<i>Slco3a1</i>	1,1645	0,0161
	<i>Slc39a6</i>	-0,6013	0,0475
<i>Transmembrane members</i> (TMEM)	<i>Tmem178a</i>	1,1397	0,0322
	<i>Tmem81</i>	-1,3848	0,0292

El hecho de haber identificado genes neuronales con expresión diferencial en el ensayo transcriptómico podría favorecer la caracterización de nuevas dianas moleculares relacionadas con la fisiopatología de CMT2Z. Por ello, y dada la relevancia de este hallazgo, los resultados ómicos de algunas de estas posibles dianas moleculares de *Morc2* se validaron mediante RT-PCR (**Figura C2.R23**). Con este estudio se confirmó en ambos mutantes la represión acusada del gen *Hspb1* (**Figura C2.R23-A**), así como la sobreexpresión de los receptores GABA (*Gabra1*, *Gabra5* y *Gabrb1*) y del receptor

glutamatérgico *Grik3* (Figura C2.R23-B). Finalmente, también se confirmó la sobreexpresión de tres quinesinas (*Kif18b*, *Kifc1* y *Kif11*) en los cultivos de neuronas de rata infectados con la mutación p.S87L (Figura C2.R23-C).

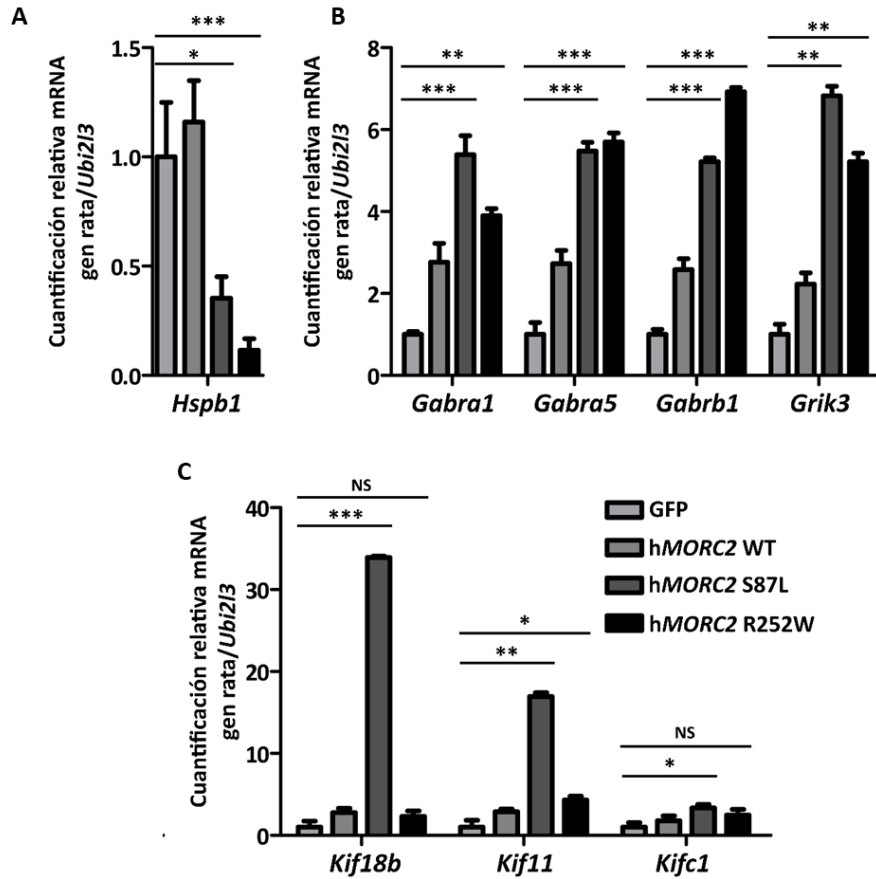


Figura C2.R23. Validación de resultados derivados del análisis transcriptómico de neuronas sensoriales de rata mediante RT-PCR. En todos los casos, se estableció una normalización frente a *Ubi2l3* y posteriormente, mediante la relativización al valor de expresión del control de GFP (*p_valor<0,05; **p_valor<0,01; ***p_valor<0,001); NS: No significativo. (A) Cuantificación relativa de la expresión de *Hspb1*. (B) Cuantificación relativa de la expresión de *Gabra1*, *Gabra5*, *Gabrb1* y *Grik3*. (C) Cuantificación relativa de la expresión de *Kif18b*, *Kif11* y *Kifc1*.

C2.4. Discusión

C2.4.1. Espectro genético de CMT2Z

Desde el descubrimiento en nuestro laboratorio de tres familias CMT2 no relacionadas con la mutación c.754C>T (p.R252W) en el gen *MORC2* (Sevilla *et al.*, 2016), se han identificado 33 familias CMT2Z y 10 mutaciones clínicas diferentes en *MORC2*, siendo c.754C>T (p.R252W) la más frecuente. El espectro clínico es amplio, en la mayor parte de los casos se trata de un fenotipo CMT2 con inicio en la segunda década de vida, mientras que en el caso particular de las mutaciones p.S87L y p.T242R, el cuadro clínico es más grave y semeja un fenotipo AME con un inicio congénito de los síntomas (Hyun *et al.*, 2016; Schottnann *et al.*, 2016; Sevilla *et al.*, 2016).

De todos los casos identificados, 17 son portadores de la mutación más común (c.754C>T), siendo 15 de ellos *de novo*. En colaboración con la Dra. Marina Kennerson (*Concord Clinical School ANZAC Research Institute*, Sidney) establecimos que la citosina en posición 754 está localizada en una isla CpG y que, esta posición nucleotídica estaba predominantemente metilada (5-metil-citosina) (**Figura C2.D1**, Sancho *et al.*, 2019). La metilación de citosinas localizadas en islas CpG, provoca una inestabilidad frecuente por desaminaciones espontáneas de 5-metil-citosina que ocasionan un cambio a timina (Coulondre *et al.*, 1978). Este factor intrínseco a la naturaleza de la secuencia nucleotídica, explica que el cambio c.754C>T en *MORC2* sea habitualmente identificado *de novo*, ya que está localizado en un punto caliente (*hot spot*) mutacional. Por otro lado, dada la existencia de diferentes isoformas transcripcionales y en tanto que, por primera vez se asociaba *MORC2* a una patología monogénica, era importante establecer cuál de ellas estaba relacionada con enfermedad humana. Por ello, mediante qPCR en diferentes tejidos nerviosos humanos, concluimos que la isoforma NM_001303256.3 es la que se expresa mayoritariamente en médula espinal de adulto y en DRGs embrionarios. De igual manera, hemos demostrado directamente en fibroblastos de pacientes CMT2Z que es la isoforma preponderante.

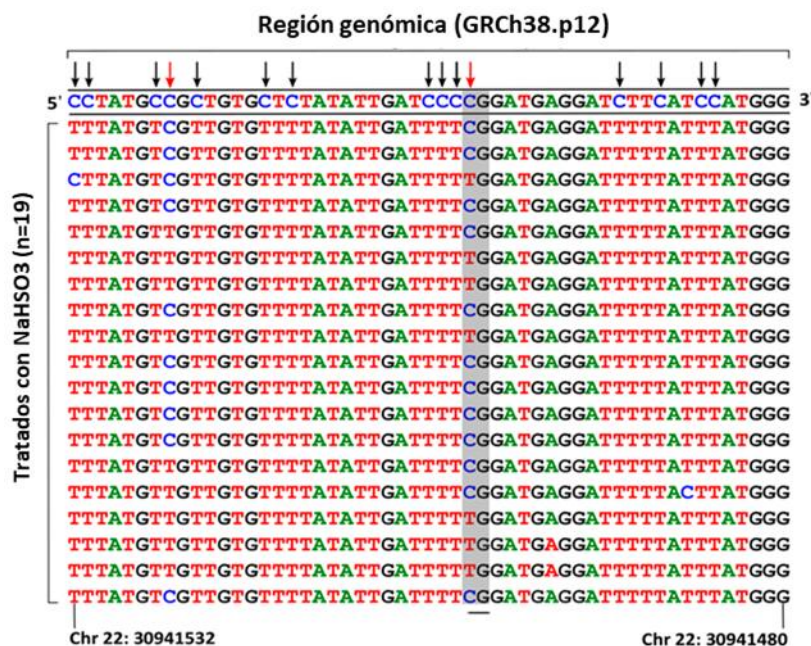


Figura C2.D1. Caracterización del patrón de metilación de islas CpG contenidas en un fragmento del exón 9 de *MORC2* (NM_001303256.3) mediante secuenciación de DNA tratado con bisulfito de sodio (NaHSO₃). [Adaptación de Sancho *et al.*, *Human molecular genetics*; 2019]. Sombreado en gris se muestra la isla CpG que contiene el nucleótido del cambio c.754C>T. Las secuencias correspondientes a 19 clones testados, se alinearon con la secuencia genómica consenso (subrayada); las citosinas convertidas a timina se indican con flechas negras, mientras las no convertidas con flechas rojas. En la posición c.754 se muestra que el número de citosinas no convertidas es predominante respecto a las convertidas.

C.2.4.2. Expresión de *MORC2* en tejido nervioso

Los estudios de la expresión de mRNA y proteína de *Morc2* en nervio ciático y cerebro de ratón, establecieron una regulación temporal de la misma. En concreto, *Morc2* se expresaba mayoritariamente en estadio prenatal y edades tempranas postnatales, sufriendo un decaimiento progresivo en etapas adultas. La expresión diferencial de *Morc2* durante los primeros días de vida, mimetiza patrones de expresión en células de Schwann de genes como *PMP22*, cuya acción es fundamental en el desarrollo de los nervios periféricos mielinizados, además de estar implicado en CMT1A (Buser *et al.*, 2009). Más recientemente, un estudio que ahonda sobre el perfil transcriptómico de nervios lumbares L4-L6 (eferentes y aferentes) de la médula espinal de roedores (región que conecta directamente con el nervio ciático) durante las primeras cinco semanas de vida, señala a nueve genes cuya expresión diferencial podría estar directamente implicada en la biogénesis de los nervios motores y sensitivos periféricos: *Mpz*, *Slit2*, *Unc13c*, *Ncam1*, *Nrxn1*, *Nlgn1*, *Gabbr2*, *Gabra1* y *Npy* (Wang *et al.*, 2018). En este caso, la expresión de

Morc2 coincidiría con la referida a *Nrxn1*, *Gabrb2* o *Gabra1* en nervios eferentes (barras amarillas) y aferentes (barras moradas), o con la expresión de *Unc13c*, *Ncam1*, *Nlgn1* y *Npy* en nervios eferentes. Sin embargo, el patrón de expresión de *Morc2* sería opuesto al referido a los genes *Mpz* o *Slit2* para los dos tipos de fibras nerviosas estudiadas (Wang *et al.*, 2018; **Figura C2.D2**). Por todo ello, *Morc2* podría jugar un papel importante en la biogénesis del SNP, en especial de las fibras medulares eferentes.

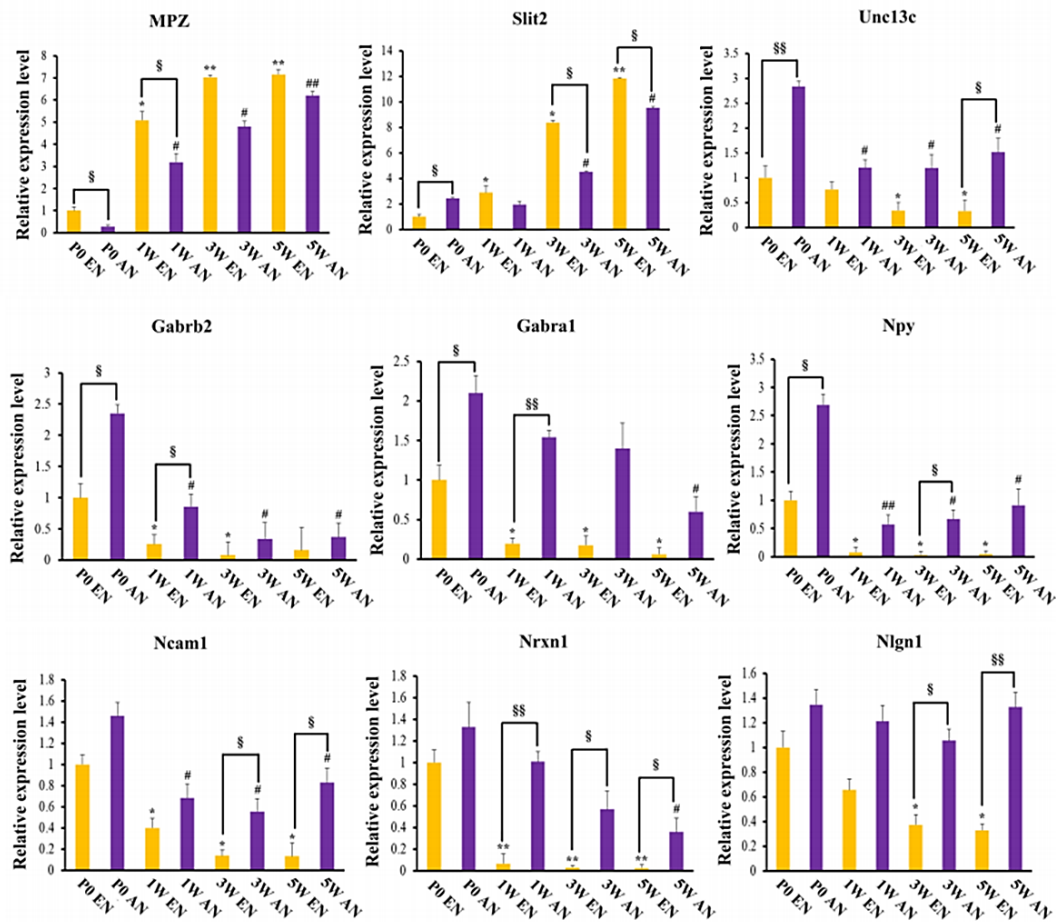


Figura C2.D2. RT-PCR de genes implicados en el desarrollo del sistema nervioso periférico. [Adaptación de Wang *et al.*, *Scientific reports*; 2018]. En amarillo se muestran los nervios eferentes (EN), en morado los nervios aferentes (AF). P: día postnatal; W: *week* (semana) postnatal.

En cuanto a los estudios de localización en nervio ciático, *Morc2* se expresaba en axones y células de Schwann de ratón, así como en zonas ab-axonales. En concreto, su localización mediante inmunofluorescencia, colocalizaba con marcadores de neurofilamento (SMI32) y no lo hace con marcadores de mielina compacta (MBP). Este patrón de expresión axonal, coincidiría con el descrito para otros genes cuyas mutaciones causan otros subtipos de CMT2, como *MFN2* (Wang *et al.*, 2018). Por otro lado, mediante inmunofluorescencia de biopsia de piel de un paciente portador de la mutación c.754C>T (p.R252W) conseguimos detectar la expresión de MORC2 en fragmentos de nervios sensitivos periféricos de la epidermis, que una vez más, colocalizaban con SMI32. La comparativa con un control sano, mostró que en el paciente, y en cuanto a nervios sensitivos de la piel, había una sobreexpresión de MORC2. Este último hallazgo, sugeriría un efecto celular compensatorio, con sobreexpresión del alelo WT por inactividad del alelo portador de la mutación.

C2.4.3. Las mutaciones p.S87L y p.R252W y la localización subcelular de MORC2

Hemos establecido que la localización subcelular de MORC2 endógena o MORC2-WT y mutada (p.R252W, p.S87L) en células HeLa es predominantemente nuclear y ocasionalmente citoplasmática. Por otro lado, los estudios en fibroblastos de pacientes CMT2Z, portadores de la mutación p.R252W o la mutación p.S87L, muestran el mismo patrón de localización. En cultivos neuronales de rata, la expresión endógena de *Morc2* es nuclear y la expresión de MORC2 humano sobreexpresado (WT o mutado) es nuclear y en ocasiones, citoplasmática, coincidiendo con el marcador de neurofilamento axonal SMI32. En conclusión, podemos establecer que en nuestros modelos celulares CMT2Z, las mutaciones p.R252W y p.S87L no provocan una deslocalización intracelular de la proteína. Así, estos hallazgos *in vitro* sugieren que el mecanismo de enfermedad subyacente a las mutaciones p.R252W y p.S87L no está relacionado con una localización subcelular errónea, lo cual se ha descrito previamente para otras muchas mutaciones implicadas en neuropatías.

C2.4.4. Las mutaciones p.S87L y p.R252W y la disminución de actividad ATPasa

Los resultados de nuestro ensayo ATPasa *in vitro* en células HeLa que sobreexpresaban las mutaciones p.R252W y p.S87L, mostraron una pérdida absoluta de actividad para p.S87L y una disminución no significativa de actividad para la mutación p.R252W.

En paralelo a nuestro hallazgo, se publicó un trabajo dónde cristalizaron el fragmento proteico N-ter (que comprende desde el dominio ATPasa hasta el primer dominio CC) de la isoforma NP_001290185 de MORC2 y los mutantes p.S87L, p.R252W y p.T424R, y demostraron que MORC2 dimeriza, siendo además para ello, imprescindible la función ATPasa (Douse *et al.*, 2018). Las posiciones aminoacídicas de las mutaciones clínicas estudiadas (87, 252 y 424) en la estructura tridimensional cristalizada de MORC2, corresponden al sitio de unión a ATP del dominio ATPasa (residuo 87), a la zona de interacción entre el dominio ATPasa y el dominio CW (residuo 252) y, a la zona superficial de contacto del dímero (residuo 424). Por ello, los autores predicen consecuencias nefastas en la actividad de MORC2 provocadas por p.S87L y p.T424R (Douse *et al.*, 2018), mutaciones cuya clínica asociada es más grave (Hyun *et al.*, 2016; Schottmann *et al.*, 2016; Sevilla *et al.*, 2016). En el caso de p.S87L, se producía un secuestro del ATP en el centro activo y una dimerización constitutiva con pérdida completa de actividad ATPasa. Por su parte, p.T424R, también alteraría la dinámica de dimerización, pero por la generación de nuevas interacciones en la superficie de contacto del dímero, que a su vez, provocarían un aumento drástico de actividad ATPasa. Finalmente, para la mutación p.R252W, se sugiere un descenso de actividad ATPasa ocasionado por una desestabilización del módulo ATPasa-CW (Douse *et al.*, 2018).

Nuestros resultados respecto a las mutaciones p.R252W y p.S87L utilizando la proteína completa, coinciden con los publicados utilizando el fragmento N-ter de MORC2 (Douse *et al.*, 2018). De modo que, el análisis de los datos en conjunto establece que el mecanismo patogénico ejercido por la mutación p.S87L es causado por el fallo de su actividad ATPasa y la generación constitutiva de homodímeros no funcionales, mientras que p.R252W causa una disminución leve de la función ATPasa debido a una desestabilización de interacciones intraproteicas. Pese a que parece claro que la mutación p.R252W apenas afecta a la actividad enzimática de MORC2, esta disminución podría tener consecuencias importantes en un contexto *in vivo* en estados tempranos del desarrollo (que es donde hemos demostrado que se expresa mayoritariamente *Morc2*).

C2.4.5. La mutación p.S87L y la inflamación axonal

La mutación p.S87L inducía un aumento de inflamaciones axonales (*axonal swellings*) en cultivos infectados de neuronas sensoriales de rata, mientras que la mutación p.R252W no presentaba diferencias frente al control. Los *axonal swellings* han sido previamente descritos en numerosas entidades degenerativas del SN, incluyendo: enfermedad de Alzheimer (Stokin, 2005), enfermedad de Huntington (Marangoni *et al.*, 2014), enfermedad de Seitelberger (Scheithauer *et al.*, 1978), ELA (Poesen *et al.*, 2017) o CMT2E (Fabrizi *et al.*, 2007).

Las neuronas, células altamente especializadas, están compuestas de tres partes fundamentales: soma o cuerpo neuronal, axón y dendritas. Los axones, son estructuras celulares en los que tiene lugar un tráfico incesante de orgánulos y proteínas, desde el soma hasta la sinapsis (transporte anterógrado, mediado por quinesinas), o desde la sinapsis hasta el soma (transporte retrógrado, mediado por dineínas). Los *axonal swellings*, son estructuras aberrantes donde se acumulan orgánulos intracelulares y cuerpos proteicos multivesiculares (Hurd and Saxton, 1996), provocadas por la reorientación puntual de los microtúbulos (perdiendo la direccionalidad habitual que utilizan las proteínas motoras para el transporte neuronal) debido a una acumulación de la proteína Tau (Shemesh *et al.*, 2008). Estas estructuras aberrantes provocan “atascos” del tráfico intracelular mediado por las proteínas motoras (dineínas y quinesinas) entre el soma y la sinapsis (Martin *et al.*, 1999; Goldstein, 2001), induciendo procesos relacionados con degeneración *walleriana* que conducen a muerte de neuronas del SNC (Coleman, 2005; **Figura C2. D3**).

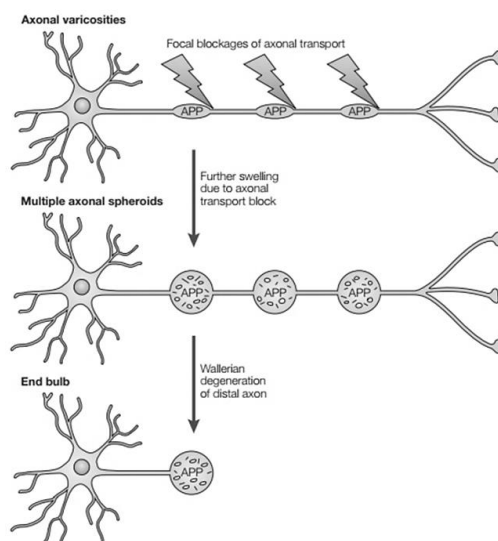


Figura C2.D3. Secuencia de degeneración axonal a partir de *axonal swellings*.

[Adaptación de Coleman., *Nature Reviews*; 2005] Los agregados subaxonales iniciales, compuestos de orgánulos y proteínas, provocan un bloqueo del transporte axonal. Estos agregados, van agrandándose secuencialmente formando esferoides, y provocan la degeneración *walleriana* del axón, paso previo a la muerte neuronal.

La degeneración *walleriana* engloba una serie de cambios morfológicos y bioquímicos secuenciales en el axón que conducen a muerte neuronal, constituyendo una forma común de axonopatía que puede ser producida por numerosas enfermedades o por la acción de elementos neurotóxicos (Carroll and Worley, 2017). Estudios sobre un modelo de ratón con degeneración *walleriana* lenta (WLD; *wallerian degeneration slow*), han demostrado que a pesar de acabar produciendo la muerte celular, este proceso está orquestado por un programa diferente a la apoptosis neuronal (Beirowski *et al.*, 2005). Un modelo clásico de estudio de degeneración *walleriana* es la lesión que separa el soma del axón periférico. Tras un periodo corto tras la lesión (48-96 h en modelos murinos, 4-10 días en humanos), a pesar de estar físicamente separado el axón del cuerpo neuronal, los segmentos axonales son capaces de transmitir impulsos eléctricos. Pese a la capacidad de respuesta eléctrica, aparecen cambios morfológicos de forma relativamente rápida, incluyendo acumulaciones de mitocondrias, orgánulos celulares o glucógeno en la zona adyacente a la lesión creando inflamaciones axonales (*axonal swellings*) que después irán aumentando de tamaño, convirtiéndose en grandes esferoides. Horas después, se acumularán iones calcio que activan calpaínas (proteasas dependientes de calcio), que llevan a cabo la degradación del citoesqueleto axonal, convirtiendo al axoplasma en un fluido acuoso repleto de *debri* celular en su interior. A pesar de todo lo que ocurre en el axoplasma, la mielina que recubre el nervio periférico continua intacta hasta mucho después del inicio de la degeneración *walleriana* (Carroll and Worley, 2017). En electromiografías de pacientes CMT2Z, y en particular en aquellos portadores de la mutación p.S87L, no se recogen alteraciones de la VCN, por lo que no parece estar afectada la mielina de los nervios periféricos. Comparando los resultados obtenidos de estos estudios (degeneración rápida por sección transversal de nervios periféricos) con la degeneración progresiva observada en CMT2Z, en los pacientes podría estar mimetizándose el mismo proceso pero a una velocidad inferior, generándose *axonal swellings* junto con un proceso gradual de muerte. Por todo ello, el desarrollo de inflamaciones axonales inducidas por la mutación p.S87L, podría tanto alterar el tráfico axonal, como fomentar la degeneración y muerte neuronal, explicando en parte las diferencias de gravedad clínica manifestada por los pacientes portadores de esta mutación y aquéllos que portan la mutación más frecuente, p.R252W.

C2.4.6. Las mutaciones p.S87L y p.R252W y la alteración del transcriptoma

Establecidas alteraciones bioquímicas y estructurales, quisimos estudiar el perfil transcriptómico inducido por ambas mutaciones con el propósito de mejorar nuestra comprensión del mecanismo subyacente a la enfermedad, tanto en el modelo celular humano como en el modelo neuronal de rata.

Los resultados obtenidos en fibroblastos de pacientes confirmaron la represión predominante de los genes *ZNF*, como ocurriera en células SK.N.SH que sobreexpresaban p.R252W (Tchasochnikarova *et al.*, 2017), junto con la represión de otras familias de genes, como la familia homeobox y los genes codificantes de proteínas transmembrana. Del mismo modo, el análisis transcriptómico llevado a cabo en paralelo a partir de neuronas sensoriales de rata infectadas con hMORC2-WT y las mutaciones p.S87L y p.R252W, mostraba un perfil de alteración génica similar al identificado en fibroblastos, ya que resultaban enriquecidos grupos como los genes *ZNF* o los genes homeobox. Adicionalmente, en el modelo neuronal empleado, se apreciaba que ambas mutaciones alteraban la expresión de receptores de neurotransmisores y que para la mutación p.S87L, se sumaría un cuarto grupo génico desregulado de interés, las quinesinas.

Dentro del grupo de genes *ZNF*, se engloban numerosos factores transcripcionales que incluyen secuencias de unión a DNA de tipo *zinc-finger*. No obstante, también son capaces de unirse a muchas otras estructuras intracelulares, tales como RNA, lípidos o proteínas (Gibson *et al.*, 1988). De entre las funciones atribuidas a estos genes, se encuentran la regulación transcripcional, la degradación de proteínas, la participación de procesos de señalización celular, la reparación de DNA o la migración celular (Cassandri *et al.*, 2017). Además, algunos integrantes de la familia ZNF han sido previamente relacionados con enfermedades neurodegenerativas (Cassandri *et al.*, 2017). Por ejemplo, en AME se ha establecido que el factor transcripcional *ZPRI* es fundamental para la movilización desde el citoplasma hasta el núcleo de la proteína SMN, clave para la supervivencia de la neurona motora (Helmken *et al.*, 2003). Tanto en pacientes con AME como en modelos murinos, se ha correlacionado una baja expresión de *ZPRI* con un aumento de la muerte neuronal y en consecuencia, con una agravación directa de la sintomatología (Ahmad *et al.*, 2012). También se ha establecido que la sobreexpresión del factor transcripcional *ZNF746*, conduce a una pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra en un modelo murino de la enfermedad de Parkinson (Shin *et al.*, 2011). En relación a CMT2Z, la represión del grupo de genes *ZNF* es el factor común en

todos los estudios transcriptómicos realizados. Tchasovnikarova *et al.*, (2017) mostró que la sobreexpresión de p.R252W en células KO para *MORC2*, conducía a una fuerte represión de genes *ZNF*. Posteriormente, nuestros estudios en fibroblastos de pacientes y en modelos neuronales, han corroborado que los genes *ZNF* son dianas transcripcionales de p.R252W, y también han mostrado la represión de los mismos mediada por p.S87L. Todo ello indicaría que la represión de los genes *ZNF* es una vía de acción común afectada por mutaciones en *MORC2*.

En el caso de los genes homeobox, éstos estaban alterados en los dos modelos celulares que hemos empleado. Los genes homeobox codifican para factores de transcripción implicados en el desarrollo temprano (Mavilio *et al.*, 1986). *Morc2* presentó un perfil de expresión en tejido nervioso altamente regulado, siendo predominante en etapas embrionarias y primeras fases del desarrollo postnatal, y actúa como regulador de la expresión de genes homeobox, y consecuentemente, es lógico pensar que *MORC2* desempeña un papel en el desarrollo del SN.

En contexto neuronal detectamos la alteración de diferentes tipos de receptores de neurotransmisores inducida por la sobreexpresión de p.R252W y p.S87L. Así, se observó la desregulación de receptores GABA y receptores glutamatérgicos, así como de receptores de acetil-colina y otras proteínas transportadoras, como SLCs (*solute carriers*) o TMEM (*transmembrane members*). El neurotransmisor GABA envía señales inhibitorias a nivel de SN (Glatt *et al.*, 1997), y dentro del grupo de receptores alterados, identificamos dos comunes a ambas mutaciones: *Gabra1* y *Gabra5*. *Gabra1* es un regulador clave en el desarrollo de los nervios periféricos, y presenta un patrón de expresión durante el desarrollo muy similar al de *Morc2* (Wang *et al.*, 2018). Además, mutaciones en *Gabra1* causan encefalopatía epiléptica (MIM 615744) (Carvill *et al.*, 2014). En cuanto a *Gabra5*, duplicaciones génicas parciales han sido previamente publicadas asociadas al síndrome de Prader-Willi (MIM 176270) o al síndrome de Angelman (MIM 105830) (Ritchie *et al.*, 1998). Adicionalmente a los receptores de neurotransmisores de tipo inhibitorio, también hemos identificado la alteración de expresión de receptores de acetil-colina (*Chrn4*) o ácido glutamatérgico (*Grik3*), ambos de naturaleza excitatoria del SN. Singularmente, en las neuronas infectadas con p.S87L se produjo una sobreexpresión de quinesinas, genes codificantes de proteínas motoras que llevan a cabo el transporte anterógrado en los axones. El hecho de haber identificado *axonal swellings* en estos cultivos neuronales podría explicar la sobreexpresión de

quinesinas como efecto celular compensatorio, ya que la presencia de estas aberraciones estructurales implica un fallo generalizado en los procesos de transporte neuronal llevado a cabo por quinesinas y dineínas (Martin *et al.*, 1999; Goldstein, 2001).

Al analizar en nuestro modelo neuronal la expresión de genes CMT homólogos de rata, detectamos que la represión de *Hspb1* es un factor común a ambas mutaciones clínicas. *Hspb1* codifica la chaperona HSP27 (*heat-shock protein 27*) y sus mutaciones clínicas causan CMT2F (MIM 606595) y NMHD tipo IIB (MIM 608634) (Evgrafov *et al.*, 2004; Kijima *et al.*, 2005; Houlden *et al.*, 2008). HSP27 juega un papel clave en la inhibición de la muerte neuronal (Sanchez *et al.*, 2008), así como, en el establecimiento de la red de neurofilamentos axonales (Zhai *et al.*, 2007). De hecho, en cultivos de neuronas motoras de ratón que sobreexpresan la mutación HSPB1 p.S135F, se ha detectado la formación de *axonal swellings* producto de la acumulación de neurofilamento ligero (NFL) (Zhai *et al.*, 2007). En nuestro modelo neuronal con expresión de p.S87L, los *axonal swellings* fueron inmunodetectados con el anticuerpo SMI32, que reconoce el neurofilamento pesado (NFH), por lo que no podemos asegurar que en estos acúmulos esté ausente NFL. Independientemente, los resultados combinados de transcriptómica e inmunofluorescencia, evidenciaron que, al igual que ocurriese con la mutación p.S135F, la represión de *Hspb1* inducida por la sobreexpresión de p.S87L, podría favorecer la formación de *axonal swellings* por alteración de la dinámica de neurofilamentos axonales.

C2.4.7. Fisiopatología CMT2Z: modelos propuestos

Mutación p.R252W (Figura C2.D4): La sustitución de arginina por triptófano en posición 252 en la proteína MORC2, provoca una alteración del módulo generado entre el dominio ATPasa y el dominio CW. Consecuencia de esta alteración, se produce una desregulación de la dinámica de dimerización, que conlleva, *in vitro*, una disminución de actividad ATPasa. En nuestros modelos celulares, corroboramos que existía una tendencia a una actividad ATPasa disminuida y una alteración significativa de la expresión génica. Además de genes *ZNF*, la mutación p.R252W provoca una desregulación de receptores de neurotransmisores. Este último hallazgo podría ser el responsable de un fallo generalizado de comunicación interneuronal en el SNP, que contribuiría al fenotipo clínico asociado con la mutación p.R252W.

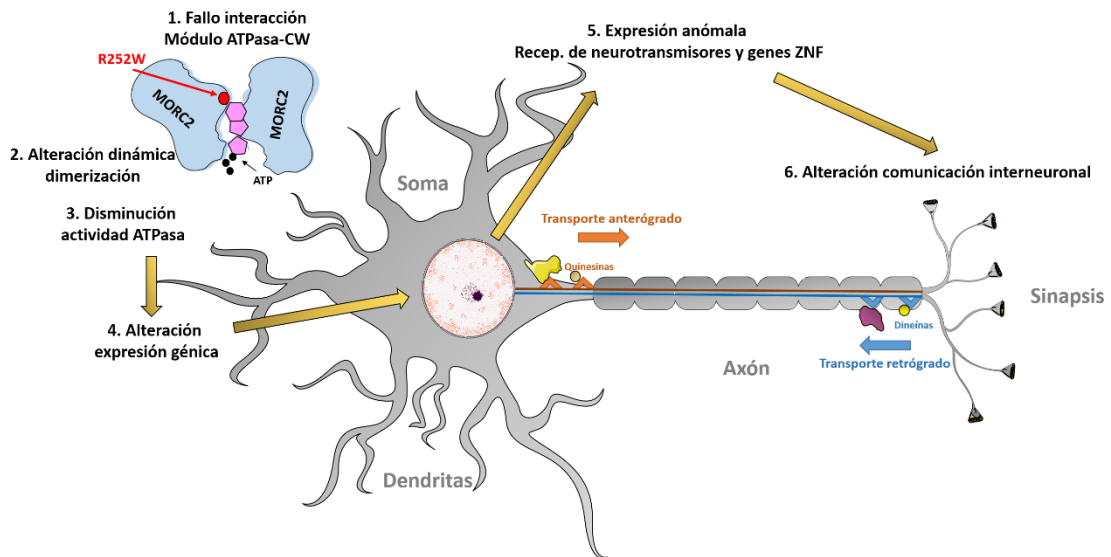


Figura C2.D4. Representación esquemática del modelo de afectación neuronal propuesto para la mutación p.R252W.

Mutación p.S87L (Figura C2.D5): La sustitución de lisina por serina en posición 87 de la proteína MORC2, provoca un secuestro de la molécula de ATP en el centro activo del dominio ATPasa, induciendo una dimerización constitutiva de MORC2. Producto de esta dimerización, se pierde por completo la actividad ATPasa *in vitro*, y se observa una alteración de la expresión génica, predominantemente de genes *ZNF* y de receptores de neurotransmisores. Como ocurriera con la mutación p.R252W, la desregulación de receptores de neurotransmisores, podría afectar de forma generalizada a la comunicación interneuronal, pudiendo ser el factor común en la fisiopatología derivada de CMT2Z. Como característica adicional, la sobreexpresión de la mutación p.S87L induce la generación de *axonal swellings* y el aumento de expresión de quinesinas. La aparición *in vitro* de este fenotipo axonal, podría establecer *in vivo* una comunicación soma-sinapsis anómala mediante la alteración del transporte axonal, así como, la muerte neuronal causada por degeneración *walleriana*. Todo ello podría incrementar la gravedad sintomatológica y/o la progresión de la patología, y por tanto, explicar las diferencias de gravedad y evolución observadas entre los pacientes CMT2Z con la mutación p.R252W y la mutación p.S87L, que se asocia a un fenotipo clínico de AME congénito.

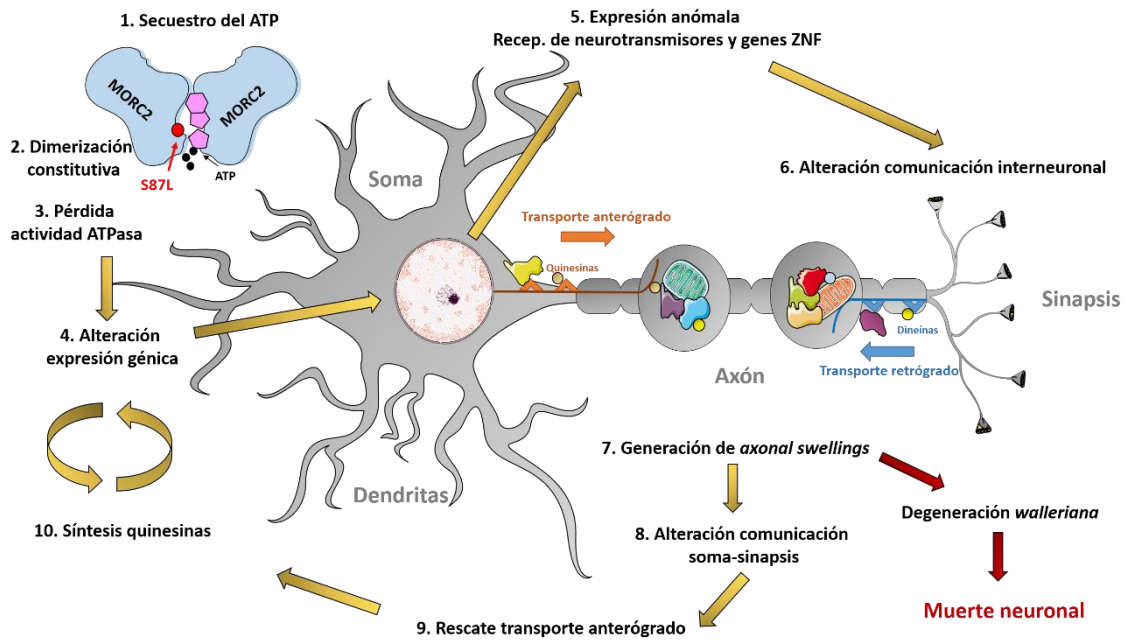


Figura C2.D5. Representación esquemática del modelo de afectación neuronal propuesto para la mutación p.S87L.

Considerando los resultados logrados en la presente tesis, así como los publicados hasta el momento (Tchasovnikarova *et al.*, 2017; Douse *et al.*, 2018), se sugiere que tanto el transporte intracelular como la comunicación interneuronal son procesos dañados en la fisiopatología CMT2Z.

El transporte intracelular es esencial en el SNP para una correcta comunicación entre el soma, el axón y las dendritas. De hecho, genes implicados en transporte axonal están relacionados con diferentes subtipos de CMT: CMT2O [MIM 614228; gen *DYNC1H1* (Weedon *et al.*, 2011)], CMT2B1 [MIM 605588; gen *LMNA* (De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2002)], CMT2F [MIM 608634; gen *HSPB1* (Evgrafov *et al.*, 2004)] y CMT2L [MIM 608673; gen *HSPB8* (Irobi *et al.*, 2004)].

La comunicación interneuronal deficiente, se establece entre otros factores, por desregulación de la expresión génica de receptores de diferentes tipos de neurotransmisores. La súperfamilia GPCR (incluye receptores GABA y colinérgicos) han sido clásicas dianas en tratamientos de enfermedades del SNP, dada su conocida implicación en múltiples procesos metabólicos de neuronas y células de Schwann (Mogha *et al.*, 2016). De hecho, los receptores GPCR actualmente son dianas terapéuticas en CMT1A (MIM 118220), causado por la duplicación del gen *PMP22* (constituye la forma más frecuente de CMT). En la última revisión publicada sobre terapias farmacológicas

para CMT1A (Kiepusa and Kochański, 2018), se recogen los estudios preclínicos de diferentes compuestos (actualmente en fase III), los cuales tienen en común la inhibición de receptores GPCR con el objetivo de aumentar los niveles de AMP cíclico (AMPC). Los autores demuestran que bajos niveles de AMPC inhiben la expresión de factores transcripcionales y genes de la mielina, además de alterar rutas tan relevantes para la mielinización como la vía neuregulina-1(NRG1)-ErbB2. Es tentador especular que también para CMT2Z la sobreexpresión observada de receptores GPCR condujera a un descenso de AMPC y que ello, afectara de forma similar a la homeostasis de la neurona.

C2.5. Conclusiones

- 1.- Mutaciones en el gen *MORC2* causan CMT2Z, forma frecuente de neuropatía axonal. La mutación c.754C>T (p.R252W) supone más del 50% de los casos y ocasiona un fenotipo clínico de CMT2. Mientras que, la mutación c.260C>T (p.S87L) está presente en tres familias y conduce a un fenotipo clínico de AME.
- 2.- *MORC2* presenta dos isoformas transcripcionales, siendo NM_001303256.3 la isoforma canónica en tejidos nerviosos humanos y fibroblastos de pacientes CMT2Z.
- 3.- La mutación c.754C>T altera parcialmente el procesamiento transcripcional en un sistema *in vitro* por minigenes, pero no lo hace en fibroblastos derivados de pacientes portadores de la mutación.
- 4.- *Morc2* presenta un perfil de expresión altamente regulado durante el desarrollo en cerebro y nervio ciático, siendo predominante en estadios prenatales y primeros días postnatales, y su patrón de expresión coincide con otros genes relevantes en el desarrollo del SNP. Por otro lado, la expresión de *Morc2* en nervio ciático se localiza en axoplasma, células de Schwann y zonas ab-axonales.
- 5.- No hay cambios de localización ni de estabilidad proteica de *MORC2* en fibroblastos de pacientes, células HeLa o modelos neuronales. No obstante, la mutación p.S87L genera *axonal swellings* en la ultraestructura axonal de neuronas sensitivas de rata. Estas alteraciones morfológicas producen perturbaciones en el transporte y degeneración axonal que acaban en muerte neuronal.
- 6.- Las mutaciones p.S87L y p.R252W se localizan en el dominio ATPasa N-ter de *MORC2*. La mutación p.S87L ocasiona una pérdida completa de actividad ATPasa *in vitro*, mientras que la mutación p.R252W genera un descenso no significativo de la misma.
- 7.- El perfil transcriptómico causado por las mutaciones p.R252W y p.S87L en fibroblastos de pacientes y en el modelo neuronal, evidencia la alteración de grupos génicos como *ZNF*, homeobox o genes codificantes de proteínas transmembrana. En particular, el modelo neuronal presenta alterados genes implicados en la comunicación interneuronal y el transporte axonal, tales como receptores de neurotransmisores o quinesinas.

MATERIAL Y MÉTODOS

M1. Material biológico

M1.1. *Escherichia coli* DH5 α

Para todas las subclonaciones la cepa utilizada ha sido *Escherichia coli* DH5 α crecida a 37°C en medio completo Luria Bertani (LB, **Anexo 9**). Esta cepa puede actuar como hospedador y amplificador de DNA exógeno y además, presenta un genotipo que maximiza su eficiencia de transformación (**Tabla M.1**).

Tabla M.1. Genotipo y consecuencias fenotípicas de la cepa DH5 α de *E. coli*.

Genotipo	Fenotipo
<i>recA1</i>	Bloquea la recombinación homóloga para evitar recombinaciones DNA exógeno y DNA bacteriano.
<i>endA1</i>	Bloquea la degradación del DNA exógeno por medio de la inactivación de la endonucleasa I.
<i>gyrA96</i>	Confiere resistencia al ácido nalidíxico (sintetizado por el gen <i>ccdB</i>), tóxico par la mayoría de cepas de <i>E. coli</i> .
<i>lacUI69</i>	Permite la selección por color.
<i>hsdR17</i>	Mejora la eficiencia de transfección de DNA no metilado debido a la inactivación de la endonucleasa <i>EcoKI</i> .
<i>relA1</i>	Distribución lipídica anómala en las membranas, facilitando la formación de poros producidos por agentes externos como sonicación y choques térmicos u osmóticos.
<i>thi-1</i>	Cepa auxótrofa para tiamina.
<i>glnV44</i>	Supresión de los codones de parada UAG, necesarios para el crecimiento de algunos fagos.

En relación a la selección de plásmidos, el medio de crecimiento LB fue suplementado con diferentes antibióticos en función de la resistencia presente en el vector: ampicilina (50-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Asimismo, la criopreservación de las cepas se realizó en viales con glicerol al 20% a -80°C.

M1.2. Órganos, tejidos y extractos de ratón

Para los estudios de inmunofluorescencia y WB de Morc2, se emplearon ratones control C57BL/6J (Charles River). En relación a los estudios de expresión por WB se utilizaron extractos proteínicos totales derivados de ratón adulto (cerebro, médula espinal, nervio ciático, músculo estriado, tejido adiposo, corazón, hígado, estómago, riñón y pulmón),

así como de tejidos exclusivamente nerviosos (cerebro, médula espinal y nervio ciático) extraídos en diferentes puntos del desarrollo postnatal (desde P0 hasta P120). Del mismo modo, para la extracción de RNA a partir de tejidos murinos, se empleó el kit comercial “Tripure isolation reagent” (Roche).

Finalmente, en relación a los estudios de inmunofluorescencia de cortes transversales y preparaciones de *teased fibres* se emplearon ratones a día P56. Los nervios destinados a la generación de cortes transversales fueron fijados utilizando un volumen diez veces mayor de PFA al 4% durante 24 h. El tejido fijado se lavó con PBS durante 15 min en agitación suave y se incluyó en una solución de agar y sacarosa para preservar su ultra-estructura. Los tejidos embebidos en agar, se sumergieron en OCT y fueron conservados a -80°C. La generación de cortes de entre 10 y 20 µm de grosor fue realizada con un criotomo de congelación.

M1.3. DRGs y neuronas sensoriales de rata

Para la generación de cultivos primarios de neuronas sensoriales de rata, se emplearon ratas control Sprague-Dawley (Charles River). La colonia se amplificó y mantuvo en el Servicio de Animalario del Karolinska Institutet (Estocolmo). La extracción de DRGs se hizo a partir de embriones de rata Sprague-Dawley a día E14,5. Los DRGs aislados fueron disgregados con 0,25% de Tripsina [0,25% (v/v) EDTA] durante 1 h a 37°C, centrifugados a 1000 rpm durante 15 min y resuspendidos en “Medio C” (**Anexo 9**). Las células disgregadas fueron incubadas en cubre-objetos de vidrio de 12 mm previamente tratados con Matrigel a una concentración de 1,5 DRG/cubre-objeto, durante toda la noche a 37°C y 5% de CO₂. Al día siguiente, el medio fue reemplazado por medio neurobasal (**Anexo 9**), que favorece el crecimiento neuronal. Los cultivos se mantuvieron en este medio, que fue renovado cada dos días durante una semana. Con el fin de conseguir cultivos puros de neuronas sensoriales, se alternó durante tres semanas (con cambios cada dos días) el medio neurobasal con el mismo medio suplementado con fluorodeoxiuridina (FrdU), que elimina células no-neurales contenidas en los DRGs (medio neurobasal + FrdU, **Anexo 9**).

M1.4. Vectores lentivirales

La generación de vectores lentivirales se realizó en el laboratorio del Dr. Roman Chrast en el Karolinska Institutet (Estocolmo) y el protocolo que se siguió se especifica a continuación. Las partículas lentivirales se produjeron mediante cotransfección en células HEK293T del vector pSlik-Hygro que contenía GFP, *MORC2*-WT, p.R252W o p.S87L bajo un promotor inducible por doxiciclina, y los vectores PLP1, PLP2 y PLP/VSVG. Las células transfectadas fueron crecidas a 37°C al 5% de CO₂ con medio DMEM completo (**Anexo 9**). A las 12 h post-transfección el medio fue cambiado y tras 48 h, se aisló el medio líquido conteniendo las partículas víricas. Tras la concentración de las mismas por centrifugación (24.000 rpm, 4 h, 4°C), éstas fueron alicuotadas y conservadas a -80°C hasta su utilización.

M1.5. Líneas celulares

La línea celular humana empleada fue la línea tumoral HeLa (cáncer cérvico-uterino, ECACC no. 93921913). Las células fueron crecidas en monocapa adherente en un incubador a 37°C y al 5% de CO₂ en medio DMEM completo. Para el correcto mantenimiento de los cultivos, se llevó a cabo una tripsinización (Tripsina al 0,25% (v/v) de EDTA) cada tres días con el objetivo de que la confluencia de los mismos nunca superase un 90%. Asimismo, los cultivos se expandieron y conservaron en crioviales en tanques de N₂ (-196°C) en medio de congelación (**Anexo 9**). La manipulación de todos los cultivos celulares se realizó en una campana de flujo laminar de bioseguridad de tipo II/B3.

M1.6. Biopsias de piel humana

A siete individuos (cinco pacientes y dos controles sanos) se les hizo una biopsia de piel para poder realizar los diferentes experimentos de la presente tesis (**Tabla M.2**).

Tabla M.2. Material derivado de biopsia de piel.

Nombre	Genotipo	Fenotipo	Origen	Fibroblastos	Cortes IF
F-R252W₁	<i>MORC2</i> c.754C>T (p.R252W)	CMT2Z	Valencia	Sí	Sí
F-R252W₂	<i>MORC2</i> c.754C>T (p.R252W)	CMT2Z	Australia	Sí	No
F-R252W₃	<i>MORC2</i> c.754C>T (p.R252W)	CMT2Z	R. Checa	Sí	No
F-S87L	<i>MORC2</i> c.260C>T (p.S87L)	AME	Madrid	Sí	No
F-AIFM1	<i>AIFM1</i> c.629T>C (p.F210S)	NMHD	Madrid	Sí	No
F-Control₁	Control	Sano	Valencia	Sí	Sí
F-Control₂	Control	Sano	Australia	Sí	No

IF: inmunofluorescencia; CMT2Z: Charcot-Marie-Tooth axonal subtipo Z; AME: atrofia muscular espinal; NMHD: neuropatía motora hereditaria distal.

La extracción de biopsias fue realizada en el Departamento de Neurología del Hospital U. i P. La Fe (Valencia) en colaboración con el Dr. Juan Vílchez y la Dra. Teresa Sevilla (F-R252W₁, F-Control₁), en el Servicio de Neuropediatría del Hospital U. La Paz (Madrid) en colaboración con el Dr. Samuel Ignacio Pascual-Pascual (F-S87L) y en el Departamento de Neurología y Pediatría del Hospital U. 12 de Octubre (Madrid) en colaboración con la Dra. Ana Camacho y la Dra. Cristina Domínguez (F-AIFM1). Las muestras F-Control₂ y F-R252W₂ fueron amablemente cedidas por la Dra. Marina Kennerson (*Concord Clinical School ANZAC Research Institute, Sidney*) y la muestra F-R252W₃ por la Dra. Petra Lassuthova (*University Hospital Motol, Praga*). Las biopsias se extrajeron con un punzón de 4 mm de grosor a partir de la cara interna del antebrazo (obtención y aislamiento de fibroblastos) y a partir de la falange proximal del dedo índice (estudio inmunohistoquímico de los nervios periféricos de la epidermis), se incluyeron en DMEM completo y se mantuvieron en hielo hasta su procesamiento.

M1.7. Cultivo de fibroblastos y cortes histológicos derivados de biopsia de piel

Las biopsias destinadas a la obtención de fibroblastos, se disgregaron en porciones (de 10 a 20 por biopsia) con material estéril y en campana de flujo laminar. Los fragmentos fueron distribuidos en una placa de 60,8 cm² (100 mm de diámetro) y secados al aire durante 15 min a temperatura ambiente (TA). Tras el desecado de la biopsia, se añadió medio de crecimiento de fibroblastos basal (**Anexo 9**) y se guardó la placa a 37°C con una atmósfera del 5% de CO₂. Tras 20 días de incubación (renovando el medio cada tres días), se amplificaron las líneas de fibroblastos y se conservaron en N₂ (-196°C) con medio de congelación (**Anexo 9**) hasta su posterior utilización.

Las biopsias de piel humana destinadas al estudio inmunohistoquímico de MORC2 en los nervios periféricos de la epidermis fueron lavadas con PBS en agitación a TA durante 5 min. Posteriormente, se fijaron en PFA al 4% durante toda la noche a 4°C. Tras la fijación y abundantes lavados en PBS, se incluyeron en OCT y fueron congeladas a -80°C. Los cortes de 50 µm se obtuvieron con un criotomo de congelación.

M1.8. Obtención de RNA humano derivado de DRGs y médula espinal

El RNA total aislado de DRGs se obtuvo a partir de tres abortos distintos de fetos humanos dentro del primer trimestre (semana 7,5, 8-8,5 y 9, respectivamente) con el consentimiento oral y por escrito de la progenitora en cuestión en cada caso y siguiendo todos los protocolos éticos vigentes en Suecia (*The Regional Human Ethics Committee*). Asimismo, el RNA aislado de médula espinal humana de regiones lumbar y cervical, se obtuvo a partir de individuos *postmortem* que donaron las muestras al *Netherlands Brain Bank* (NBB, www.brainbank.nl) y al *National Disease Research Interchange* (NDRI, www.ndriresource.org).

M2. Métodos moleculares

M2.1. Extracción de DNA plasmídico

La extracción de DNA plasmídico (pDNA) se llevó a cabo a partir de cultivos de *E. coli* crecidos en medio LB líquido en incubador orbital durante 16 h a 37°C. La selección de bacterias que replicaran los plásmidos se hizo mediante la adición del antibiótico apropiado, según el gen de resistencia que expresara cada plásmido. Seguidamente, la purificación de pDNA a pequeña escala se realizó utilizando el kit de extracción “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche) o el kit “PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit” (Life Technologies) para extracciones a mediana escala.

M2.2. Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico (gDNA) se realizó a partir de sangre periférica extraída en tubos de 4 mL con EDTA como anticoagulante, en el Servicio de Genómica y Genética Traslacional (SGGT) del CIPF (Valencia). Dicha extracción se realizó utilizando el kit “Wizard® Genomic DNA Purification” de Promega. La extracción de DNAg a partir de líneas celulares se realizó con el mismo kit y a partir de cinco millones de células totales crecidas previamente.

M2.3. Cuantificación de DNA genómico y plasmídico

Tras la extracción de los ácidos nucleicos, se procedió a su cuantificación empleando el espectrofotómetro “NanoDrop ND1000” (NanoDrop Technologies). Se obtuvo la concentración de DNA (en ng/μL) y su grado de pureza mediante los ratios de absorbancia 260/280 (cuantifica la contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas) y 260/230 (cuantifica el grado de contaminación de sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos). Los valores aceptados para un DNA puro fueron 1,8-2 para el ratio 260/280 y 2 para el ratio 260/230.

M2.4. Amplificación de DNA mediante PCR

La amplificación de DNA se llevó a cabo mediante PCR usando cebadores específicos para cada región de interés. En las PCRs destinadas a secuenciación de fragmentos de gDNA, se empleó la enzima “Taq DNA polimerasa” (Biotools), de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial. Las modificaciones al protocolo estándar, estaban de acuerdo con la longitud del fragmento (60 segundos de extensión por cada kb de DNA) y a la temperatura de hibridación de cada par de cebadores (entre 50°C y 65°C) (**Tabla M.3**). Asimismo, para fragmentos de difícil amplificación, se adicionó DMSO (evita la formación de estructuras secundarias) o se modificaron las cantidades de MgCl₂ (aumenta la eficiencia de actividad de la polimerasa aunque puede reducir su especificidad).

Tabla M.3. Condiciones de amplificación estándar para la Taq DNA polimerasa.

	Desnaturalización inicial	95°C, 5 min
Programa cíclico x 35	Paso 1:Desnaturalización	95°C, 30 seg
	Paso 2: Hibridación	50-65°C, 30 seg
	Paso 3: Extensión	72°C, 30-90 seg
	Extensión final	72°C, 7 min

Para amplificar fragmentos de DNA que posteriormente se utilizarían en subclonaciones se empleó la “Pfu DNA Polimerasa” (Stratagene), siguiendo las instrucciones de su protocolo comercial. A diferencia con la “Taq DNA polimerasa”, la “Pfu DNA polimerasa” posee actividad exonucleasa 3’-5’, lo que le confiere una mayor fidelidad de amplificación corrigiendo la adición de nucleótidos erróneos en el extremo 3’ de la hebra de DNA.

M2.5. Extracción y cuantificación de RNA a partir de cultivos celulares

Las extracciones de RNA se realizaron utilizando diferentes kits comerciales, en cada caso siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante. De este modo, para los experimentos de qPCR/RT-PCR de rutina, se empleó el kit “Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus” (Zymo Research) y, para los estudios transcriptómicos de fibroblastos y neuronas

sensoriales de rata, se utilizó el kit “RNeasy Mini Kit” (Qiagen). La cuantificación y el análisis de pureza de los RNAs extraídos se analizaron utilizando el espectrofotómetro “NanoDrop ND1000” (NanoDrop Technologies). En este caso, los valores aceptados de los ratios 260/280 y 260/230 para un RNA de calidad fueron 2-2,2 y 2, respectivamente.

M2.6. Síntesis de cDNA mediante retrotranscripción

La síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó a partir de 1 µg de RNA utilizando el kit “qScript cDNA Supermix” (Quanta Bio), excepto para el cDNA que se obtuvo a partir de tejidos nerviosos humanos (se partió de 0,5 µg de RNA) y para el testado de infección de cultivos primarios de neuronas sensoriales de rata (se partió de 0,15 µg de RNA), debido a la baja cantidad de producto de la que se disponía. Para estos dos últimos casos se empleó la transcriptasa “PrimeScript Reverse Transcriptase” (Takara).

M2.7. PCR cuantitativa

La cuantificación de la expresión génica a partir de cDNA se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa (qPCR/RT-PCR) utilizando el fluorocromo “LightCycler® 480 SYBR®” (Roche) en el aparato “LightCycler® 480 Instrument II” (Roche) mediante cebadores específicos para cada transcrito (**Anexo 10**).

M2.8. Vectores, subclonaciones y mutagénesis dirigida

Los fragmentos de cDNA que contienen la pauta de lectura abierta del gen de interés (ORF, *open reading frame*) se adquirieron en el repositorio “Mammalian Gene Collection (MGC) Clones” (Dharmacon), o fueron cesiones de otros grupos de investigación. Para cualquiera de los casos anteriores, se adicionaron secuencias diana de las enzimas de restricción compatibles con las que disponía el vector aceptor mediante amplificación por PCR utilizando la enzima “Pfu DNA Polimerasa” (Promega), y unas condiciones del termociclador adecuadas al tamaño del fragmento. Seguidamente, vector e inserto se digirieron con las enzimas de restricción adecuadas y la mezcla de digestión se purificó utilizando el kit “NucleoSpin Plasmid” (Macherey-Nagel). En los casos en los que se daban religaciones espontáneas de los vectores digeridos, éstos se trataron con la enzima

“Alkaline Phosphatase” (Roche). La ligación del inserto al vector se realizó utilizando la enzima “T4 DNA ligase” (Promega) con un ratio de concentraciones inserto-vector de 3:1 y partiendo de 50 µg de vector digerido. Finalmente, se transformaron cepas de *E. coli* DH5α competentes mediante choque térmico y se comprobó la subclonación mediante secuenciación *Sanger*. En el **Anexo 10** se listan todos los cebadores que se utilizaron para llevar a cabo todas las subclonaciones.

Por otro lado, la generación de mutaciones puntuales en las construcciones plasmídicas se llevó a cabo a través de PCR por círculo rodante utilizando cebadores específicos que incluían el cambio nucleotídico en cuestión (**Anexo 10**), siguiendo el protocolo descrito en “QuickChange Site-Directed Mutagenesis” (Agilent). Después de la reacción de PCR, el pDNA de partida (que no incluía la mutación deseada) se degradó tras la incubación durante 1 h con 1 µL de la enzima *DpnI* a 37°C (*DpnI* hidroliza secuencias de DNA metilado provenientes de la replicación en *E. coli*). Finalmente, el producto de PCR digerido, se transformó en cepas competentes de *E. coli* DH5α mediante choque térmico y las mutaciones generadas en las construcciones se confirmaron mediante secuenciación *Sanger*. En el **Anexo 11** se muestran todas aquellas construcciones generadas mediante procesos de subclonación y/o mutagénesis dirigida.

M2.9. Transfecciones transitorias e infección de cultivos

Los experimentos de transfección transitoria llevados a cabo en la línea celular HeLa, se realizaron mediante un método basado en la adición de lípidos catiónicos capaces de atravesar la membrana plasmática de células en cultivo con una confluencia entre el 40-80% (“FuGENE® HD Transfection Reagent”- Promega). Para todos los casos, el ratio FuGENE (µL): DNA plasmídico (µg) utilizado fue de 5:2, y las células permanecieron en contacto con la mezcla de transfección durante 24 h.

Por otro lado, los procesos de infección mediante virus de células HeLa y cultivos primarios de neuronas sensoriales de rata, con el objetivo de sobreexpresar MORC2 y sus mutantes, se realizaron exponiendo a las células a lentivirus que encapsidaban los constructos de interés (GFP, MORC2-WT, MORC2-R252W, MORC2-S87L) en medio neurobasal (cultivos primarios neuronales) o en DMEM completo (células HeLa) durante 12 h. Posteriormente, las células infectadas fueron seleccionadas mediante la adición del

antibiótico higromicina (200 µg/mL) (cuatro ciclos de cambios de medio durante ocho días). La expresión del cDNA exógeno fue inducida con el antibiótico doxiciclina (2 µg/µL) durante cuatro días.

M2.10. Silenciamiento génico mediante si-RNA

Para validar la especificidad del anticuerpo policlonal anti-MORC2 (Santa Cruz Biotechnology), células HeLa fueron transfectadas con 25 µg de RNA de interferencia (siRNA; *short interfering RNA*) de MORC2 y su control vacío siguiendo el protocolo del kit “DharmaFECT™ Transfection Reagents” (Dharmacon). Tras 24 h de incubación, se extrajo el RNA total, se retrotranscribió a cDNA y se amplificó un fragmento de *MORC2* utilizando la pareja de cebadores h*MORC2_4* (**Anexo 10**). Los resultados de la RT-PCR se normalizaron utilizando cebadores para el gen *GAPDH*. En paralelo, se llevó a cabo una extracción de proteína total y una inmunodetección de MORC2 mediante WB utilizando actina como control de carga.

M2.11. Ensayos de inmunofluorescencia

Para el estudio inmunohistoquímico de biopsia de piel humana, los cortes se descongelaron a TA y seguidamente, se sumergieron en una solución de conservación (**Anexo 9**). Posteriormente, se sumergieron en solución de bloqueo (**Anexo 9**), durante 3 h a TA y en agitación. La incubación del anticuerpo primario fue en solución de bloqueo, durante toda la noche a TA y en agitación. Al día siguiente se realizaron 4 lavados con la solución de lavado (**Anexo 9**) y se incubó durante 2 h a TA y en agitación el anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo en solución de bloqueo. Finalmente, se lavaron tres veces los cortes con PBS y se montaron en portas con la solución de montaje “Vectashield” (Vector Laboratories) que incluye DAPI para la tinción nuclear. En paralelo, se emplearon algunos cortes para estudiar la ultra-estructura de la epidermis en paciente y control sano, utilizando la tinción de hematoxilina-eosina. Para los estudios de localización intracelular de las diferentes proteínas de interés en cultivos primarios de fibroblastos humanos, líneas celulares o cultivos primarios de neuronas sensoriales de rata, así como para evaluar la expresión histológica de *Morc2* en nervio periférico, se siguió el protocolo que se especifica en la **Tabla M.4**. Los anticuerpos utilizados y sus

condiciones particulares de uso se especifican en el **Anexo 12**. Los porta-objetos fueron examinados con el microscopio confocal SP2 o SP8 (Leica), excepto el análisis de cultivos de neurona sensorial de rata, para el cual se utilizó un microscopio confocal LSM880 (Zeiss).

Tabla M.4. Protocolo general de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos primarios.

Procedimiento	Solución	Condiciones
Fijación	PFA 4%* en PBS	10 min, TA
Permeabilización	TX-100 0,25% ó Saponina 0,1%*# en PBS	15 min, TA
Bloqueo	HS 5%# en PBS	1 h, TA
Anticuerpo Primario	Concentración optimizada en solución de Bloqueo	16 h, 4°C
Anticuerpo Secundario conjugado con fluorocromos	Concentración optimizada en solución de Bloqueo	2 h, TA
Montaje	<i>Vectashield</i> con DAPI	Secado durante 5 min Sellado con laca

*Alternativamente, en algunos casos se fijó y permeabilizó utilizando metanol puro a -20°C, durante 20 min. #En los siguientes casos, la permeabilización y el bloqueo se hicieron a la vez: cortes de nervio ciático de ratón (HS 5%, TX-100 0,1%) y neuronas sensoriales de rata (5% NGS, 1% BSA y 0,3% TX-100).

M2.12. Obtención de extractos proteicos

Las extracciones de proteína a partir de tejidos murinos destinadas a analizar la expresión por WB se realizaron mediante un homogenizador de tejidos tipo “Polytron” con diferentes volúmenes de tampón RIPA (*Radioimmunoprecipitation assay*) (**Anexo 9**) en función de las características estructurales de cada tejido.

Para extraer proteína total a partir de cultivos de fibroblastos o células HeLa, las células se lavaron con PBS y se despegaron con tripsina [0,25% (v/v) EDTA] durante 3 min a 37°C. Se recogieron con medio de cultivo para inactivar la tripsina y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min a 4°C. Se resuspendió el *pellet* con tampón RIPA durante 30 min y se obtuvieron los extractos proteicos en el sobrenadante después de centrifugar las muestras durante 20 min a 13.000 rpm y 4°C.

En el caso de los cultivos primarios de neuronas sensoriales de rata, las células se lavaron con PBS y se levantaron con el tampón de lisis neuronal (**Anexo 9**). Se mantuvieron en el tampón de lisis neuronal durante 30 min en hielo y se produjo una rotura mecánica de las mismas con el “Tissue-lyser II” (Qiagen). El extracto proteico neuronal se obtuvo en el sobrenadante tras una centrifugación de 10 min a 13.000 rpm y 4°C.

M2.13. Obtención de extractos proteicos nucleares

Los extractos proteicos nucleares destinados al ensayo de actividad ATPasa de MORC2, fueron preparados siguiendo el método por alta concentración de sales descrito previamente (Li *et al.*, 2012). Las células confluentes sembradas en placas de 60,8 cm² (100 mm de diámetro), se levantaron en hielo en una solución de PBS conteniendo 0,01% (v/v) de NP-40 y centrifugadas a 2.000 rpm durante 10 min a 4°C. El *pellet* celular, se resuspendió e incubó durante 5 min en hielo en 150 µL de solución A (**Anexo 9**). Posteriormente, se añadió el mismo volumen de solución B (**Anexo 9**) y se incubó la mezcla en hielo durante 10 min. Los núcleos fueron obtenidos en el *pellet* tras una centrifugación a 2200 rpm durante 10 min a 4°C y seguidamente, se lisaron las membranas nucleares durante 1 h gracias a la adición de 100 µL de solución C (**Anexo 9**) y a la acción mecánica de pipeteo cada 10 min en hielo. Las membranas nucleares se descartaron en el sobrenadante celular tras una centrifugación a 14.000 rpm durante 20 min a 4°C, y los extractos nucleares se resuspendieron en 270 µL solución D (**Anexo 9**). Las muestras se mantuvieron en hielo para ser finalmente procesadas.

M2.14. Cuantificación de extractos proteicos, SDS-PAGE y WB

Todos los extractos proteicos se cuantificaron por colorimetría, empleando el kit “BCA” (Thermo Fisher). Las alícuotas con la concentración deseada, se llevaron a ebullición durante 5 min a 96°C en tampón de carga de proteínas (**Anexo 9**) e incubadas en hielo durante 5 min. Para los ensayos de WB, diferentes cantidades de extracto proteico (oscilando entre 10 y 50 µg, según los niveles de expresión de la proteína a analizar) se cargaron en geles de poliacrilamida de concentración variable (oscilando entre 8% y el 15%, según el tamaño de la proteína a analizar) en el sistema electroforético “Miniprotean

Electrophoresis System” (BioRad) y separadas por SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). La electroforesis se realizó a 100 voltios y en tampón de separación de proteínas (**Anexo 9**). Seguidamente, se llevó a cabo una transferencia a membrana de PVDF (BioTrace PVDF, Pall Corporation) durante 90 min a 100 voltios y 4°C en tampón de transferencia de proteínas (**Anexo 9**). Las membranas se bloquearon utilizando leche desnatada al 5% (v/v) en TBST (**Anexo 9**) durante 1 h a TA e incubadas durante 16 h a 4°C con una concentración optimizada de anticuerpo primario en solución de bloqueo. Pasado el tiempo de incubación, las membranas se lavaron abundantemente con TBST y se incuban con los anticuerpos secundarios conjugados con HRP (*horseradish peroxidase*) apropiados en cada caso, en solución de bloqueo durante 1 h a TA. Finalmente, las membranas se revelaron utilizando el reactivo de quimioluminiscencia “ECL Plus” (Amersham Biosciences) mediante un sistema de película fotográfica y la densitometría de las bandas se analizó con el programa informático *ImageJ*. Las especificaciones de uso de cada anticuerpo utilizado en WB se detallan en el **Anexo 14**.

M3. Análisis de genes/proteínas mutadas

M3.1. Análisis de viabilidad celular y apoptosis en fibroblastos

Los fibroblastos fueron crecidos en medio de crecimiento basal o en medio de crecimiento con glucosa (medio de crecimiento basal suplementado con 5 g/L de D-glucosa) durante 3 o 6 días. Las células fueron despegadas utilizando tripsina [EDTA al 0,25% (v/v)] y centrifugadas a 1.000 rpm durante 5 min a TA. Tras descartar el sobrenadante, fueron lavadas con PBS y centrifugadas nuevamente en las mismas condiciones. Finalmente, las células se incubaron con un 1% (v/v) de IP como marcador de viabilidad y con un 5% (v/v) de anexina V como marcador de apoptosis en tampón de unión (**Anexo 9**) y seguidamente se procesaron mediante citometría de flujo (FC500 MPL Flow Cytometer, Beckman).

M3.2. Estudio de la morfología mitocondrial en fibroblastos

Tras la inmunodetección mitocondrial con el anticuerpo Tom20 de fibroblastos crecidos durante dos días con medio de crecimiento de fibroblastos basal o medio de crecimiento

suplementado con galactosa (**Anexo 9**), un total de 150 células por muestra se utilizaron para cuantificar los siguientes parámetros: número de partículas mitocondriales, interconectividad, circularidad y elongación mitocondrial. Para la cuantificación, se utilizó una herramienta dentro del paquete *ImageJ* para el análisis morfológico mitocondrial desarrollada por el Dr. Ruben K. Dagda (University of Nevada, Reno, EEUU).

M3.3. Ensayo de la actividad proteolítica de neprilisina

Para el ensayo proteasa, 20.000 células HeLa se sembraron en placas de cultivo de 1,9 cm² (16 mm de diámetro) y se transfectaron al día siguiente con los constructos de interés: pCMV_HA vacío, pCMV_HA-MME y el mismo plásmido con las cinco mutaciones clínicas (p.R448*, p.P556S, p.N689K, p.H712Y y p.R748W). A las 24 h post-transfección, las células se lavaron con PBS y se incubaron con el péptido Mca-RPPGFSAFK-Dnp (Enzo Life Sciences) a una concentración de 20 μM en Tris-HCl (pH 7,5) a 37°C y en oscuridad. Seguidamente, se recogieron 100 μL del sobrenadante y se transfirieron a placas opacas de 96 pocillos. El análisis se realizó en un lector de placas tipo espectrofotómetro (“CLARIOstar Plus”- BGM Labtech), utilizando como $\lambda_{excitación}$, 328 nm y, como $\lambda_{emisión}$, 393 nm (**Figura M.1**). Además, para una correcta interpretación de los resultados, se normalizaron los datos obtenidos en el ensayo colorimétrico con el nivel de expresión proteica mediante WB.

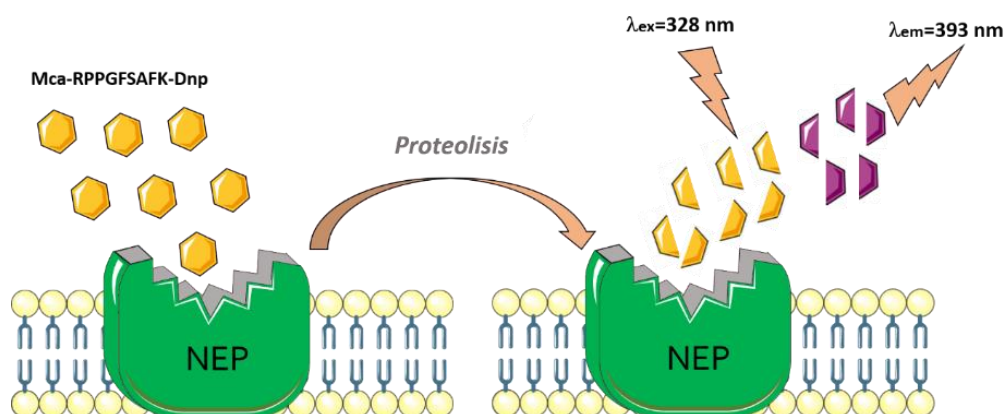


Figura M.1. Esquema de la metodología empleada en el ensayo proteasa. NEP (neprilisina): verde; péptido no hidrolizado: rombo amarillo completo; péptido hidrolizado: fragmento amarillo; péptido hidrolizado y excitado: fragmento violeta.

M3.4. Análisis genético de *MORC2* en pacientes CMT2 sin diagnóstico

El cribado de mutaciones en los exones de *MORC2* que codifican el dominio ATPasa (exones 5-11), se realizó mediante secuenciación *Sanger*, previa amplificación de los fragmentos de interés empleando cebadores específicos (**Anexo 10**), en una cohorte de 74 pacientes CMT2 no relacionados sin diagnóstico genético de nuestra serie clínica.

M3.5. Análisis de las isoformas transcripcionales del gen *MORC2*

Para el estudio de expresión de las isoformas transcripcionales descritas para el gen *MORC2*, se sintetizó cDNA a partir de RNA de origen humano de DRGs de fetos abortados y de médula espinal de individuos adultos *postmortem*. La amplificación posterior por PCR, se llevó a cabo utilizando cebadores específicos para la isoforma NM_001303256.3 (*hMORC2_iso_2*), para la isoforma NM_014941.3 (*hMORC2_iso_3*) y para ambas isoformas con amplicones de diferentes tamaños (*hMORC2_iso_1*; amplifica la isoforma NM_001303256.3 con un amplicón de 114 pb y la isoforma NM_014941.3 con un amplicón de 1.021 pb). Los resultados obtenidos a partir de tejido nervioso humano se complementaron con la amplificación de estos mismos fragmentos en fibroblastos derivados de pacientes (F-R252W₁, F-R252W₂, F-R252W₃, F-S87L) y de individuos control (F-Control₁, F-Control₂).

M3.6. Estudio del efecto de la variante *MORC2* c.754C>T sobre el procesamiento del mRNA mediante ensayo de minigenes

Para confirmar o descartar un efecto deletéreo de la variante c.754C>T sobre el procesamiento del mRNA del gen *MORC2* (NM_001303256.3), y en particular sobre el exón 9 que alberga dicha mutación, se realizó un ensayo de minigenes *in vitro*. Para ello, se clonó el fragmento genómico conteniendo el exón 9 y parte de los intrones adyacentes en el vector pSPL3. Posteriormente, se generó la mutación c.754C>T mediante mutagénesis dirigida con cebadores específicos (**Anexo 10**). Para el ensayo, se transfectaron 120.000 células HeLa sembradas en pocillos de 9,5 cm² (35 mm de diámetro) con los plásmidos pSPL3, pSPL3-E10_WT y pSPL3-E10_c.754C>T. El RNA se extrajo 24 horas más tarde y se retrotranscribió a cDNA. Seguidamente, se llevó a cabo una amplificación por PCR con cebadores contenidos dentro del vector (SD6-D, SA2-R)

y se analizó el resultado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Para validar los resultados obtenidos, se amplificó el exón 9 de las tres líneas de fibroblastos derivadas de pacientes CMT2Z portadores de la mutación c.754C>T (F-R252W₁, F-R252W₂, F-R252W₃) y en 2 líneas de fibroblastos control (F-Control₁, F-Control₂) utilizando los cebadores hMORC2_e7_D y hMORC2_e11_R (Anexo 10).

M3.7. Ensayo ATPasa de MORC2

Para el ensayo ATPasa a partir de líneas estables de HeLa sobreexpresando GFP, MORC2 WT, MORC2 p.R252W o MORC2 p.S25L, se sembraron 250.000 células en placas de 60,8 cm² (100 mm de diámetro) y se activó la transcripción del cDNA exógeno mediante la adición de doxiciclina (2 µg/mL). Tras cuatro días de incubación con el antibiótico, el fosfato libre hidrolizado presente en 50 µg de cada uno de los extractos nucleares, se cuantificó mediante el sistema colorimétrico del kit “High Throughput Colorimetric ATPase Assays” (Innova Bioscience), tras la adición de 10 mM de ATP por pocillo durante 30 min a 37°C. Se empleó el espectrofotómetro “VICTOR Multilabel Plate Reader” (PerkinElmer) con un filtro de $\lambda_{emisión}$ que cubría un rango de entre 590 y 660 nm (Figura M.2). Asimismo, la confirmación de la sobreexpresión equitativa de MORC2 en los cultivos infectados se realizó mediante WB.

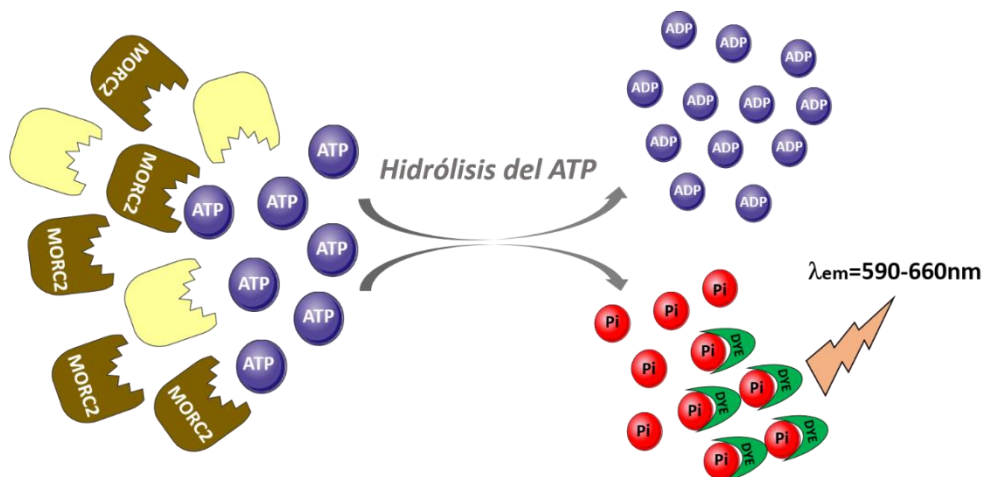


Figura M.2. Esquema de la metodología empleada en el ensayo ATPasa. MORC2: marrón; otras ATPasas intracelulares: amarillo; Pi: fosfato inorgánico; DYE: molécula que reacciona con Pi y emite tras la formación del complejo.

M3.8. Análisis de inflamación axonal causada por mutaciones en MORC2

El número promedio de *axonal swellings* en los cultivos primarios de neuronas sensoriales infectados, se calculó en base a 15 imágenes de cada una de las muestras en tres infecciones lentivirales independientes; el anticuerpo SMI32 se empleó como marcador axonal. Todos los datos se muestran como la media de inflamaciones axonal y la desviación estándar.

M3.9. Análisis estadístico empleado en los ensayos funcionales

Los datos obtenidos en tres experimentos independientes se presentaron con la media y la desviación estándar utilizando el valor obtenido en una de las muestras (generalmente, fibroblastos control o células sin infectar) como la unidad y los datos del resto de muestras fueron normalizados frente a este valor. Para el análisis estadístico de los datos, se empleó una prueba *t-Student* (2 colas, no pareadas) considerando significativos los valores menores a 0,05.

M4. Estudios ómicos

M4.1. Filtrado de resultados derivados de secuenciación de exoma

El estudio incluye cinco familias afectadas de CMT2/NMHD: fCMT_376, fCMT_433, fCMT_436, fCMT_441 y fCMT_443. Se secuenció el exoma de 3/4 individuos por familia en el “Centro Nacional de Análisis Genómico” (CNAG) de Barcelona, con el objetivo de identificar nuevos genes y/o nuevas mutaciones causantes de neuropatías.

Los datos brutos derivados de la secuenciación de exoma se depositaron en el EGA (*European Genome-Phenome Archive*) y se analizaron por el CNAG utilizando su propio *pipeline*. Los datos procesados conteniendo la información fenotípica de los pacientes, se filtraron utilizando todas las posibilidades de herencia empleando la plataforma *RD-Connect* (www.platform.rd-connect.eu/). Asimismo, se seleccionaron aquellos cambios que cumplieran los siguientes requisitos: $MAF < 0,001$ en la base de datos gnomAD y variantes que alteraran la estructura proteica o el *splicing*. El listado de posibles cambios candidatos a ser responsables de la patología fue examinado mediante una revisión bibliográfica exhaustiva y un análisis de patogenicidad *in silico* (**Anexo 13**).

El análisis de segregación y/o la validación de cambios candidatos se llevó a cabo mediante secuenciación *Sanger*, empleando cebadores específicos (**Anexo 10**).

M4.2. Análisis del transcriptoma asociado a la fisiopatología de CMT2Z

La cantidad y la calidad de las muestras de RNA obtenidas a partir de líneas de fibroblastos (F-S87L, F-R252W₁, F-R252W₂, F-R252W₃ y F-Control₁) y, a partir de neuronas sensoriales de rata infectadas (GFP, MORC2, MORC2-S87L y MORC2-R252W) se analizó utilizando “RNA 6000 Nano Bioanalyzer” (Agilent Technologies).

Para llevar a cabo el ensayo transcriptómico, se marcaron las muestras y se hibridaron a *microarrays* de expresión diferencial específicos para humano o rata en el SGGT del CIPF (Valencia). Se utilizaron 200 ng de RNA con valor de integridad del mismo superior a 8,5 (RIN, *RNA integrity number*) para producir RNA complementario (cRNA) marcado empleando el kit “One-Color Low Input Quick Amp Labeling” (Agilent Technologies). Seguidamente, 600 ng de cRNA marcado se hibridaron a chips de expresión génica: “SurePrint G3 Rat Gene Expression v2 8x60K Microarray” (Agilent Technologies) para neuronas de rata y “SurePrint G3 Human Gene Expression v3 8x60K Microarray” (Agilent Technologies) para fibroblastos humanos. Los chips se escanearon utilizando el “Agilent Microarray Scanner” y los datos se extrajeron utilizando el “Agilent Feature Extraction Software 11.5.1.1” siguiendo los protocolos siguientes: GE1_1105_Oct12, “grid templates 072363_D_F_20150612/ 074036_D_F_20150914” y “QC Metric Set GE1_QCMT_Oct12”. Para la normalización de los datos, se empleó un sistema por cuartiles incluido en el *software* de Agilent.

El estudio de la expresión diferencial de los resultados de los ensayos se realizó en la Unidad de Bioinformática y Bioestadística (UBB) del CIPF (Valencia) utilizando un *test moderado* *Limma* (*Bioconductor*) y las correcciones propuestas por Benjamini Hochberg (*False Discovery Rate method*). El análisis de enriquecimiento génico fue llevado a cabo utilizando la herramienta bioinformática “DAVID Bioinformatics Resources”, version 6.7 (<https://david-d.ncifcrf.gov/>). La validación de los resultados de transcriptómica, se realizó mediante RT-PCR utilizando cebadores específicos para cada transcrito (**Anexo 10**).

ANEXOS

Panel de genes Neuro_56 (Lupo et al., *Journal of Molecular Diagnostics*; 2016)

AARS, ATP7A, BICD2, BSCL2, DCTN1, DHTKD1, DNAJB2, DNM2, DYNC1H1, EGR2, FBLN5, FGD4, FIG4, GAN, GARS, GDAP1, GJB1GNB4, HARS, HINT1, HK1, HSPB1, HSPB3, HSPB8, IGHMBP2, KARS, KIF1B, KIF5A, LITAF, LMNA, LRSAM1, MARS, MED25, MFN2, MICAL1, MPZ, MTMR2, NDRG1, NEFL, PDK3, PLEKHG5, PMP22, PRPS1, PRX, RAB7A, SBF1, SBF2, SETX, SH3TC2, SLC12A6, TDP1, TFG, TRIM2, TRPV4, TUBA8, YARS.

Panel de genes Neuro_104

AARS, ALS2, ANG, ARHGEF10, ASAH1, ATP7A, BICD2, BSCL2, C12ORF65, CHCHD10, CHMP2B, COX6A1, DAO, DCAF8, DCTN1, DCTN2, DGAT2, DHTKD1, DNAJB2, DNM2, DNMT1, DYNC1H1, EGR2, ERBB4, FBLN5, FBXO38, FGD4, FIG4, FUS, GAN, GARS, GDAP1, GJB1, GJB3, GLE1, GNB4, HADHB, HARS, HINT1, HNRNPA1, HSPB1, HSPB3, HSPB8, IFRD1, IGHMBP2, INF2, KARS, KIF1A, KIF1B, KLHL9, LITAF, LMNA, LRSAM1, MARS, MATR3, MED25, MFN2, MORC2, MPZ, MTMR2, NAGLU, NDRG1, NEFH, NEFL, OPTN, PDK3, PFN1, PLEKHG5, PMP22, PRPH, PRPS1, PRX, RAB7A, REEP1, SBF1, SBF2, SETX, SH3TC2, SIGMAR1, SLC12A6, SLC25A46, SLC5A7, SOD1, SPG11, SPTLC1, SPTLC2, SQSTM1, SURF1, TAF15, TARDBP, TBK1, TFG, TRIM2, TRPV4, TUBA4A, UBA1, UBQLN2, VAPB, VCP, YARS, AIFM1, AIMP1, PMP2, SPTLC3.

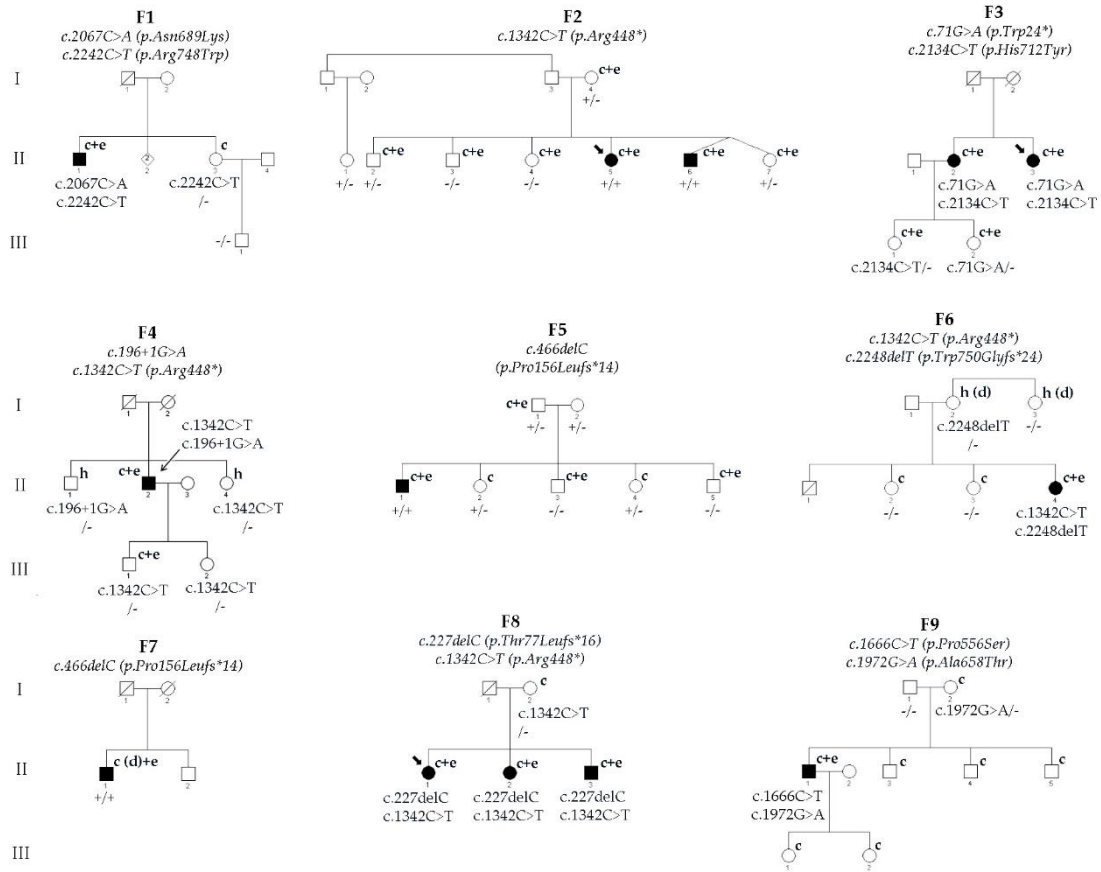
Panel de genes Neuro_111

AARS, AIFM1, AIMP1, ALS2, ANG, ARHGEF10, ASAH1, ATP7A, BICD2, BSCL2, C12ORF65, CHCHD10, CHMP2B, COX6A1, DAO, DCAF8, DCTN1, DCTN2, DGAT2, DHTKD1, DNAJB2, DNM2, DNMT1, DRP2, DYNC1H1, EGR2, ERBB4, FBLN5, FBXO38, FGD4, FIG4, FUS, GAN, GARS, GDAP1, GJB1, GJB3, GLE1, GNB4, GRN, HADHB, HARS, HINT1, HNRNPA1, HSPB1, HSPB3, HSPB8, IFRD1, IGHMBP2, INF2, KARS, KIF1A, KIF1B, KLHL9, LITAF, LMNA, LRSAM1, MARS, MATR3, MED25, MFN2, MME, MORC2, MPZ, MTMR2, NAGLU, NDRG1, NEFH, NEFL, OPTN, PDK3, PFN1, PLEKHG5, PMP2, PMP22, PRPH, PRPS1, PRX, RAB7A, REEP1, SBF1, SBF2, SETX, SH3TC2, SIGMAR1, SLC12A6, SLC25A46, SLC5A7, SOD1, SPG11, SPTLC1, SPTLC2, SPTLC3, SQSTM1, SS18L1, SURF1, TAF15, TARDBP, TBK1, TFG, TRIM2, TRPV4, TUBA4A, TUBB3, UBA1, UBQLN2, VAPB, VCP, VRK1, YARS.

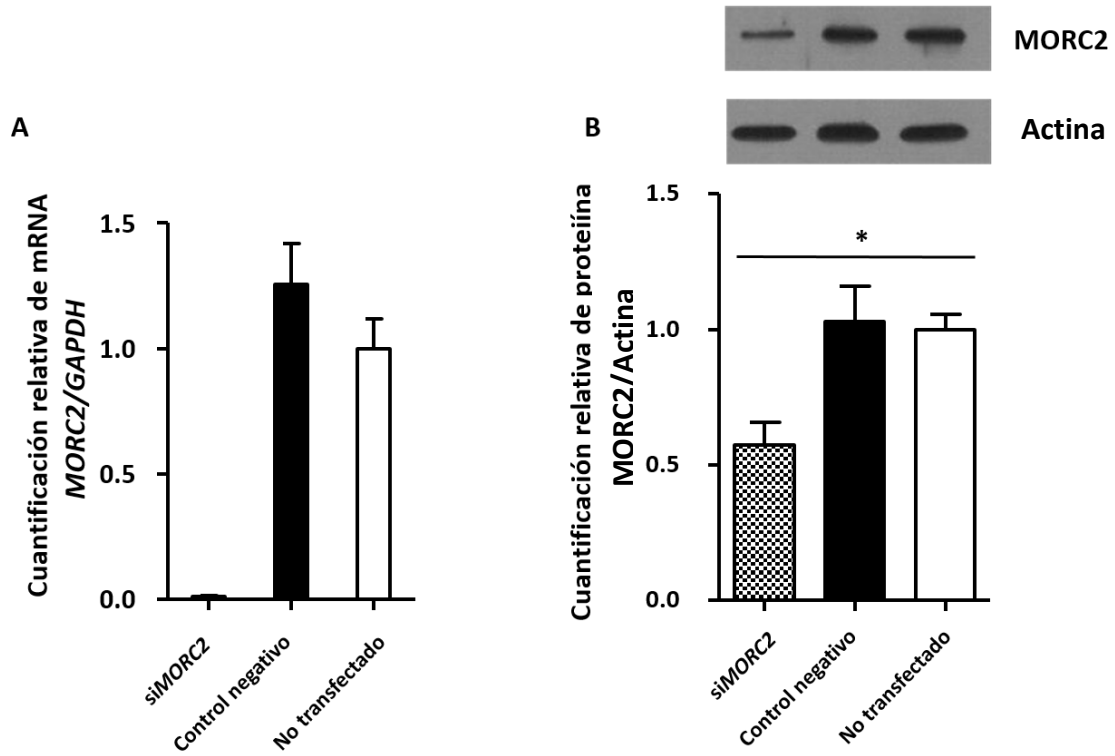
Panel de genes Neuro_120

AARS, AIFM1, AIMP1, ALS2, ANG, ARHGEF10, ARHGEF28, ASAH1, ATP7A, BICD2, BSCL2, C12ORF65, CCNF, CHCHD10, CHMP2B, COX6A1, DAO, DCAF8, DCTN1, DCTN2, DGAT2, DHTKD1, DNAJB2, DNAJC6, DNM2, DNMT1, DRP2, DYNC1H1, EGR2, ERBB4, FBLN5, FBXO38, FGD4, FIG4, FUS, GAN, GARS, GDAP1, GJB1, GJB3, GLE1, GNB4, HADHB, HARS, HINT1, HNRNPA1, HNRNPA2B1, HSPB1, HSPB3, HSPB8, IFRD1, IGHMBP2, INF2, KARS, KIF1A, KIF1B, KIF5A, KLHL9, LAS1L, LITAF, LMNA, LRSAM1, MARS, MATR3, MED25, MFN2, MME, MORC2, MPZ, MTMR2, MYH14, NAGLU, NDRG1, NEFH, NEFL, NEK1, OPTN, PARK7, PDK3, PFN1, PLEKHG5, PMP2, PMP22, PNKP, PRPH, PRPS1, PRX, RAB7A, REEP1, SBF1, SBF2, SETX, SH3TC2, SIGMAR1, SLC12A6, SLC25A46, SLC5A7, SOD1, SPG11, SPTLC1, SPTLC2, SPTLC3, SQSTM1, SS18L1, SURF1, TAF15, TARDBP, TBK1, TFG, TRIM2, TRPV4, TUBA4A, TUBB3, UBA1, UBQLN2, VAPB, VCP, VRK1, YARS.

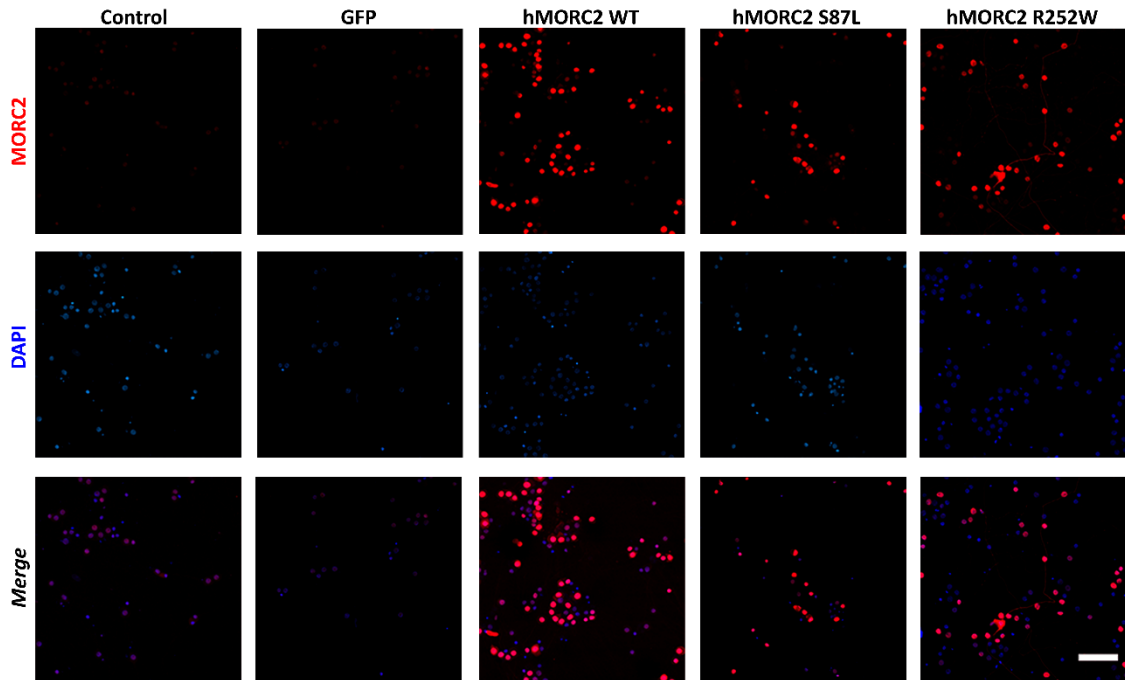
Árboles genealógicos de las familias CMT2T con mutaciones bialélicas en el gen *MME* contenidas en el trabajo de Lupo y colaboradores [*Journal of Medical Genetics*; 2018].



Validación del anticuerpo de MORC2 (Santa Cruz Biotechnology) por silenciamiento transitorio en células HeLa. Silenciamiento transitorio de *MORC2* mediante un si-RNA específico, empleando un control negativo (set de si-RNA sin reconocimiento específico de ninguna secuencia de mamífero) y un control de células sin transfectar. (A) RT-PCR de *MORC2* incluyendo *GAPDH* como control de la cantidad de RNA empleada. (B) WB de MORC2 utilizando actina como control de carga. *p_valor<0,05.



Localización subcelular de MORC2 en cultivo de neuronas sensoriales de rata (10x). Canal rojo: MORC2; canal azul: DAPI. *Merge*: solapamiento entre los dos canales. Barra de escala: 150 μ m.



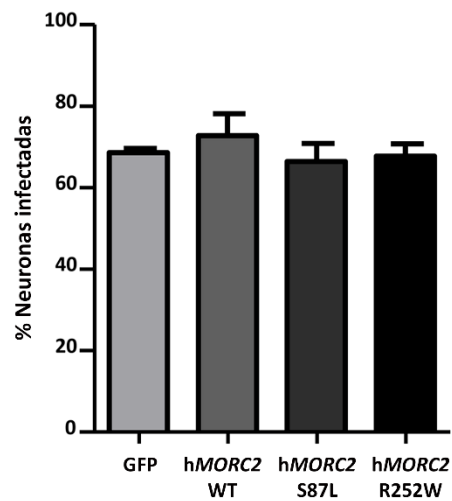
Estudio de integridad del RNA de fibroblastos empleado para transcriptómica

Muestra	Número de integridad del RNA (RIN)
F-Control ₁ (réplica 1)	9,7
F-Control ₁ (réplica 2)	9,8
F-Control ₁ (réplica 3)	10
F-S87L (réplica 1)	8,8
F-S87L (réplica 2)	8,1
F-S87L (réplica 3)	8,2
F-R252W ₁ (réplica 1)	8,1
F-R252W ₁ (réplica 2)	9,6
F-R252W ₁ (réplica 3)	9,9
F-R252W ₂ (réplica 1)	8,1
F-R252W ₂ (réplica 2)	8,2
F-R252W ₂ (réplica 3)	10
F-R252W ₃ (réplica 1)	9,9
F-R252W ₃ (réplica 2)	10
F-R252W ₃ (réplica 3)	9,9

Estudio de integridad del RNA de neuronas sensoriales empleado para transcriptómica

Muestra	Número de integridad del RNA (RIN)
GFP (réplica 1)	10
GFP (réplica 2)	9,5
GFP (réplica 3)	9,9
hMORC2-WT (réplica 1)	10
hMORC2-WT (réplica 2)	9,7
hMORC2-WT (réplica 3)	9,9
hMORC2-S87L (réplica 1)	9,5
hMORC2-S87L (réplica 2)	9,7
hMORC2 S87L (réplica 3)	9,6
hMORC2-R252W (réplica 1)	9,9
hMORC2-R252W (réplica 2)	9,7
hMORC2-R252W (réplica 3)	8,9

Cuantificación de la infección de neuronas sensoriales de rata. En las células infectadas con GFP, se contabilizaron las células GFP-positivas mediante inmunofluorescencia en las tres infecciones realizadas. En el caso de los cultivos infectados con los diferentes constructos de *hMORC2*, se contabilizaron los núcleos MORC2-positivos.



Listado de genes *ZNF* diferencialmente expresados en el transcriptoma de neuronas sensoriales de rata

hMORC2-S87L vs GFP			hMORC2-R252W vs GFP		
Gen	FC log.	p_valor aj.	Gen	FC log.	p_valor aj.
<i>Klf14</i>	1,6150	0,0486	<i>Zfat</i>	1,2919	0,0346
<i>Zfat</i>	1,0689	0,0472	<i>Zscan18</i>	-0,6822	0,0444
<i>Zfp423</i>	0,9207	0,0355	<i>Znf48</i>	-0,7173	0,0385
<i>Zhx3</i>	-0,5101	0,0472	<i>Zfp57</i>	-0,8085	0,0346
<i>Zscan21</i>	-0,6450	0,0472	<i>Zfp110</i>	-0,9749	0,0346
<i>Zfp57</i>	-0,6689	0,0472			
<i>Znf48</i>	-0,7448	0,0413			
<i>Zfp617</i>	-0,7477	0,0178			
<i>LOC680200</i>	-0,7569	0,0472			
<i>Zfp282</i>	-0,7738	0,0355			
<i>Zfp709</i>	-0,9477	0,0472			
<i>Zfp316</i>	-0,9950	0,0472			
<i>Zscan12</i>	-1,3876	0,0352			

Listado de genes homeobox diferencialmente expresados en el transcriptoma de neuronas sensoriales de rata

hMORC2-S87L vs GFP			hMORC2-R252W vs GFP		
Gen	FC log.	p_valor aj.	Gen	FC log.	p_valor aj.
<i>Hoxc6</i>	0,5515	0,0486	<i>Hoxb8</i>	2,1002	0,0465
<i>Gsc</i>	3,9509	0,0005	<i>Gsc</i>	2,8884	0,0098
<i>Hoxb13</i>	5,0077	0,0070	<i>Hoxb13</i>	5,1724	0,0099
<i>Hoxc10</i>	0,5342	0,0422	<i>Hoxc10</i>	0,6504	0,0241

Genes homólogos de rata del panel diagnóstico Neuro_120

Humano	Rata		
		<i>LASIL</i>	<i>Las1l</i>
		<i>LITAF</i>	<i>Litaf</i>
		<i>LMNA</i>	<i>Lmna</i>
		<i>LRSAM1</i>	<i>Lrsam1</i>
		<i>MARS</i>	<i>Mars</i>
		<i>MATR3</i>	<i>Matr3</i>
		<i>MED25</i>	<i>Med25</i>
		<i>MFN2</i>	<i>LOC100911485</i>
		<i>MME</i>	<i>Mme</i>
		<i>MORC2</i>	<i>Morc2</i>
		<i>MPZ</i>	<i>Mpz</i>
		<i>MTMR2</i>	<i>Mtmr2</i>
		<i>MYH14</i>	<i>Myh14</i>
		<i>NAGLU</i>	<i>Naglu</i>
		<i>NDRG1</i>	<i>Ndrg1</i>
		<i>NEFH</i>	<i>Nefh</i>
		<i>NEFL</i>	<i>Nefl</i>
		<i>NEK1</i>	<i>Nek1</i>
		<i>OPTN</i>	<i>Optn</i>
		<i>PARK7</i>	<i>Park7</i>
		<i>PDK3</i>	<i>Pdk3</i>
		<i>PFN1</i>	<i>Pfn1</i>
		<i>PLEKHG5</i>	<i>Plekhg5</i>
		<i>PMP2</i>	<i>Pmp2</i>
		<i>PMP22</i>	<i>Pmp22</i>
		<i>PNKP</i>	<i>Pnkp</i>
		<i>PRPH</i>	<i>Prph</i>
		<i>PRPS1</i>	<i>Prps1</i>
		<i>PRX</i>	<i>Prx</i>
		<i>RAB7A</i>	<i>Rab7a</i>
		<i>REEP1</i>	<i>Reep1</i>
		<i>SBF1</i>	<i>Sbf1</i>
		<i>SBF2</i>	<i>Sbf2</i>
		<i>SETX</i>	<i>Setx</i>
		<i>SH3TC2</i>	<i>Sh3tc2</i>
		<i>SIGMAR1</i>	<i>Sigmar1</i>
		<i>SLC12A6</i>	<i>Slc12a6</i>
		<i>SLC25A46</i>	<i>Slc25a46</i>
		<i>SLC5A7</i>	<i>Slc5a7</i>
		<i>SOD1</i>	<i>Sod1</i>
		<i>SPG11</i>	<i>Spg11</i>
		<i>SPTLC1</i>	<i>Sptlc1</i>
		<i>SPTLC2</i>	<i>Sptlc2</i>
		<i>SPTLC3</i>	<i>Sptlc3</i>
		<i>SQSTM1</i>	<i>Sqstm1</i>
		<i>SS18L1</i>	<i>Ss18l1</i>
		<i>SURF1</i>	<i>Surf4</i>
		<i>TAF15</i>	<i>Taf15</i>
		<i>TBK1</i>	<i>Tbk1</i>
		<i>TFG</i>	<i>Tfg</i>
		<i>TRIM2</i>	<i>Trim2</i>
		<i>TRPV4</i>	<i>Trpv4</i>
		<i>TUBA4A</i>	<i>Tuba4a</i>
		<i>TUBB3</i>	<i>Tubb3</i>
		<i>UBA1</i>	<i>Uba1</i>
		<i>UBQLN2</i>	<i>Ubqln2</i>
		<i>VAPB</i>	<i>Vapb</i>
		<i>VCP</i>	<i>Vcp</i>
		<i>VRK1</i>	<i>Vrk1</i>
		<i>YARS</i>	<i>Yars</i>
<i>AARS</i>	<i>Aars</i>		
<i>AIFM1</i>	<i>Aifm1</i>		
<i>AIMP1</i>	<i>Aimp1</i>		
<i>ALS2</i>	<i>Als2</i>		
<i>ANG</i>	<i>Ang2</i>		
<i>ARHGEF10</i>	<i>Arhgef10</i>		
<i>ARHGEF28</i>	<i>Arhgef28</i>		
<i>ASAH1</i>	<i>Asah1</i>		
<i>ATP7A</i>	<i>Atp7a</i>		
<i>BICD2</i>	<i>Bicd2</i>		
<i>BSCL2</i>	<i>Bscl2</i>		
<i>C12orf65</i>	<i>RGD1563482</i>		
<i>CCNF</i>	<i>Ccnf</i>		
<i>CHCHD10</i>	<i>Chchd10</i>		
<i>CHMP2B</i>	<i>Chmp2b</i>		
<i>COX6A1</i>	<i>Cox6a1</i>		
<i>DAO</i>	<i>Dao</i>		
<i>DCAF8</i>	<i>Dcaf8</i>		
<i>DCTN1</i>	<i>Dctn1</i>		
<i>DCTN2</i>	<i>Dctn2</i>		
<i>DGAT2</i>	<i>Dgat2</i>		
<i>DHTKD1</i>	<i>Dhtkd1</i>		
<i>DNAJB2</i>	<i>Dnajb2</i>		
<i>DNAJC6</i>	<i>Dnajc6</i>		
<i>DNM2</i>	<i>Dnm2</i>		
<i>DNMT1</i>	<i>Dnmt1</i>		
<i>DRP2</i>	<i>Drp2</i>		
<i>DYNC1H1</i>	<i>Dync1h1</i>		
<i>EGR2</i>	<i>Egr2</i>		
<i>ERBB4</i>	<i>Erb4</i>		
<i>FBLN5</i>	<i>Fbln5</i>		
<i>FBXO38</i>	<i>Fbxo38</i>		
<i>FGD4</i>	<i>Fgd4</i>		
<i>FIG4</i>	<i>Fig4</i>		
<i>FUS</i>	<i>Fus</i>		
<i>GAN</i>	<i>Gan</i>		
<i>GARS</i>	<i>Gars</i>		
<i>GDAP1</i>	<i>Gdap1</i>		
<i>GJB1</i>	<i>Gjb1</i>		
<i>GJB3</i>	<i>Gjb3</i>		
<i>GLE1</i>	<i>Gle1</i>		
<i>GNB4</i>	<i>Gnb4</i>		
<i>HADHB</i>	<i>Hadhb</i>		
<i>HARS</i>	<i>Hars</i>		
<i>HINT1</i>	<i>Hint1</i>		
<i>HNRNPA1</i>	<i>Hnrnpa1</i>		
<i>HNRNPA2B1</i>	<i>Hnrnpa2b1</i>		
<i>HSPB1</i>	<i>Hspb1</i>		
<i>HSPB3</i>	<i>Hspb3</i>		
<i>HSPB8</i>	<i>Hspb8</i>		
<i>IFRD1</i>	<i>Ifrd1</i>		
<i>IGHMBP2</i>	<i>Ighmbp2</i>		
<i>INF2</i>	<i>Inf2</i>		
<i>KARS</i>	<i>Kars</i>		
<i>KIF1A</i>	<i>Kif1a</i>		
<i>KIF1B</i>	<i>Kif1b</i>		
<i>KIF5A</i>	<i>Kif5a</i>		
<i>KLHL9</i>	<i>Klhl9</i>		

Soluciones y tampones empleados**A. Cultivo bacteriano**

- Medio completo Luria Bertani (LB): Levadura de triptona 10 g/L (pH 7,2), NaCl 5 g/L y extracto de levadura 5 g/L.

B. Cultivo celular**- Células HeLa/HEK293T:**

- DMEM completo: DMEM suplementado con 5 g/L de D-glucosa, 10% (v/v) de FBS, 1% (v/v) pen/strep y 1% (v/v) de L-glutamina.

-Medio de congelación: 70% (v/v) DMEM completo, 20% (v/v) FBS y 10% (v/v) DMSO.

- Fibroblastos:

- Medio basal: DMEM, 20% (v/v) de FBS, 1% (v/v) pen/strep, 1% (v/v) L-glutamina y 1 mM de piruvato sódico.

- Medio de estrés mitocondrial: Medio basal suplementado con 5% (v/v) de galactosa.

-Medio de congelación: 90% (v/v) FBS y 10% (v/v) DMSO.

-Tampón de unión anexina V: 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂ (pH 7,4).

- Neuronas sensoriales de rata:

- Medio C: DMEM, 10% (v/v) de FCS, 1% (v/v) pen/strep, 200 mM L-glutamina y 50 µg/mL 2,5S NGF.

- Medio neurobasal: NB, 2 g/L D-glucosa, 1% (v/v) B27, 1% (v/v) pen/strep, 1% (v/v) L-glutamina y 50 µg/mL 2,5S NGF.

- Medio neurobasal + FrdU: Medio neurobasal suplementado con 10 µM de fluorodeoxiuridina (FrdU).

C. Extractos proteicos y WB:**- Extractos totales:**

- Tampón RIPA: 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1% (v/v) NP-40, 0,5% (v/v) ácido desoxicolico, 0,1% (v/v) SDS, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA (pH 8), 50 mM NaF y una tableta de un cóctel inhibidor de proteasas (Roche).

- Tampón de lisis neuronal: 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 95 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2% (v/v) sodio dodecilsulfato, 1 mM NaF, 1 mM NaVO₄ y una tableta de un cóctel inhibidor de proteasas (Roche).

ANEXO 9

- Extractos nucleares:

- Solución A: 20 mM HEPES (pH 7,9), 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 300 mM sacarosa, una tableta de un cóctel inhibidor de proteasas y una tableta de un cóctel inhibidor de fosfatasas.

- Solución B: Solución A suplementada con 0,25% (v/v) de NP-40.

- Solución C: 20 mM HEPES (pH 7,9), 1,5 mM MgCl₂, 420 mM KCl, 0,2 mM EDTA (pH 8), 0,5 mM DTT, 25% glicerol, una tableta de un cóctel inhibidor de proteasas y una tableta de un cóctel inhibidor de fosfatasas.

- Solución D: Solución C sin KCl.

- WB:

- Tampón de carga de proteínas: Tris-HCl 45 mM (pH 6,8), glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,01% (v/v), SDS 1% (v/v), DTT 50 mM.

- Tampón de separación de proteínas: Glicina 0,192 M, Tris 25 mM y 0,1% (v/v) de SDS.

- Tampón de transferencia de proteínas: Glicina 0,192 M, Tris 25 mM y 20% (v/v) de metanol.

- TBST: 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween-20, pH 7,4.

- Solución de bloqueo de membranas de WB: 5% (v/v) NFM (*Not fat milk*, leche desnatada en polvo) en TBST.

D. Inmunofluorescencia de biopsia de piel:

- Solución de conservación: BSA 1% (v/v), NGS 4% (v/v), TX-100 0,4% (v/v), y azida sódica 0,02% (v/v) en PBS.

- Solución de bloqueo: BSA 1% (v/v) y NGS 4%(v/v) en PBS.

- Solución de lavado: 1% BSA (v/v) en PBS.

Cebadores empleados en subclonaciones

Nombre	Secuencia (5'→3')	Experimento
<i>XhoI_MORC2_e9_pSPL3_D</i>	GGAACCTCGAGAACATGGAAAGGTGGAGAGC	Subclonación exón 9 <i>MORC2</i>
<i>NheI_MORC2_e9_pSPL3_R</i>	GCGCGCTAGCGAGCCTCTTATACAGCATCC	Subclonación exón 9 <i>MORC2</i>
SD6_D	TCTGAGTCACCTGGACAACC	Secuenciación vector
SA2_R	GCTCACAAATACCACTGAGAT	Secuenciación vector
pCMV_D	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	Secuenciación vector
<i>Knpl_MME_pCMV_HA_D</i>	GAGGTACCATGGGCAAGTCAGAAAGT	Subclonación <i>MME</i>
<i>Knpl_MME_pCMV_HA_R</i>	TAGGTACCTCACCAAACCCGGCAC	Subclonación <i>MME</i>
<i>MME_Lectura1_D</i>	TAGCTGTGACAATGATCGCA	Secuenciación <i>MME</i>
<i>MME_Lectura2_D</i>	AGAGGCTTGTACAGCATATG	Secuenciación <i>MME</i>
<i>MME_Lectura_D</i>	ACATGTGGTCGAGGATTGA	Secuenciación <i>MME</i>
M13_R	CAGGAAACAGCTATGAC	Secuenciación vector
<i>MORC2_Lectura1_D</i>	ACTCATGGATAATGGAGAGC	Secuenciación <i>MORC2</i>
<i>MORC2_Lectura1_R</i>	GGAGAGCCAGAACTAGACATAA	Secuenciación <i>MORC2</i>
<i>MORC2_Lectura2_D</i>	TGTTGGGGTTGTTGATGTGC	Secuenciación <i>MORC2</i>
<i>MORC2_Lectura3_D</i>	TTGCCAACTCCTAGACCAGC	Secuenciación <i>MORC2</i>
<i>MORC2_Lectura4_D</i>	AAAGGCAGTGAGGATGTGCG	Secuenciación <i>MORC2</i>

ANEXO 10

Cebadores empleados en mutagénesis dirigida

Nombre	Secuencia (5'→3')
<i>MME_R448*_D</i>	CGAGGATTTGATTGCACAGATCTGAGAAGTTTTTATTTCAGACTTT
<i>MME_R448*_R</i>	AAAGTCTGAATAAAAACTTCTCAGATCTGTGCAATCAAATCCTCG
<i>MME_P556S_D</i>	AATCAGATAGTCTTCTCAGCCGGCATTCTGC
<i>MME_P556S_R</i>	GCAGAATGCCGGCTGAGAAGACTATCTGATT
<i>MME_N689K_D</i>	AACAACATTTTTCTTGAAATTTGCACAGGTGTGGTGTG
<i>MME_N689K_R</i>	CACACCACACCTGTGCAAATTTCAAGAAAAATAGTTGTT
<i>MME_H712Y_D</i>	CTCCATTA AAAACAGATGTGTACAGTCCAGGCAATTTCA
<i>MME_H712Y_R</i>	TGAAATTGCCTGGACTGTACACATCTGTTTTAATGGAG
<i>MME_R748W_D</i>	AATCCAGAAAAGAAGTGCTGGGTTTGGTGAGGTACCGCG
<i>MME_R748W_R</i>	CGCGGTACCTCACCAAACCCAGCACTTCTTTTCTGGATT
<i>MORC2_S87L_D</i>	GGTGTTTCGCTTGGCCAACCTCCCAAACCTGGA
<i>MORC2_S87L_R</i>	TCCAGTTTGGGAAGTTGGCCAAGCGAACACC
<i>MORC2_R252W_D</i>	CGCTGTGCTCTATATTGATCCCTGGATGAGGATCTTCATCCATG
<i>MORC2_R252W_R</i>	CATGGATGAAGATCCTCATCCAGGGATCAATATAGAGCACAGCG

Cebadores empleados en PCR y RT-PCR

Genes y transcritos humanos (h):

Nombre	Secuencia (5'→3')	Experimento
hACTIN_D	CACCTTCTACAATGAGCTGCG	RT-PCR
hACTIN_R	AGCACAGCCTGGATAGCAACG	RT-PCR
hADAM7_D	ATTCTTCCAGCACATCCTGAG	Validación exoma fCMT_433
hADAM7_R	TTGTCCCTGTGTGCTACCC	Validación exoma fCMT_433
hAIFM1_D	AGAGTGAGACAGAGTCCGAGG	RT-PCR
hAIFM1_R	AAGATGTTCCATAGCACAAT	RT-PCR
hBAX_D	GGACCCTGGGCCTTCTGGAGC	RT-PCR
hBAX_R	GTCAAGGTCACAGTGAGGTC	RT-PCR
hC18ORF63_D	GAGAAGCAGGGTGAGCTG	Validación exoma fCMT_441
hC18ORF63_R	CTCAAAACTCAGCTCATATCAA	Validación exoma fCMT_441
hC6ORF165_D	CCCAGGGACATAGAGAGT	Validación exoma fCMT_441
hC6ORF165_R	TCCTCAAAGTTGATTGCC	Validación exoma fCMT_441
hCADM4_D	G TTCAGTGCAATGGAATGAA	Validación exoma fCMT_433
hCADM4_R	CTTGAGGACCCAGCATTATTC	Validación exoma fCMT_433
hDEPDC5_D	TATTGGGTTCCATGTGGCTT	Validación exoma fCMT_433
hDEPDC5_R	CCTACTGCACTGGCAAAGAA	Validación exoma fCMT_433
hDGKD_D	TTCTAGGAAGTCTGGGTGAAA	Validación exoma fCMT_433
hDGKD_R	GCACCCTTCTGT CATCTCC	Validación exoma fCMT_433
hDIS3L_D	CTTAAGCGTTGTTGATGATA	Validación exoma fCMT_376
hDIS3L_R	CTGATGAGGGAAGCTCTC	Validación exoma fCMT_376

ANEXO 10

hDNAHI_D	AACTTGGAGGTGTGTGGGA	Validación exoma fCMT_433
hDNAHI_R	CCAAGCCCCACCTACAGAA	Validación exoma fCMT_433
hDPYD_D	TCTTTAATTCCTGTATGTGAGG	Validación exoma fCMT_433
hDPYD_R	CTGGGATTATAGGCATTAGG	Validación exoma fCMT_433
hDUSP1_D	GAAGGGTGTGGTCCACTGC	Validación exoma fCMT_376
hDUSP1_R	CCTCTCAAGGAGCATGGAG	Validación exoma fCMT_376
hDVL3_D	AGCAGTCAGCACAGCGAA	Validación exoma fCMT_441
hDVL3_R	AAGAACTCACTGGGGTTTCC	Validación exoma fCMT_441
hELF2_D	TCAATGTCATTGGTTACTTCA	Validación exoma fCMT_433
hELF2_R	TACCAGGACTTCTTGAATCC	Validación exoma fCMT_433
hFHL1_D	ATGCAAGCTCTTGAGGCAT	Validación exoma fCMT_443
hFHL1_R	CCAGAGATCACAACTTAATCC	Validación exoma fCMT_443
hFRS3_D	CATTGCACTCCAGCCTG	Validación exoma fCMT_441
hFRS3_R	AACCAGCCAGCTTAACTAGTC	Validación exoma fCMT_441
hGAPDH_D	CCAGGTGGTCTCCTCTGACTTC	RT-PCR
hGAPDH_R	CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA	RT-PCR
hHNMT_D	TAAACGAATGGATGGCACTC	Validación exoma fCMT_433
hHNMT_R	CTGGGGAATGGATGAAGTGT	Validación exoma fCMT_433
hHSD17B6_D	TGAAAGAGAAGGAAGCACC	Validación exoma fCMT_376
hHSD17B6_R	CACTGAGTAGCTGCAGCG	Validación exoma fCMT_376
hKANK1_D	AATGAAATCAGGAAAGCTGG	Validación exoma fCMT_433
hKANK1_R	TATTCTGGCCTACCTTCC	Validación exoma fCMT_433
hKCNA1_D	CCTGAGGAACGAGTACTTCT	Validación exoma fCMT_436

ANEXO 10

hKCNA1_R	TGGAATTGTAGATGACCGT	Validación exoma fCMT_436
hKIF22_D	AGAAAGGAAACTGATCCCCA	Validación exoma fCMT_433
hKIF22_R	GAGGTGTTGATGGCTCCAC	Validación exoma fCMT_433
hLSGI_D	TGAGACAAAGGAGGAAAAGTA	Validación exoma fCMT_433
hLSGI_R	GGCTTGAAAAATGCTGAAG	Validación exoma fCMT_433
hMAPK10_D	GGGATTTACCTGATGTTTGG	Validación exoma fCMT_433
hMAPK10_R	AGAGGGGCAGATAATAGGCT	Validación exoma fCMT_433
hMORC2_1_D	AGCAGTCTGAATCGAGCTCA	PCR isoformas
hMORC2_1_R	AGGTCTCTCGTCTTTCTGC	PCR isoformas
hMORC2_2_D	CCAGTTAGCGGGTGAAGGG	PCR isoformas
hMORC2_2_R	AGTGGTTGAATTTGTGTGCAGA	PCR isoformas
hMORC2_3_D	GCTGTCCAGTAGCGTCAAAA	PCR isoformas
hMORC2_3_R	CACCCGGCCTAGAAATTCTT	PCR isoformas
hMORC2_4_D	AGCAGTCTGAATCGAGCTCA	RT-PCR
hMORC2_4_R	AGGTCTCTCGTCTTTCTGC	RT-PCR
hMORC2_5_D	TCCTTCTCCCAAAGTCAT	RT-PCR
hMORC2_5_R	TCAGCCGAGTCCTCTTC	RT-PCR
hMORC2_cDNA_e11_R	TCCACCTAGGCGTACTTCTA	PCR minigenes
hMORC2_cDNA_e7_D	ACTGAGGAGGAAGTGATGAC	PCR minigenes
hMORC2_e10_D	GGAGATGGCTTCAGGGAAAG	PCR <i>MORC2</i> , exón 10
hMORC2_e10_R	GAGCCTCTTATACAGCATCC	PCR <i>MORC2</i> , exón 10
hMORC2_e11_D	CTTCCTGTGCTGGGTGTGC	PCR <i>MORC2</i> , exón 11
hMORC2_e11_R	AGCCTTGTCCTGAGTTGTGG	PCR <i>MORC2</i> , exón 11

ANEXO 10

hMORC2_e5_D	AAGCTTCACATTGATCTGCC	PCR <i>MORC2</i> , exón 5
hMORC2_e5_R	TTCTAGACATAACATTGGAGG	PCR <i>MORC2</i> , exón 5
hMORC2_e6_D	GTTTTTCAGCAGATACACACC	PCR <i>MORC2</i> , exón 6
hMORC2_e6_R	TTCTGACTTCTTCCAGTTCC	PCR <i>MORC2</i> , exón 6
hMORC2_e7_D	TGGCACTTTCAATCATGTCC	PCR <i>MORC2</i> , exón 7
hMORC2_e7_R	GTGCTCCAATCCTGCAACC	PCR <i>MORC2</i> , exón 7
hMORC2_e8-9_D	AGAGATGCACATTTGGGAGG	PCR <i>MORC2</i> , exones 8 y 9
hMORC2_e8-9_R	CACAAACGCCAGTTCCAGG	PCR <i>MORC2</i> , exones 8 y 9
hMSH6_D	GAATGCTTTTAGACGTGGATG	Validación exoma fCMT_433
hMSH6_R	AGCCTTGCTGCATTAAAGC	Validación exoma fCMT_433
hMYO3A_D	GTGTTGCCTGTAATTTACCA	Validación exoma fCMT_441
hMYO3A_R	GGCTGAGCATTATGAGG	Validación exoma fCMT_441
hNXPE4_D	ATCCAAGATGCTACGTAACAC	Validación exoma fCMT_433
hNXPE4_R	AGAAGATGCTGAATGGCTT	Validación exoma fCMT_433
hP16_D	GCTCGGAGTTAATAGCACCT	RT-PCR
hP16_R	AGCCCCTCCTCTTTCTTCCTC	RT-PCR
hP21_D	GCCTGGACTGTTTTCTCTCG	RT-PCR
hP21_R	ATTCAGCATTGTGGGAGGAG	RT-PCR
hPEBP4_D	AGTCCTGCTGTCTGCTTCAC	Validación exoma fCMT_376
hPEBP4_R	GGCTTTGATAGCTGAGCACT	Validación exoma fCMT_376
hPRR14_D	GATCCGAGTGAATTCTAGCC	Validación exoma fCMT_376
hPRR14_R	CGAGGGAACAGGAAGATTA	Validación exoma fCMT_376
hRBSM3_D	ATGCTAGTCTTGGCAGTAAGC	Validación exoma fCMT_441

ANEXO 10

hRBSM3_R	TGATGTTGATTCAGAGCTCA	Validación exoma fCMT_441
hSCAPER_D	TAGTAGGCATGCAAGTAAAA	Validación exoma fCMT_433
hSCAPER_R	GAACAAGTCACTTAACTCTCAC	Validación exoma fCMT_433
hSIRT1_D	AGAGGCAGTTGGAAGATGGC	Validación exoma fCMT_443
hSIRT1_R	AAGAGCGAATCCACTGGC	Validación exoma fCMT_443
hSLC24A3_D	TCCCAGATGGAAGTTGTCT	Validación exoma fCMT_433
hSLC24A3_R	CAGAGTTGGTTAAAGAGCTCA	Validación exoma fCMT_433
hSLC2A5_D	TTGAGAGAGTTCTGGCCC	Validación exoma fCMT_436
hSLC2A5_R	AGTCCTGTCCTGTGGTGG	Validación exoma fCMT_436
hSMC1B_D	GCCAGACAGGAGTATGTTGT	Validación exoma fCMT_433
hSMC1B_R	GTGGCTCAGAGTACTTCACA	Validación exoma fCMT_433
hSPAG4_D	GGAGGATGGCGTTTAACTC	Validación exoma fCMT_433
hSPAG4_R	AGATGAGCAAGCGAAGACTC	Validación exoma fCMT_433
hSYDE1_D	CGACCACATCCCAGCTATG	Validación exoma fCMT_376
hSYDE1_R	GCCTAAGACACTGATTGGTCC	Validación exoma fCMT_376
hTDAG51_D	TGAAGACCGTGGACTGTGT	Validación exoma fCMT_376
hTDAG51_R	GGTGTGGGTGCGGTATTT	Validación exoma fCMT_376
hTNNT3_D	GCAATGTGGAGAAGGCAA	Validación exoma fCMT_433
hTNNT3_R	CTTCTCTGCACGAATCCTCT	Validación exoma fCMT_433
hZNF709_D	AGTCAGTTTGGAGAAACCAT	Validación exoma fCMT_433
hZNF709_R	GGTTTCTCTCCAGAGTGAGT	Validación exoma fCMT_433

ANEXO 10

Genes y transcritos de ratón (m) y de rata (r):

Nombre	Secuencia (5'→3')	Experimento
mMorc2a	Taqman Mm01181705_m1	RT-PCR
mMorc2b	Taqman Mm01353374_g1	RT-PCR
mUbe2l3	Taqman Mm00784559_s1	RT-PCR
rGabra1_D	TGCCCAATAAACTCCTGCGT	RT-PCR
rGabra1_R	TGGGCATCCATGGGAAAGTC	RT-PCR
rGabra5_D	GCAACGTCTCCCTCTCAACA	RT-PCR
rGabra5_R	AGCTTGTTGGGTGTCGTCAT	RT-PCR
rGabbr1_D	GCTCCAATGAACCCAGCAAC	RT-PCR
rGabbr1_R	CCGCAAGCGAATGTCATATCC	RT-PCR
rGrik3_D	TCCGGAGTCTGGTTTGGGAA	RT-PCR
rGrik3_R	GCGTACTCAAAGATTCCGCC	RT-PCR
rHspb1_D	TTCACCCGGAAATACACGCT	RT-PCR
rHspb1_R	GCTCCAGACTGTTCCGACTC	RT-PCR
rKif11_D	GGCAGCCAAAAGGACAACCTG	RT-PCR
rKif11_R	CAGCTCCAGAACGCCCAATA	RT-PCR
rKif18b_D	CTGCCCAGCCACAGTCATTA	RT-PCR
rKif18b_R	CTGGGTTTGGAGGGGGATTC	RT-PCR
rKifc1_D	GGCCCCTTTGATGGAAGTGA	RT-PCR
rKifc1_R	CCATGCCTCGTGTTTCGTTTC	RT-PCR
rMorc2_1_D	AACAGTCCATGGCATCCTCA	RT-PCR
rMorc2_1_R	CCGCTTGCATCTCTTTTCC	RT-PCR
rUbi_D	AGTGCGGAAAACCTGGAAGCC	RT-PCR
rUbi_R	GGACTGGATTACTTGGTCAGTCTTG	RT-PCR

Construcciones plasmídicas generadas

Construcción	Origen	Experimento
pCMV_HA	Clontech	Sobreexpresión NEP
pCMV_HA_MME	Subclonación de MME en sitios <i>KpnI</i>	Sobreexpresión NEP
pCMV_HA_MME_R448*	Mutagénesis dirigida pCMV_HA_MME	Sobreexpresión NEP
pCMV_HA_MME_P556S	Mutagénesis dirigida pCMV_HA_MME	Sobreexpresión NEP
pCMV_HA_MME_N689K	Mutagénesis dirigida pCMV_HA_MME	Sobreexpresión NEP
pCMV_HA_MME_H712Y	Mutagénesis dirigida pCMV_HA_MME	Sobreexpresión NEP
pCMV_HA_MME_R748W	Mutagénesis dirigida pCMV_HA_MME	Sobreexpresión NEP
pcDNA3.1	Dr. Roman Chrast	Sobreexpresión MORC2
pcDNA3.1_MORC2	Subclonación de <i>MORC2</i> en sitios <i>KpnI-XhoI</i>	Sobreexpresión MORC2
pcDNA3.1_MORC2_S87L	Mutagénesis dirigida pcDNA3.1_MORC2	Sobreexpresión MORC2
pcDNA3.1_MORC2_R252W	Mutagénesis dirigida pcDNA3.1_MORC2	Sobreexpresión MORC2
pSPL3	Dr. José M. Millán	Ensayo minigenes <i>MORC2</i>
pSPL3-MORC2_e19_WT	Fragmento génico <i>MORC2</i> sitios <i>XhoI-NheI</i>	Ensayo minigenes <i>MORC2</i>
pSPL3-MORC2_e19_c.754C>T	Mutagénesis dirigida pSPL3-MORC2_e10_WT	Ensayo minigenes <i>MORC2</i>
pENTRY_MORC2	Subclonación de <i>MORC2</i> en sitios <i>KpnI-XhoI</i>	Transferencia de <i>MORC2</i> pcDNA3.1/pSlik-Hygro
pENTRY_MORC2_S87L	Subclonación de <i>MORC2</i> en sitios <i>KpnI-XhoI</i>	Transferencia de <i>MORC2</i> pcDNA3.1/pSlik-Hygro
pENTRY_MORC2_R252W	Subclonación de <i>MORC2</i> en sitios <i>KpnI-XhoI</i>	Transferencia de <i>MORC2</i> pcDNA3.1/pSlik-Hygro
PLP1	Dr. Roman Chrast	Generación de lentivirus
PLP2	Dr. Roman Chrast	Generación de lentivirus
PLP/VSVG	Dr. Roman Chrast	Generación de lentivirus
pSlik-Hygro	Dr. Roman Chrast	Sobreexpresión MORC2
pSlik-Hygro_GFP	Dr. Roman Chrast	Sobreexpresión MORC2

ANEXO 11

pSlik-Hygro_MORC2_WT	Recombinación desde pENTRY_MORC2	Sobreexpresión MORC2
pSlik-Hygro_MORC2_S87L	Recombinación desde pENTRY_MORC2_S87L	Sobreexpresión MORC2
pSlik-Hygro_MORC2_R252W	Recombinación desde pENTRY_MORC2_R252W	Sobreexpresión MORC2

NEP: neprilisina.

Anticuerpos empleados en inmunofluorescencia

A. Anticuerpos primarios:

Anticuerpo	Origen	Casa comercial	Diana	Dilución
Anti-Actina	Monoclonal de conejo	Sigma	Actina	1:500
Anti-AIF	Monoclonal de conejo	Abcam	AIF	1:500
Anti-EEA1	Policlonal de conejo	Abcam	Endosomas tempranos	1:100
Anti-GRP94	Policlonal de conejo	Abcam	Retículo endoplásmico	1:250
Anti-HA	Monoclonal de ratón	Sigma	HA	1:500
Anti-HA	Monoclonal de conejo	Sigma	HA	1:500
Anti-MBP	Policlonal de conejo	Abcam	Proteína básica de la mielina (MBP)	1:1000
Anti-MORC2	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology	MORC2	1:250
Anti-M6PR	Monoclonal de ratón	Abcam	Endosomas tardíos y trans-Golgi	1:500
Anti-SMI32	Monoclonal de conejo	Millipore	Neurofilamento pesado no fosforilado	1:500
Anti-Tom20	Monoclonal De ratón	Millipore	Mitocondria	1:250

ANEXO 12

B. Anticuerpos secundarios:

Anticuerpo	Origen	Casa comercial	Fluorocromo conjugado	Diana	Dilución
Alexa Fluor® 488 rabbit	Policlonal de cabra	Abcam	488	IgG de conejo	1:250
Alexa Fluor® 633 rabbit	Policlonal de cabra	Abcam	633	IgG de conejo	1:250
Alexa Fluor® 488 mouse	Policlonal De cabra	Abcam	488	IgG de ratón	1:250
Alexa Fluor® 633 mouse	Policlonal de cabra	Abcam	633	IgG de ratón	1:250
Alexa Fluor® 594 rabbit	Policlonal de cabra	Abcam	594	IgG de conejo	1:250

IgG: inmunoglobulina G.

Anticuerpos empleados en WB

A. Anticuerpos primarios:

Anticuerpo	Origen	Casa comercial	Diana	Dilución
Anti-Actina	Monoclonal de conejo	Sigma	Actina	1:2000
Anti-AIF	Monoclonal de conejo	Abcam	AIF	1:1000
Anti-HA	Policlonal de conejo	Sigma	HA	1:1000
Anti-MORC2	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology	MORC2	1:250
Anti-α-Tubulina	Monoclonal de ratón	Sigma	α -Tubulina	1:2000

B. Anticuerpos secundarios:

Anticuerpo	Origen	Casa comercial	Molécula conjugada	Diana	Dilución
Anti-rabbit- HRP	Policlonal de cabra	Abcam	HRP	IgG de conejo	1:10.000
Anti-mouse- HRP	Policlonal de cabra	Abcam	HRP	IgG de ratón	1:10.000

IgG: inmunoglobulina G; HRP: *horseradish peroxidase*.

Recursos informáticos empleados en el filtrado de resultados de secuenciación de exoma

- **National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>):** Centro nacional para la información biotecnológica de EEUU. Compila y actualiza una gran cantidad de bases de datos con recursos de gran utilidad en el ámbito científico.
- **PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>):** Hemeroteca digital desarrollada por el NCBI, que enlaza a más de 29 millones de citas derivadas de libros, artículos y revisiones científicas.
- **Human Gene Mutation Database (HGMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.ph>):** Base de datos de mutaciones de genes humanos asociadas a enfermedades hereditarias construida en base a publicaciones científicas y generada por el “Institute of Medical Genetics” (Cardiff University, Reino Unido)
- **Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, <https://www.omim.org>):** Base de datos incluida en el NCBI que recoge información actualizada (recogida en la literatura) en relación a mutaciones identificadas en más de 5.000 genes humanos asociados a todas las enfermedades mendelianas conocidas. La base de datos está desarrollada por el “McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine” (Johns Hopkins University School of Medicine, EEUU).
- **Neuromuscular Disease Center (<https://neuromuscular.wustl.edu/>):** Base de datos creada en la “Washington University” (EEUU), que compila información genética y clínica de todos los trastornos neuromusculares conocidos.
- **Ensembl (<http://www.ensembl.org/>):** Base de datos que incluye toda la información genómica de vertebrados y de algunos invertebrados, de gran utilidad en genómica comparativa, evolución, variación de secuencia y regulación transcripcional. Desarrollada, mantenida y actualizada por el “Wellcome Trust Sanger Institute” y el “European Bioinformatics Institute” (Reino Unido).
- **ExAC Browser Beta (<http://exac.broadinstitute.org/>) y gnomAD Browser (<https://gnomad.broadinstitute.org/>):** Bases de datos de secuenciación de exoma derivados de una amplia variedad de proyectos de secuenciación a gran escala generados por múltiples grupos de investigación. Estas bases de datos son generadas y mantenidas por el “Broad Institute” (Massachusetts Institute of Technology-MIT, EUA).
- **ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>):** Base de datos incluida en el NCBI, que recoge información sobre fenotipos clínicos asociados a variaciones alélicas humanas.

- **dbSNP** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>): Base de datos de polimorfismos de nucleótidos simples del NCBI. Registra tanto variantes pequeñas que comprenden sustituciones, deleciones e inserciones de nucleótidos simples, como reordenamientos mayores que incluyen inserción de elementos transponibles o variación del número de repeticiones cortas en tándem.
- **GeneCards** (<https://www.genecards.org/>): Base de datos que integra información génica, genómica, transcriptómica, proteómica, clínica y funcional sobre todos los genes humanos anotados y predichos. Generada y mantenida por el “*Weizmann Institute of Science*” (Israel).
- **UniProt** (<http://www.uniprot.org/>): Repositorio de datos derivados de proteína: estructura, función, modificaciones post-traduccionales y rutas implicadas. Desarrollado por un consorcio europeo formado por diferentes centros de investigación y fundaciones, entre ellas; Swiss-Prot, TrEMBL y PIRt.

Para predecir el impacto patológico en la proteína de una mutación que provoque un cambio de aminoácido, se emplearon diversas herramientas *online* que utilizan algoritmos basados en aspectos físicos y en la conservación de regiones de DNA de genes ortólogos y parálogos. Las herramientas utilizadas se listan a continuación:

- Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>).
- PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).
- PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/>).
- SIFT (<http://sift.jcvi.org/>).

Del mismo modo, para evaluar el impacto de cambios identificados en el *splicing*, se utilizaron diferentes herramientas que predicen posibles alteraciones en la ubicación de sitios de corte y empalme de exones debido a mutaciones puntuales. Para ello, utilizan redes neuronales artificiales vinculándolas a un posible escenario de mecanismo de *splicing in vivo* para evitar falsos positivos.

Los programas que se han empleado son:

- Netgene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>).
- HSF-Human (<http://www.umd.be/HSF3/>).
- NNSplice (<https://omictools.com/nnssplice-tool>).
- Spliceview (<http://bioinfo.itb.cnr.it/oriel/splice-view.html>).

APÉNDICE

A continuación se incluyen las publicaciones de los trabajos comprendidos en el marco de la Tesis Doctoral:

- “Characterization of molecular mechanisms underlying the axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathy caused by MORC2 mutations”. Sancho P, Bartesaghi L, Miossec O, García-García F, Ramírez-Jiménez L, Åkesson E, Hedlund E, Laššuthová P, Pascual-Pascual S, Sevilla T, Kennerson M, Lupo V, Chrast R, Espinós E. Human Molecular Genetics, 05/2019; 28(10): 1629-1644.

doi: 10.1093/hmg/ddz006.C.

- “A newly distal hereditary motor neuropathy caused by a rare AIFM1 mutation”. Sancho P, Sánchez-Monteaudo A, Collado A, Marco-Marín C, Domínguez-González C, Camacho A, Knecht E, Espinós C, Lupo V. Neurogenetics, 10/2017; 18(4): 245-250.

doi: 10.1007/s10048-017-0524-6.

- “Mutations in MORC2 gene cause axonal Charcot-Marie-Tooth disease”. Sevilla T, Lupo V, Martínez-Rubio D, Sancho P, Sivera R, Chumillas MJ, García-Romero M, Pascual-Pascual SI, Muelas N, Dopazo J, Vílchez JJ, Palau F, Espinós C. Brain, 01/2016; 139(1): 62-72.

doi: 10.1093/brain/awv311.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelmohsen K, Pullmann R, Lal A, Kim HH, Galban S, Yang X, et al. Phosphorylation of HuR by Chk2 Regulates SIRT1 Expression. *Mol Cell* 2007; 25: 543–557.
- Ahmad S, Wang Y, Shaik GM, Burghes AH, Gangwani L. The zinc finger protein ZPR1 is a potential modifier of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 2745–2758.
- Albulym OM, Kennerson ML, Harms MB, Drew AP, Siddell AH, Auer-Grumbach M, et al. MORC2 mutations cause axonal Charcot-Marie-Tooth disease with pyramidal signs. *Ann Neurol* 2016; 79: 419–427.
- Ando M, Okamoto Y, Yoshimura A, Yuan JH, Hiramatsu Y, Higuchi Y, et al. Clinical and mutational spectrum of Charcot–Marie–Tooth disease type 2Z caused by MORC2 variants in Japan. *Eur J Neurol* 2017; 24: 1274–1282.
- Arthur-Farraj PJ, Latouche M, Wilton DK, Quintes S, Chabrol E, Banerjee A, et al. c-Jun reprograms schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. *Neuron* 2012; 75: 633–647.
- Auer-Grumbach M, Toegel S, Schabhüttl M, Weinmann D, Chiari C, Bennett DLH, et al. Rare variants in MME, encoding metalloprotease neprilysin, are linked to late-onset autosomal-dominant axonal polyneuropathies. *Am J Hum Genet* 2016; 99: 607–623.
- Azzedine H, Senderek J, Rivolta C, Chrast R. Molecular genetics of Charcot-Marie-Tooth disease: From genes to genomes. *Mol Syndromol* 2012; 3: 204–214.
- Bähring R, Vardanyan V, Pongs O. Differential modulation of Kv1 channel-mediated currents by co-expression of Kvβ3 subunit in a mammalian cell-line. *Mol Membr Biol* 2004; 21: 19–25.
- Bakkar N, Kovalik T, Lorenzini I, Spangler S, Lacoste A, Sponaugle K, et al. Artificial intelligence in neurodegenerative disease research : use of IBM Watson to identify additional RNA - binding proteins altered in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 2018; 135: 227–247.
- Bansagi B, Griffin H, Whittaker RG, Greenslade M, Forester N, Duff J, et al. Genetic heterogeneity of motor neuropathies. *Neurology* 2017; 88: 1226–1234.
- Barohn RJ, Amato AA. Pattern-recognition approach to neuropathy and neuronopathy. *Neurol Clin* 2013; 31: 343–361.
- Beirowski B, Adalbert R, Wagner D, Grumme DS, Addicks K, Ribchester RR, et al. The progressive nature of Wallerian degeneration in wild-type and slow Wallerian degeneration (WldS) nerves. *BMC Neurosci* 2005; 6: 1–27.
- Berciano J, García A, Gallardo E, Peeters K, Pelayo-Negro AL, Álvarez-Paradelo S, et al. Intermediate Charcot–Marie–Tooth disease: an electrophysiological reappraisal and systematic review. *J Neurol* 2017; 264: 1655–1677.

- Berger I, Ben-Neriah Z, Dor-Wolman T, Shaag A, Saada A, Zenvirt S, et al. Early prenatal ventriculomegaly due to an AIFM1 mutation identified by linkage analysis and whole exome sequencing. *Mol Genet Metab* 2011; 104: 517–520.
- Bermúdez-Guzmán L, Leal A. DNA repair deficiency in neuropathogenesis: when all roads lead to mitochondria. *Transl Neurodegener* 2019; 8: 1–14.
- Biederer T. Bioinformatic characterization of the SynCAM family of immunoglobulin-like domain-containing adhesion molecules. *Genomics* 2006; 87: 139–150.
- Bis-Brewer DM, Züchner S. Perspectives on the genomics of HSP beyond mendelian inheritance. *Front Neurol* 2018; 9: 958.
- Brandt T, Strupp M. Episodic ataxia type 1 and 2 (familial periodic ataxia/vertigo). *Audiol Neuro-Otology* 1997; 2: 373–383.
- Bucci C, Bakke O, Progida C. Charcot-Marie-Tooth disease and intracellular traffic. *Prog Neurobiol* 2012; 99: 191–225.
- Buser AM, Schmid D, Kern F, Erne B, Lazzati T, Schaeren-Wiemers N. The myelin protein MAL affects peripheral nerve myelination: A new player influencing p75 neurotrophin receptor expression. *Eur J Neurosci* 2009; 12: 2276–2290.
- Cande C. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell Sci* 2002; 115: 4727–4734.
- Carroll SL, Worley SH. Wallerian Degeneration. Reference module in neuroscience and biobehavioral psychology. Elsevier; 2017; 161–162.
- Carvill GL, Weckhuysen S, McMahon JM, Hartmann C, Møller RS, Hjalgrim H, et al. GABRA1 and STXB1: Novel genetic causes of Dravet syndrome. *Neurology* 2014; 82: 1245–1253.
- Cassandri M, Smirnov A, Novelli F, Pitolli C, Agostini M, Malewicz M, et al. Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discov* 2017; 3: 17071.
- Chen R, Shi L, Hakenberg J, Naughton B, Sklar P, Zhang J, et al. Analysis of 589,306 genomes identifies individuals resilient to severe Mendelian childhood diseases. *Nat Biotechnol* 2016; 34: 531–538.
- Chong JX, Buckingham KJ, Jhangiani SN, Boehm C, Sobreira N, Smith JD, et al. The genetic basis of mendelian phenotypes: discoveries, challenges, and opportunities. *Am J Hum Genet* 2015; 97: 199–215.
- Cogli L, Progida C, Thomas CL, Spencer-Dene B, Donno C, Schiavo G, et al. Charcot-Marie-Tooth type 2B disease-causing RAB7A mutant proteins show altered interaction with the neuronal intermediate filament peripherin. *Acta Neuropathol* 2013; 125: 257–272.

Coleman M. Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 11: 889–898.

Comu S, Giuliani M, Narayanm V. Episodic ataxia and myokymia syndrome: a new mutation of potassium channel gene Kv1.1. *Ann Neurol.* 1996; 40: 684–687.

Cooper DN, Chen JM, Ball E V., Howells K, Mort M, Phillips AD, et al. Genes, mutations, and human inherited disease at the dawn of the age of personalized genomics. *Hum Mutat* 2010; 31: 631–655.

Cottenie E, Kochanski A, Jordanova A, Bansagi B, Zimon M, Horga A, et al. Truncating and missense mutations in IGHMBP2 cause Charcot-Marie Tooth disease type 2. *Am J Hum Genet* 2014; 95: 590–601.

Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ, Gilbert W. Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* 1978; 274: 775–780.

Cournia Z, Allen TW, Andricioaei I, Antony B, Baum D, Buchete N, et al. Membrane protein structure, function, and dynamics: a perspective from experiments and theory. *J Membr Biol* 2015; 248: 611–640.

Cowchock FS, Duckett SW, Streletz LJ, Graziani LJ, Jackson LG. X-linked motor-sensory neuropathy type II with deafness and mental retardation: A new disorder. *Am J Med Genet* 1985; 20: 307–315.

Craig Venter J, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304–1351.

Cuesta A, Pedrola L, Sevilla T, García-Planells J, Chumillas MJ, Mayordomo F, et al. The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet* 2002; 30: 22–25.

Delavallée L, Cabon L, Galán-Malo P, Lorenzo HK, Susin SA. AIF-mediated caspase-independent necroptosis: A new chance for targeted therapeutics. *IUBMB Life* 2011; 63: 221–232.

Depondt C, Donatello S, Rai M, Wang FC, Manto M, Simonis N, et al. MME mutation in dominant spinocerebellar ataxia with neuropathy (SCA43). *Neurol Genet* 2016; 2: 1–6.

Dierick I, Baets J, Irobi J, Jacobs A, De Vriendt E, Deconinck T, et al. Relative contribution of mutations in genes for autosomal dominant distal hereditary motor neuropathies: A genotype-phenotype correlation study. *Brain* 2008; 131: 1217–1227.

Ding Q, Zhang L, Wang B, Zeng Z. Aberrant high expression level of MORC2 is a common character in multiple cancers. *Hum Pathol.* 2018; 76: 58-67.

Diodato D, Tasca G, Verrigni D, D’Amico A, Rizza T, Tozzi G, et al. A novel AIFM1 mutation expands the phenotype to an infantile motor neuron disease. *Eur J Hum Genet* 2016; 24: 463–6.

Donmez G, Outeiro TF. SIRT1 and SIRT2: Emerging targets in neurodegeneration. *EMBO Mol Med* 2013; 5: 344–352.

- Douse CH, Bloor S, Liu Y, Shamin M, Tchasovnikarova IA, Timms RT, et al. Neuropathic MORC2 mutations perturb GHKL ATPase dimerization dynamics and epigenetic silencing by multiple structural mechanisms. *Nat Commun.* 2018;9: 651–668.
- Dutta R, Inouye M. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 24–28.
- Dyck P, Lambert EH. Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy: II. neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in various neuronal degenerations. *Arch Neurol* 1968; 18: 619–625.
- Eldomery MK, Coban-Akdemir Z, Harel T, Rosenfeld JA, Gambin T, Stray-Pedersen A, et al. Lessons learned from additional research analyses of unsolved clinical exome cases. *Genome Med* 2017; 9: 1–15.
- Eshed Y, Feinberg K, Poliak S, Sabanay H, Sarig-Nadir O, Spiegel I, et al. Gliomedin mediates Schwann cell-axon interaction and the molecular assembly of the nodes of Ranvier. *Neuron* 2005; 47: 215–229.
- Evgrafov O V., Mersyanova I, Irobi J, Van Den Bosch L V., Dierick I, Leung CL, et al. Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal CMT disease and distal hereditary motor neuropathy. *Nat Genet* 2004; 36: 602–606.
- Fabiani B, Delmer A, Lepage E, Guettier C, Petrella T, Brire J, et al. CD10 expression in diffuse large B-cell lymphomas does not influence survival. *Virchows Arch* 2004; 445: 545–551.
- Fabrizi GM, Cavallaro T, Angiari C, Cabrini I, Taioli F, Malerba G, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 2E, a disorder of the cytoskeleton. *Brain* 2007;130: 394–403.
- Fontana X, Hristova M, Da Costa C, Patodia S, Thei L, Makwana M, et al. C-Jun in Schwann cells promotes axonal regeneration and motoneuron survival via paracrine signaling. *J Cell Biol* 2012; 198: 127–141.
- Fontanini A, Chies R, Snapp EL, Ferrarini M, Fabrizio GM, Brancolini C. Glycan-independent role of calnexin in the intracellular retention of Charcot-Marie-Tooth 1IA Gas3/PMP22 mutants. *J Biol Chem* 2005; 280: 2378–2387.
- Fortun J, Li J, Go J, Fenstermaker A, Fletcher BS, Notterpek L. Impaired proteasome activity and accumulation of ubiquitinated substrates in a hereditary neuropathy model. *J Neurochem* 2005; 92: 1531–1541.
- Frasquet M, Mas F, Vázquez-Costa JF, Espinós C, Lupo V et al. A new mutation in MORC2 causes scapuloperoneal Charcot-Marie-Tooth neuropathy: Davidenkow syndrome. *Journal of Neuromuscular Diseases* 2018; 5: 258–259.

Frasquet M, Chumillas MJ, Vílchez, Márquez-Infante C, Palau F, Vázquez-Costa JF, et al. Phenotype and natural history of inherited neuropathies caused by HSN1 c.352+1G>A mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016; 87: 1265–1268.

Garg N, Park SB, Vucic S, Yiannikas C, Spies J, Howells J, et al. Differentiating lower motor neuron syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2017; 88: 474–483.

Gentil BJ, Cooper L. Molecular basis of axonal dysfunction and traffic impairments in CMT. *Brain Res Bull* 2012; 88: 444–453.

Ghezzi D, Sevrioukova I, Invernizzi F, Lamperti C, Mora M, D’Adamo P, et al. Severe X-linked mitochondrial encephalomyopathy associated with a mutation in apoptosis-inducing factor. *Am J Hum Genet* 2010; 86: 639–649.

Gibson TJ, Postma JPM, Brown RS, Argos P. A model for the tertiary structure of the 28 residue dna-binding motif (‘zinc finger’) common to many eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Protein Eng Des Sel* 1988; 2: 209–218.

Glatt K, Glatt H, Lalonde M. Structure and organization of GABRB3 and GABRA5. *Genomics* 1997; 41: 63–69.

Golan N, Kartvelishvily E, Spiegel I, Salomon D, Sabanay H, Rechav K, et al. Genetic Deletion of *Cadm4* Results in Myelin Abnormalities Resembling Charcot-Marie-Tooth Neuropathy. *J Neurosci* 2013; 33: 10950–10961.

Goldstein LS. Kinesin molecular motors: Transport pathways, receptors, and human disease. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 6999–7003.

Gomes I, Aumüller G, Wennemuth G, Bette M, Albrecht M. Independent signals determine the subcellular localization of NEP in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310: 919–926.

Gueneau L, Bertrand AT, Jais JP, Salih MA, Stojkovic T, Wehnert M, et al. Mutations of the *FHL1* Gene Cause Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy. *Am J Hum Genet* 2009; 85: 338–353.

Gurbuxani S, Schmitt E, Cande C, Parcellier A, Hammann A, et al. Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene* 2003; 22: 6669–6678.

Hafezparast M, Klocke R, Ruhrberg C, Marquardt A, Ahmad-Annuar A, Bowen S, et al. Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* 2003; 300: 808–812.

Harel T, Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth disease and pathways to molecular based therapies. *Clin Genet* 2014; 86: 422–431.

Heffernan C, Jain MR, Liu T, Kim H, Barretto K, Li H, et al. Nectin-like 4 complexes with choline transporter-like protein-1 and regulates schwann cell choline homeostasis and lipid biogenesis in vitro. *J Biol Chem* 2017; 292: 4484–4498.

- Helmken C, Hofmann Y, Schoenen F, Oprea G, Raschke H, Rudnik-Schöneborn S, et al. Evidence for a modifying pathway in SMA discordant families: Reduced SMN level decreases the amount of its interacting partners and Htra2-beta1. *Hum Genet* 2003; 114: 11–21.
- Hersh LB, Morihara K. Comparison of the subsite specificity of the mammalian neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) to the bacterial neutral endopeptidase thermolysin. *J Biol Chem* 1986; 261: 6433–6437.
- Higuchi Y, Hashiguchi A, Yuan J, Yoshimura A, Mitsui J, Ishiura H, et al. Mutations in MME cause an autosomal-recessive Charcot-Marie-Tooth disease type 2. *Ann Neurol* 2016; 79: 659–672.
- Hoogendijk JE, Hensels GW, Janssen EAM, Valentijn LJ, Baas F, de Visser M, et al. De-novo mutation in hereditary motor and sensory neuropathy type I. *Lancet* 1992; 339: 1081–1082.
- Houlden H, Laura M, Wavrant-De Vrièze F, Blake J, Wood N, Reilly MM. Mutations in the HSP27 (HSPB1) gene cause dominant, recessive, and sporadic distal HMN/CMT type 2. *Neurology* 2008; 71: 1660–1668.
- Howell S, Nalbantoglu J, Crine P. Neutral endopeptidase can hydrolyze β -amyloid(1-40) but shows no effect on β -amyloid precursor protein metabolism. *Peptides* 1995; 16: 647–652.
- Hryciw T, MacDonald JIS, Phillips R, Seah C, Pasternak S, Meakin SO. The fibroblast growth factor receptor substrate 3 adapter is a developmentally regulated microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiated neurons. *J Neurochem* 2010; 112: 924–939.
- Hu B, Wang M, Castoro R, Simmons M, Dortch R, Yawn R, et al. A novel missense mutation in AIFM1 results in axonal polyneuropathy and misassembly of OXPHOS complexes. *Eur J Neurol* 2017; 24: 1499–1506.
- Hurd DD, Saxton WM. Kinesin mutations cause motor neuron disease phenotypes by disrupting fast axonal transport in drosophila. *Genetics* 1996; 144: 1075–85.
- Hurst RL, Hobson-Webb LD. Therapeutic implications of Peripheral Nerve Hyperexcitability in muscle cramping: A retrospective review. *J Clin Neurophysiol* 2016; 33: 560–563.
- Hyun YS, Hong Y Bin, Choi BO, Chung KW. Clinico-genetics in Korean Charcot-Marie-Tooth disease type 2Z with MORC2 mutations. *Brain* 2016;139: e40.
- Imbrici P, Altamura C, Gualandi F, Mangiatordi GF, Neri M, De Maria G, et al. A novel KCNA1 mutation in a patient with paroxysmal ataxia, myokymia, painful contractures and metabolic dysfunctions. *Mol Cell Neurosci* 2017; 83: 6–12.
- Imbrici P, Gualandi F, Adamo MCD, Masieri MT, Cudia P, Grandis D De, et al. A novel KCNA1 mutation identified in an italian family affected by episodic ataxia type 1. *NSC* 2008; 157: 577–587.

Inoue N, Hess KD, Moreadith RW, Richardson LL, Handel MA, Watson ML, et al. New gene family defined by MORC, a nuclear protein required for mouse spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1201–1207.

Irobi J, Van Impe K, Seeman P, Jordanova A, Dierick I, Verpoorten N, et al. Hot-spot residue in small heat-shock protein 22 causes distal motor neuropathy. *Nat Genet* 2004; 36: 597–601.

Iwata N, Higuchi M, Saido TC. Metabolism of amyloid- β peptide and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther* 2005; 108: 129–148.

Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E, et al. Identification of the major A β 1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: Suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med* 2000; 6: 143–150.

Iyer LM, Abhiman S, Aravind L. MutL homologs in restriction-modification systems and the origin of eukaryotic MORC ATPases. *Biol Direct* 2008; 9: 1–9.

Jing Y, Sun H, Yuan W, Wang Y, Li Q, Liu Y, et al. SUVH2 and SUVH9 Couple Two Essential Steps for Transcriptional Gene Silencing in Arabidopsis. *Mol Plant* 2016; 9: 1156–1167.

Kadmas JL, Beckerle MC. The LIM domain: From the cytoskeleton to the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 920–931.

Karalok ZS, Megaro A, Cenciarini M, Guven A, Hasan SM, et al. Identification of a new de novo mutation underlying regressive episodic ataxia type I. *Front Neurol* 2018; 9: 1–5.

Kerr MA, Kenny AJ. The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem J* 2015; 137: 477–488.

Kettwig M, Schubach M, Zimmermann FA, Klinge L, Mayr JA, Biskup S, et al. From ventriculomegaly to severe muscular atrophy: Expansion of the clinical spectrum related to mutations in AIFM1. *Mitochondrion* 2015; 21: 12–18.

Ben Khelifa M, Coutton C, Zouari R, Karaouzène T, Rendu J, Bidart M, et al. Mutations in DNAH1, which encodes an inner arm heavy chain dynein, lead to male infertility from multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Am J Hum Genet* 2014; 94: 95–104.

Kiepusa A, Kochański J. Charcot-Marie-Tooth type 1A drug therapies: role of adenylyl cyclase activity and G-protein coupled receptors in disease pathomechanism. *Acta Neurobiol Exp* 2018; 78: 198–209.

Kijima K, Numakura C, Goto T, Takahashi T, Otagiri T, Umetsu K, et al. Small heat shock protein 27 mutation in a Japanese patient with distal hereditary motor neuropathy. *J Hum Genet* 2005; 50: 473–476.

Kinter J, Lazzati T, Schmid D, Zeis T, Erne B, Lützel Schwab R, et al. An essential role of MAG in mediating axon–myelin attachment in Charcot–Marie–Tooth 1A disease. *Neurobiol Dis* 2013; 49: 221–231.

- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860–921.
- Laššuthová P, Šafka Brožková D, Krutová M, Mazanec R, Züchner S, Gonzalez MA, et al. Severe axonal Charcot-Marie-Tooth disease with proximal weakness caused by de novo mutation in the MORC2 gene. *Brain* 2016; 139: e26.
- Laššuthová P, Šafka Brožková D, Krutová M, Neupauerová J, Haberlová J, Mazanec R, et al. Improving diagnosis of inherited peripheral neuropathies through gene panel analysis. *Orphanet J Rare Dis* 2016; 11: 118.
- Lee H, Wang H, Jen JC, Sabatti C, Baloh RW, Nelson SF, et al. A novel mutation in KCNA1 causes episodic ataxia without myokymia. *Hum Mutat* 2004; 24: 1–7.
- Lee SM, Chin L-S, Li L. Protein misfolding and clearance in demyelinating peripheral neuropathies. *Commun Integr Biol* 2012; 5: 107–110.
- Lee SM, Olzmann JA, Chin L-S, Li L. Mutations associated with Charcot-Marie-Tooth disease cause SIMPLE protein mislocalization and degradation by the proteasome and aggresome-autophagy pathways. *J Cell Sci* 2011; 124: 3319–3331.
- Lee SMY, Tsui SKW, Chan KK, Garcia-Barcelo M, Waye MMY, Fung KP, et al. Chromosomal mapping, tissue distribution and cDNA sequence of Four-and-a-half LIM domain protein 1 (FHL1). *Gene* 1998; 216: 163–170.
- Li DQ, Nair SS, Ohshiro K, Kumar A, Nair VS, Pakala SB, et al. MORC2 signaling integrates phosphorylation-dependent, ATPase-coupled chromatin remodeling during the DNA damage response. *Cell Rep* 2012; 2: 1657–1669.
- Li J, Bai Y, Ianakova E, Grandis M, Uchwat F, Trostinskaia A, et al. Major myelin protein gene (P0) mutation causes a novel form of axonal degeneration. *J Comp Neurol* 2006; 498: 252–265.
- Liao X, Zhang Y, Dong W, Shao Z, et al. Chromatin remodeling protein MORC2 promotes breast cancer invasion and metastasis through a PRD domain-mediated interaction with CTNND1. *Oncotarget* 2017; 8: 97941–97954.
- Liggins AP, Christopher DO, Lawrie CH, Philip J, Collins GP, Chris S, et al. MORC4, a novel member of the MORC family, is highly expressed in a subset of diffuse large B-cell lymphomas. *Br J Haematol* 2007; 138: 479–486.
- Liu J, Shao Y, He Y, Ning K, Cui X, Liu F, et al. MORC2 promotes development of an aggressive colorectal cancer phenotype through inhibition of NDRG1. *Cancer Sci* 2019; 110: 135–146.
- Liu L, Zhang R. Intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurosci Bull* 2014; 30: 999–1009.

- Liu M, Sun X, Shi S. MORC2 enhances tumor growth by promoting angiogenesis and tumor-associated macrophage recruitment via Wnt/ β -catenin in lung cancer. *Cell Physiol Biochem* 2018; 51: 1679–1694.
- Lupo V, Frassetto M, Sánchez-Monteagudo A, Pelayo-Negro AL, García-Sobrinho T, Sedano MJ, et al. Characterising the phenotype and mode of inheritance of patients with inherited peripheral neuropathies carrying MME mutations. *J Med Genet.* 2018; 55: 814-823.
- Lupo V, García-García F, Sancho P, Tello C, García-Romero M, Villarreal L, et al. Assessment of Targeted Next-Generation Sequencing as a Tool for the Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth Disease and Hereditary Motor Neuropathy. *J Mol Diagnostics* 2016; 18: 225–234.
- Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, et al. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 1991; 66: 219–232.
- Mackay JP, Kowalski K, Fox AH, Czolij R, King GF, Crossley M, et al. Involvement of the N-finger in the self-association of GATA-1. *J Biol Chem* 1998; 273: 30560–30567.
- Maher B. Personal genomes: The case of the missing heritability. *Nature* 2008; 456: 18–21.
- Marangoni M, Adalbert R, Janeckova L, Patrick J, Kohli J, Coleman MP, et al. Age-related axonal swellings precede other neuropathological hallmarks in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Aging* 2014; 35: 2382-2393.
- Maroilley T, Tarailo-Graovac M. Uncovering Missing Heritability in Rare Diseases. *Genes* 2019; 10: 275.
- Martin M, Iyadurai SJ, Gassman A, Gindhart JG, Hays TS, Saxton WM. Cytoplasmic Dynein, the Dynactin Complex, and Kinesin Are Interdependent and Essential for Fast Axonal Transport. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 3717–3728.
- Martins IL, Nunes J, Charneira C, Morello J, Pereira SA, Telo JP, et al. The first-line antiepileptic drug carbamazepine: Reaction with biologically relevant free radicals. *Free Radic Biol Med* 2018; 129: 559–568.
- Maurel P, Einheber S, Galinska J, Thaker P, Lam I, Rubin MB, et al. Nectin-like proteins mediate axon-Schwann cell interactions along the internode and are essential for myelination. *J Cell Biol* 2007; 178: 861–874.
- Mavilio F, Simeone A, Giampaolo A, Faiella A, Zappavigna V, Acampora D, et al. Differential and stage-related expression in embryonic tissues of a new human homoeobox gene. *Nature* 1986; 324: 664–668.
- Meienberg J, Bruggmann R, Oexle K, Matyas G. Clinical sequencing: is WGS the better WES? *Hum Genet* 2016; 135: 359–362.

- Meyer K, Buettner S, Ghezzi D, Zeviani M, Bano D, Nicotera P. Loss of apoptosis-inducing factor critically affects MIA40 function. *Cell Death Dis* 2015; 6: 1814–1821.
- Mierzewska H, Rydzanicz M, Biegański T, Kosinska J, Mierzewska-Schmidt M, Lugowska A, et al. Spondyloepimetaphyseal dysplasia with neurodegeneration associated with AIFM1 mutation - a novel phenotype of the mitochondrial disease. *Clin Genet* 2016; 91: 1–8.
- Mimura Y, Takahashi K, Kawata K, Akazawa T, Inoue N. Two-step colocalization of MORC3 with PML nuclear bodies. *J Cell Sci* 2014; 123: 2014–2024.
- Min S, Sohn PD, Cho S, Swanson RA, Gan L. Sirtuins in neurodegenerative diseases : an update on potential mechanisms. *Front Aging Neurosci* 2013; 5: 1–9.
- Mittal R, Patel K, Mittal J, Chan B, Yan D, Grati M, et al. Association of PRPS1 Mutations with Disease Phenotypes . *Dis Markers* 2015; 2015: 1–7.
- Mogha A, D’Rozario M, Monk KR. G Protein-Coupled Receptors in Myelinating Glia. *Trends Pharmacol Sci* 2016; 37: 977–987.
- Moss S, Subramanian V, Acharya KR. High resolution crystal structure of substrate-free human neprilysin. *J Struct Biol* 2018; 204: 19–25.
- Murayama A, Ohmori K, Fujimura A, Minami H, Yasuzawa-Tanaka K, Kuroda T, et al. Epigenetic Control of rDNA Loci in Response to Intracellular Energy Status. *Cell* 2008; 133: 627–639.
- Murphy SM, Laura M, Fawcett K, Pandraud A, Liu Y-T, Davidson GL, et al. Charcot–Marie–Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83: 706–710.
- Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, Dent KM, et al. Exome sequencing identifies the cause of a Mendelian disorder HHS Public Access Author manuscript. *Nat Genet* 2010; 42: 30–35.
- Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Abigail W, Lee C, et al. Targeted Capture and Massively Parallel Sequencing of twelve human exomes. *Nature* 2010; 461: 272–276.
- Oefner C, Roques BP, Fournie-Zaluski MC, Dale GE. Structural analysis of neprilysin with various specific and potent inhibitors. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 2004; 60: 392–396.
- Ovsepian S V, Leberre M, Steuber V, Leary VBO, Leibold C, Dolly JO. Pharmacology and therapeutics distinctive role of KV1.1 subunit in the biology and functions of low threshold K + channels with implications for neurological disease. *Pharmacol Ther* 2016; 37: 1–9.
- Pan Z, Ding Q, Guo Q, Guo Y, Wu L. MORC2 , a novel oncogene , is upregulated in liver cancer and contributes to proliferation , metastasis and chemoresistance. *Int J Oncol* 2018; 53: 59–72.
- Pareyson D, Marchesi C. Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease. *Lancet Neurol* 2009; 8: 654–667.

- Pareyson D, Saveri P, Pisciotta C. New developments in Charcot-Marie-Tooth neuropathy and related diseases. *Curr Opin Neurol* 2017; 30: 471–480.
- Pareyson D, Saveri P, Sagnelli A, Piscosquito G. Mitochondrial dynamics and inherited peripheral nerve diseases. *Neurosci Lett* 2015; 596: 66–77.
- Pastor WA, Stroud H, Nee K, Liu W, Pezic D, Manakov S, et al. MORC1 represses transposable elements in the mouse male germline. *Nat Commun* 2014; 5: 5795–5801.
- Patzkó Á, Shy ME. Update on Charcot-Marie-Tooth Disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2011; 11: 78–88.
- Perry J. The CW domain, a structural module shared amongst vertebrates, vertebrate-infecting parasites and higher plants. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 576–580.
- Poesen K, De Schaepdryver M, Stubendorff B, Gille B, Muckova P, Wendler S, et al. Neurofilament markers for ALS correlate with extent of upper and lower motor neuron disease. *Neurology* 2017; 88: 2302–2309.
- Ponomareva OY, Eliceiri KW, Halloran MC. Charcot-Marie-Tooth 2b associated Rab7 mutations cause axon growth and guidance defects during vertebrate sensory neuron development. *Neural Dev* 2016; 11: 1–14.
- Ramadori G, Lee CE, Bookout AL, Lee S, Williams KW, Anderson J, et al. Brain SIRT1: anatomical distribution and regulation by energy availability. *J Neurosci* 2008; 28: 9989–9996.
- Ravanidis S, Kattan F-G, Doxakis E. Unraveling the pathways to neuronal homeostasis and disease: Mechanistic insights into the role of RNA-binding proteins and associated factors. *Int J Mol Sci* 2018; 19: 2280.
- Retterer K, Juusola J, Cho MT, Vitazka P, Millan F, Gibellini F, et al. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. *Genet Med* 2016; 18: 696–704.
- Rinaldi C, Grunseich C, Sevrioukova IF, Schindler A, Horkayne-Szakaly I, Lamperti C, et al. Cowchock syndrome is associated with a mutation in apoptosis-inducing factor. *Am J Hum Genet* 2012; 91: 1095–1102.
- Ritchie RJ, Mattei MG, Lalande M. A large polymorphic repeat in the pericentromeric region of human chromosome 15q contains three partial gene duplications. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1253–60.
- Rossor AM, Kalmar B, Greensmith L, Reilly MM. The distal hereditary motor neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83: 6–14.
- Rossor AM, Polke JM, Houlden H, Reilly MM. Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Rev Neurol* 2013; 9: 562–571.

Sahli S, Stump B, Welti T, Schweizer WB, Diederich F, Blum-Kaelin D, et al. A new class of inhibitors for the metalloprotease neprilysin based on a central imidazole scaffold. *Helv Chim Acta* 2005; 88: 707–730.

Sajic M, Mastrolia V, Lee CY, Trigo D, Sadeghian M, Mosley AJ, et al. Impulse conduction increases mitochondrial transport in adult mammalian peripheral nerves in vivo. *PLoS Biol* 2013; 11: e1001754.

Sakisaka T, Takai Y. Biology and pathology of nectins and nectin-like molecules. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 513–521.

Salminen A, Ojala J, Huuskonen J, Kauppinen A, Suuronen T, Kaarniranta K. Interaction of aging-associated signaling cascades: Inhibition of NF- κ B signaling by longevity factors FoxOs and SIRT1. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 1049–1058.

Sánchez-Solana B, Li D-Q, Kumar R. Cytosolic functions of MORC2 in lipogenesis and adipogenesis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2014; 1843: 316–326.

Sanchez S, Masuda H, Ruffié G, De Gannes FP, Billaudel B, Haro E, et al. Effect of GSM-900 and -1800 signals on the skin of hairless rats. III: Expression of heat shock proteins. *Int J Radiat Biol* 2008; 84: 61–68.

Sancho P, Bartesaghi L, Miossec O, García-García F, Ramírez-Jiménez L, Siddell A, et al. Characterization of molecular mechanisms underlying the axonal Charcot–Marie–Tooth neuropathy caused by MORC2 mutations. *Hum Mol Genet* 2019; 0: 1–16.

De Sandre-Giovannoli A, Chaouch M, Kozlov S, Vallat J-M, Tazir M, Kassouri N, et al. Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 726–36.

Saporta ASD, Sottile SL, Miller LJ, Feely SME, Siskind CE, Shy ME. Charcot-marie-tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol* 2011; 69: 22–33.

Sato K, Tanabe C, Yonemura Y, Watahiki H, Zhao Y, Yagishita S, et al. Localization of mature neprilysin in lipid rafts. *J Neurosci Res* 2012; 90: 870–877.

Scheithauer BW, Forno LS, Dorfman LJ, Kane CA. Neuroaxonal dystrophy (Seitelberger's disease) with late onset, protracted course and myoclonic epilepsy. *J Neurol Sci* 1978; 36: 247–258.

Schmidt M, Brandwein C, Luoni A, Sandrini P, Calzoni T, Deuschle M, et al. Morc1 knockout evokes a depression-like phenotype in mice. *Behav Brain Res* 2016; 296: 7–14.

Schottmann G, Wagner C, Seifert F, Stenzel W, Schuelke M. MORC2 mutation causes severe spinal muscular atrophy-phenotype, cerebellar atrophy, and diaphragmatic paralysis. *Brain* 2016; 139: e70.

Semplicini C, Ollagnon-Roman E, Leonard-Louis S, Piguet-Lacroix G, Silvestre M, Latour P, et al. High intra-familial clinical variability in MORC2 mutated CMT2 patients. *Brain* 2017; 140: e21.

- Sevilla T, Lupo V, Martínez-Rubio D, Sancho P, Sivera R, Chumillas MÍJ, et al. Mutations in the MORC2 gene cause axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain* 2016; 139: 62–72.
- Sevrioukova IF. Structure/function relations in AIFM1 variants associated with neurodegenerative disorders. *J Mol Biol* 2016; 428: 3650–3665.
- Shao Y, Li Y, Zhang J, Liu D, Liu F, Zhao Y, et al. Involvement of histone deacetylation in MORC2-mediated down-regulation of carbonic anhydrase IX. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 2813–2824.
- Shemesh OA, Erez H, Ginzburg I. Tau-induced traffic jams reflect organelles accumulation at points of microtubule polar mismatching. *Traffic* 2008; 9: 458–471.
- Sheng Z-H, Cai Q. Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13: 77–93.
- Shin J-H, Ko HS, Kang H, Lee Y, Lee Y-I, Pletinkova O, et al. PARIS (ZNF746) Repression of PGC-1 α contributes to neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Cell* 2011; 144: 689–702.
- Sivera R, Sevilla T, Vílchez JJ, Martínez-Rubio D, Chumillas MJ, Vázquez JF, et al. Charcot-Marie-Tooth disease: Genetic and clinical spectrum in a spanish clinical series. *Neurology* 2013; 81: 1617–1625.
- Sivley RM, Dou X, Meiler J, Bush WS, Capra JA. Comprehensive analysis of constraint on the spatial distribution of missense variants in human protein structures. *Am J Hum Genet* 2018; 102: 415–426.
- Skidgel RA, Engelbrecht S, Johnson AR, Erdös EG. Hydrolysis of substance P and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides* 1984; 5: 769–776.
- Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet* 1994; 6: 98–118.
- Sousa AMM, Meyer KA, Santpere G, Gulden FO, Sestan N. Evolution of the Human Nervous System Function, Structure, and Development. *Cell* 2017; 170: 226–247.
- Spiegel I, Adamsky K, Eshed Y, Milo R, Sabanay H, Sarig-Nadir O, et al. A central role for Necl4 (SynCAM4) in Schwann cell–axon interaction and myelination. *Nat Neurosci* 2007; 10: 861–869.
- Stierli S, Napoli I, White IJ, Cattin A-L, Monteza Cabrejos A, Garcia Calavia N, et al. The regulation of the homeostasis and regeneration of peripheral nerve is distinct from the CNS and independent of a stem cell population. *Development* 2018; 145: 987–994.
- Stokin GB. Axonopathy and Transport Deficits Early in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Science* 2005; 307: 1282–1288.
- Takahashi K, Yoshida N, Murakami N, Kawata K, Ishizaki H, Tanaka-Okamoto M, et al. Dynamic Regulation of p53 Subnuclear Localization and Senescence by MORC3. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 1701–1709.

- Tan SV, Wraige E, Lascelles K, Bostock H. Episodic ataxia type 1 without episodic ataxia : the diagnostic utility of nerve excitability studies in individuals with KCNA1 mutations. *Dev Med Child Neurol* 2013; 55: 959–962.
- Tchasovnikarova IA, Timms RT, Douse CH, Roberts RC, Dougan G, Kingston RE, et al. Hyperactivation of HUSH complex function by Charcot-Marie-Tooth disease mutation in MORC2. *Nat Genet* 2017; 49: 1035–1044.
- Tchasovnikarova IA, Timms RT, Matheson NJ, Wals K, et al. Epigenetic silencing by the HUSH complex mediates position-effect variegation in human cells. *Science* 2015; 348: 1481–1485.
- Thomas PK, Harding AE. Genetic aspects of hereditary motor and sensory neuropathy (types I and II). *J Med Genet* 1980; 17: 329–336.
- Thomas PK, Harding AE. Inherited Neuropathies: The Interface between Molecular Genetics and Pathology. *Brain Pathol* 1993; 3: 129–133.
- Timmerman V, Strickland A, Züchner S. Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) Disease within the Frame of the Human Genome Project Success. *Genes* 2014; 5: 13–32.
- Tong Y, Li Y, Gu H, Wang C, Liu F, Shao Y, et al. Microchidia protein 2, MORC2, downregulates the cytoskeleton adapter protein, ArgBP2, via histone methylation in gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 467: 821–827.
- Tong Y, Li Y, Gu H, Wang C, Liu F, Shao Y, et al. HSF1, in association with MORC2, downregulates ArgBP2 via the PRC2 family in gastric cancer cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018; 1864: 1104–1114.
- Vaubel RA, Rustin P, Isaya G. Mutations in the dimer interface of dihydrolipoamide dehydrogenase promote site-specific oxidative damages in yeast and human cells. *J Biol Chem* 2011; 286: 40232–40245.
- Velazquez EF, Yancovitz M, Pavlick A, Berman R, Shapiro R, Bogunovic D, et al. Clinical relevance of Neutral Endopeptidase (NEP/CD10) in melanoma. *J Transl Med* 2007; 5: 1–10.
- Venugopal J. Pharmacological modulation of the natriuretic peptide system. *Expert Opin Ther Pat* 2003; 13: 1389–1409.
- Verhoeven K, De Jonghe P, Coen K, Verpoorten N, Auer-Grumbach M, Kwon JM, et al. Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 722–727.
- Wang B, Li X, Wang J, Liu L, Xie Y, Huang S, et al. A novel AIFM1 mutation in a Chinese family with X-linked Charcot–Marie–Tooth disease type 4. *Neuromuscul Disord* 2018; 28: 652–659.
- Wang G-L, Wang C-Y, Cai X-Z, Chen W, Wang X-H, Li F. Identification and expression analysis of a novel CW-type zinc finger protein MORC2 in cancer cells. *Anat Rec* 2010; 293: 1002–1009.

Wang G, Song Y, Liu T, Wang C, Zhang Q, Liu F, et al. PAK1-mediated MORC2 phosphorylation promotes gastric tumorigenesis. *Oncotarget* 2015; 6: 9877–9886.

Wang H, Zhou Y, Cong M, Zhang L, Gu X, Tang X. Comparative transcriptomic profiling of peripheral efferent and afferent nerve fibres at different developmental stages in mice. *Sci Rep* 2018; 8: 1–13.

Wang L, Gao J, Liu J, Siedlak SL, Torres S, Fujioka H, et al. Mitofusin 2 regulates axonal transport of calpastatin to prevent neuromuscular synaptic elimination in skeletal muscles. *Cell Metab* 2018; 28: 400–414.

Wang T, Wen ZQL, Guo Y, Liu Q, Wei ZL, Liu PK, et al. Epigenetic restriction of Hippo signaling by MORC2 underlies stemness of hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death Differ* 2018; 25: 2086–2100.

Watila MM, Balarabe SA. Molecular and clinical features of inherited neuropathies due to PMP22 duplication. *J Neurol Sci* 2015; 355: 18–24.

Weedon MN, Hastings R, Caswell R, Xie W, Paszkiewicz K, Antoniadis T, et al. Exome sequencing identifies a DYNC1H1 mutation in a large pedigree with dominant Axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet* 2011; 89: 308–312.

Wright CF, FitzPatrick DR, Firth H V. Paediatric genomics: Diagnosing rare disease in children. *Nat Rev Genet* 2018; 19: 253–268.

Xu Y, McKenna RW, Molberg KH, Kroft SH. Clinicopathologic analysis of CD10+ and CD10- diffuse large B-cell lymphoma: Identification of a high-risk subset with coexpression of CD10 and bcl-2. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 183–190.

Yang Z, Zhuang Q, Hu G, Geng S. MORC4 is a novel breast cancer oncogene regulated by miR-193b-3p. *J Cell Biochem* 2019; 120: 4634–4643.

Yasir S, Herrera L, Gomez-Fernandez C, Reis IM, Umar S, Leveillee R, et al. CD10(+) and CK7/RON(-) immunophenotype distinguishes renal cell carcinoma, conventional type with eosinophilic morphology from its mimickers. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012; 20: 454–461.

Yin J, Yuan Q. Structural homeostasis in the nervous system: a balancing act for wiring plasticity and stability. *Front Cell Neurosci* 2015; 8: 1–8.

Youle RJ, Karbowski M. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 657–663.

Zanni G, Nardella M, Barresi S, Bellacchio E, Niceta M, Ciolfi A, et al. De novo p.T362R mutation in MORC2 causes early onset cerebellar ataxia, axonal polyneuropathy and nocturnal hypoventilation. *Brain* 2017; 140: e34.

Zhai J, Lin H, Julien JP, Schlaepfer WW. Disruption of neurofilament network with aggregation of light neurofilament protein: A common pathway leading to motor neuron degeneration due to Charcot-Marie-Tooth disease-linked mutations in NFL and HSPB1. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 3103–3116.

Zhang Q, Song Y, Chen W, Wang X, Miao Z, Cao L, et al. By recruiting HDAC1, MORC2 suppresses p21Waf1/Cip1 in gastric cancer. *Oncotarget* 2015; 6: 16461–16470.

Zhao X, Li X, Hu Z, Liu L, Xie Y, Tian T, et al. MORC2 mutations in a cohort of Chinese patients with Charcot–Marie–Tooth disease type 2. *Brain* 2016; 139: e56.

Zong L, Guan J, Ealy M, Zhang Q, Wang D, Wang H, et al. Mutations in apoptosis-inducing factor cause X-linked recessive auditory neuropathy spectrum disorder. *J Med Genet* 2015; 52: 523–31.

Züchner S, Mersiyanova I V., Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause CMT neuropathy 2A. *Nat Genet* 2004; 36: 449–451.